

基于金纳米棒放大的高灵敏度纳米光纤生化传感器

李 明^{1,2} 李凯伟¹ 代 方^{1,2} 周文超¹ 舒风风^{1,2} 吴一辉¹

¹中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 吉林 长春 130033

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 为满足生物医学领域对传感器灵敏度和特异性的要求,利用金纳米棒对纳米光纤消逝场强的消光作用,提出基于金纳米棒标记放大的锥形光纤生化传感器。通过理论计算金纳米棒对光纤传输特性的影响,设计实验证明纳米光纤具有对单个金纳米棒的响应能力。采用双抗夹心法对PBS溶液中的羊IgG检测,检测下限可达0.02 ng/mL,证实此种传感器具有极高的灵敏度和特异性。提出的纳米光纤生化传感器结构简单、响应迅速、成本低廉,在医学临床诊断、食品安全检测、环境监测领域具有重要的实用价值。

关键词 传感器; 纳米光纤; 金纳米棒; 单纳米粒子探测; 生化检测

中图分类号 O436

文献标识码 A

doi: 10.3788/AOS201535.1206001

Highly Sensitive Optical Nanofiber Sensor Based on Gold Nanorod Amplification

Li Ming^{1,2} Li Kaiwei¹ Dai Fang^{1,2} Zhou Wenchao¹ Shu Fengfeng^{1,2} Wu Yihui¹

¹Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract In order to meet the requirements of high sensitivity and specificity of biomedical research, a new optical nanofiber biosensor using gold nanorods (GNR) as amplification labels is reported, based on extinction property of GNR. Optical influence of GNR attached to the surface of fiber is studied. Single GNR is successfully resolved in experiment. In this nanofiber biosensor, a sandwich assay strategy is utilized for detection. The limit of detection (LOD) of this sensor for Goat-IgG is 0.02 ng/mL in PBS, which shows a great performance in sensitivity and specificity. The biosensor, reported in this work, has the advantages of simple detection scheme, fast response time, and ease of miniaturization, which might make this biosensor a promising platform for clinical cancer diagnosis, food safety detection and environmental monitoring.

Key words sensors; nanofiber; gold nanorod; single particle detection; biochemical detection

OCIS codes 060.2370; 060.4005; 170.3890; 290.2200

1 引 言

非荧光标记生物传感器相比传统手段具有灵敏度高、特异性好的优点,同时又避免了荧光标记带来的淬灭问题^[1-2]。常见的非荧光标记物有金、银、磁性纳米粒子等。金纳米棒因其横向与纵向表面电荷密度不同,具有两个共振吸收峰——横向吸收峰和纵向吸收峰。随着金纳米棒(GNR)长径比的增大,长峰逐渐红移^[3-5]。这种可调谐的特性,使得金纳米棒在快速响应、多目标探测方面具有无可比拟的优势。

首次将 GNR 用于生化传感的是 Yu 等^[6],该实验小组将三种不同长径比的金纳米棒制作成等离子体分子

收稿日期: 2015-05-07; 收到修改稿日期: 2015-06-25

基金项目: 国家国际科技合作专项(2015DFG02620)、国家863计划(2015AA042402)、中国科学院科研装备研制项目(YZ201353)、吉林省“双十工程”重大科技攻关项目(201402011GX)

作者简介: 李 明(1991—),男,硕士研究生,主要从事高灵敏度纳米光纤生物传感器方面的研究。

E-mail: limit_npc@hotmail.com

导师简介: 吴一辉(1965—),女,研究员,博士生导师,主要从事微光机电系统方面的研究。

E-mail: yihuiwu@ciomp.ac.cn(通信联系人)

探针实现了多目标同时检测。随后 Marinakos 等^[7]实现了基于 GNR 培养基的局域表面等离子体共振(LSPR)传感器,对链霉亲和素检出限可达 5 ng/mL。上述报道的方法均是利用 GNR 长峰偏移的特性,接收端需要光谱仪等器件,因而具有装置复杂,灵敏度不高,成本高昂的缺点。

锥形纳米光纤是依赖导模在锥形区域形成的消逝场对外界环境变化的高灵敏度进行传感作用的^[8-9]。本文首次利用 GNR 对消逝场强的消光特性,提出了基于金纳米棒粒子放大的高灵敏度纳米光纤生化传感器,实现了对单个 GNR 的检测和 PBS 溶液中的羊 IgG 检出下限可达 0.02 ng/mL。大部分的检测技术对蛋白质检出下限为 $\mu\text{g/mL}$ 、ng/mL 量级,如酶联免疫分析法(ELISA)最新的实验研究表明其对血清乙型肝炎表面抗原 HBsAg 检出下限可达 0.317 ng/mL;有报导的表面等离子体共振传感器(SPR)其对羊 IgG 的检出下限可达 0.30 $\mu\text{g/mL}$,本文所提出的传感器具有更低的检出下限。此种传感器结构简单、灵敏度高、特异性好、成本低^[9-10],在生物医学、微纳制造,环境监测,食品安全等方面具有重要的实用价值^[11-12]。

2 理论分析

金纳米棒对光纤传输特性的影响是通过消逝场的吸收与散射造成的。当单个 GNR 进入到锥形区域的消逝场,对传输光场的影响主要表现为消光作用,多个 GNR 的消光作用可以近似等效成

$$P_{\text{out}} = P_{\text{in}} \exp(-\eta_s Q_{\text{ext}} N), \quad (1)$$

式中 P_{out} 、 P_{in} 为纳米光纤的输入功率和输出功率, η_s 为有效消逝场功率占有率, Q_{ext} 为 GNR 的消光效率, N 为纳米小球的总数目^[13]。

GNR 的消光效率 Q_{ext} 与周围介质介电常数、粒子的尺寸大小、入射光场角度相关。采用边界基元法(BMP)^[14],首先模拟横轴固定为 20 nm,长径比变化的随机位置的 GNR 在水溶液(折射率为 1.33)中的消光效率。如图 1 所示:金纳米棒有两个共振消光峰,四条曲线分别对应着长径比 R 为 2.5、3、3.5、4 的金纳米棒。左插图是曲线细节的放大,对应着横向消光峰;中间部分对应着纵向消光峰,从以上四条曲线可以看出,金纳米棒纵向消光峰要远大于横向消光峰,因此讨论金纳米棒的纵向消光就更有实用意义。右插图表示的是纵向消光峰 λ_{max} 随长径比 R 的变化,可以看到 λ_{max} 随着 R 增大显著红移,这种偏移随着长径比从 2.5 到 4 超过了 100 nm。

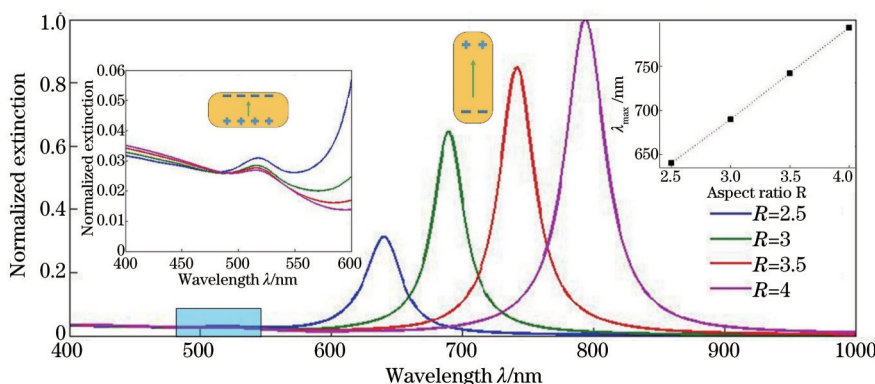


图 1 随机方位不同长径比的金纳米棒在水溶液中的消光光谱

Fig.1 Calculated extinction spectra of randomly orientated nanorods with varying aspect ratios in the medium of water

GNR 消光效率还受到入射光场角度变化的影响,当入射光场平行于纳米棒长轴,只激发起纵向谐振模式,纵向消光效率最大;相应地,当入射光场垂直于长轴,只激发起横向谐振模式,纵向消光效率最小^[15]。对于文中的单模纳米光纤,入射光场角度取决于 GNR 与光纤的夹角大小。本次实验光源的功率比较小,GNR 主要依靠布朗运动吸附在纳米光纤表面,因此 GNR 与光纤的夹角可以认为是随机分布,后面的电镜实验中也证实这一点。

金纳米棒对光纤传输能量的影响还与入射到纳米粒子上的消逝场功率占有率 η_s 相关。 η_s 主要取决于光纤消逝场的空间分布和纳米粒子在消逝场中的位置^[16]。对于尺寸在几十纳米的粒子来说,应当认为纳米粒子直接吸附在光纤表面, η_s 主要与纳米光纤直径和入射波长有关。因此可以得到

$$\eta_s = \iint_{\Omega_s} \frac{p(r, \varphi) r dr d\varphi}{P}, \quad (2)$$

式中 Ω_s 为纳米棒的几何横截面, $p(r, \varphi)$ 为纳米棒几何横截面内任意一点的消逝场功率密度, r 、 φ 表示柱坐标下任意一点坐标, P 为该光纤横截面内总功率。金纳米棒粒子对光纤消逝场的有效消光效率 Q_{eff} , 则可表示为

$$Q_{\text{eff}} = Q_{\text{ext}} \eta_s = Q_{\text{ext}} \frac{\int_{\Omega_s} p(r, \varphi) r dr d\varphi}{P} \quad (3)$$

经过上述理论分析, 重点讨论金纳米棒的纵向谐振模式, 模拟了短轴固定为 20 nm, 不同长径比的 GNR, 对于 500 nm 的锥形光纤, GNR 长轴与光纤夹角对纵向消光效率的影响。由图 2(a) 可知, 对于 20 nm×50 nm 的 GNR, 最大消光效率能达到 0.022, 长径比越大消光效率越大, 普通的探测器很容易就能满足要求, 而且此种大小的 GNR 在溶液中能保持很好的悬浮性, 不容易沉淀聚集, 适合做光学检测标记物。

同时纳米光纤直径对有效消光效率的影响也十分明显, 光纤并不是越细越灵敏。模拟了不同直径的纳米光纤对不同长径比的金纳米棒最大消光效率的影响, GNR 短轴固定为 20 nm。由图 2(b) 可知, 不同长径比的金纳米棒, 对应着不同的最优光纤直径。随着长径比增大, 最优光纤直径不断变大。典型的, 对于 500 nm 左右的光纤, 不同长径比的金纳米棒的最大消光效率均远大于探测器的分辨极限 0.001。500 nm 的光纤制备和封装工作已经十分成熟。因此在理论上完全可以实现单个 20 nm×50 nm 的金纳米棒粒子检测。同时金纳米棒粒子也可以用于生化检测信号放大, 提高探测器功率。下节设计实验进一步证实上述结论。不同长径比的金纳米棒粒子具有不同的消光峰, 这种消光波长可调谐的性能使得金纳米棒粒子在多波长探测方面具有广阔的应用前景, 大大提高探测器工作效率。

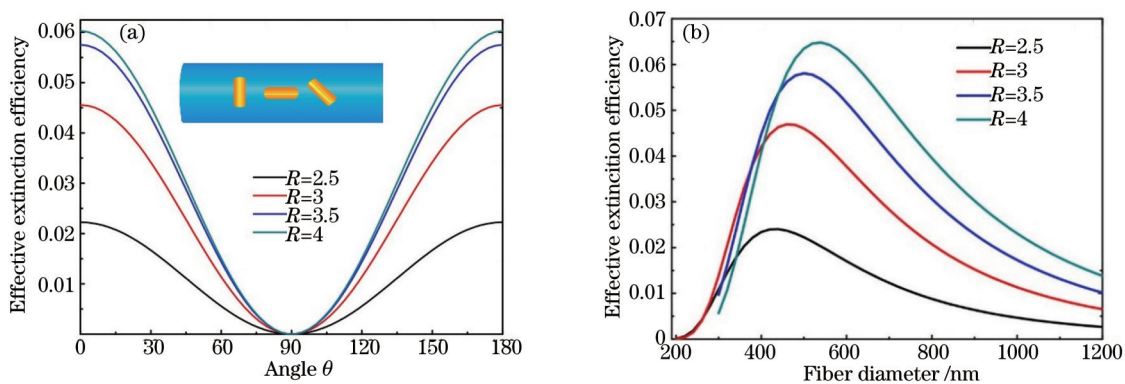


图 2 (a) 金纳米棒最大消光效率随光场入射角度变化; (b) 金纳米棒最大消光效率随光纤直径变化关系

Fig.2 (a) Variation of maximal Q_{eff} as a function of incident angle; (b) variation of maximal Q_{eff} as a function of fiber diameter

3 实验与材料

3.1 实验装置与纳米光纤制备

实验装置如图 3(a) 所示: LED 光源经过准直聚焦之后耦合进纳米传感光纤, 纳米传感光纤被固定在一个有 PDMS 封闭的流动进样/出样腔内。在输出端, 用光谱仪采集光强信号, 数据由笔记本电脑存储处理。纳米锥形光纤传感器的制备在之前的工作中就有所报道^[15]。典型的纳米光纤锥形区域为 3 mm, 锥腰直径为 500 nm, 表面光洁度好, 效率高, 如图 3(b) 所示。纳米光纤封装在一个由 PDMS 封闭的流动进样/出样腔内, 腔长大约 6 mm, 如图 3(c) 所示。

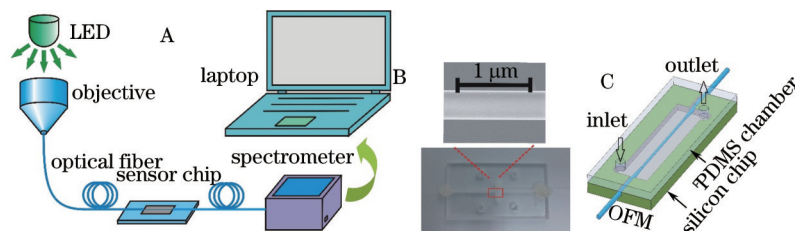


图 3 (a) 纳米光纤探测装置图; (b) 纳米光纤样品池和 500 nm 光纤电镜图; (c) 流动进样腔

Fig.3 (a) Illustration of experimental setup; (b) image of a sensor cell and SEM image of a 500 nm diameter optical nanofiber; (c) schematic diagram of sample delivery chamber

3.2 金纳米棒的合成与抗体的偶联固定

晶种生长法是目前GNR的各种制备方法中应用最为广泛的,以CTAB为表面活性剂,能够制作长径比为2~5的金纳米棒^[17]。GNR的抗体偶联固定采用静电吸附的方法,在金纳米棒表面固定鼠抗羊IgG抗体^[18]。制作出来的GNRs由扫描电镜和Lambda 850来表征。

3.3 单金纳米棒粒子探测

将制作好的纳米光纤固定在样品池中,往腔内通入稀释的金纳米棒粒子悬浊液,实时监测输出光强的变化。金纳米棒粒子会在溶液中不断扩散吸附在光纤表面。如图4(a)所示,纳米光纤输出的光强就会相应降低。在单次反应结束,可以加入数微升的王水溶液(浓盐酸:浓硝酸=3:1)实现金纳米棒的脱附。

3.4 纳米光纤表面生物处理与夹心法生物检测实验

光纤表面生物处理采用之前报导过的方法^[15],在光纤表面固定兔抗羊IgG抗体。采用双抗夹心法进行梯度浓度抗原检测实验,如图4(b)所示。将羊IgG抗原用PBS缓冲液稀释到0.02~2 ng/mL等一系列梯度浓度,放置15 min至室温。分次将不同浓度的羊IgG抗原通入到反应池中。待抗原和抗体充分反应结合之后,将抗体偶联的金纳米棒溶液用BSA溶液(2.5%, v/v)稀释至体积比1:10000;往样品池中通入100 μ L上述稀释过的金纳米棒溶液,观察30 min之内传输光强的变化。得到不同浓度下的光纤传输光强变化曲线。用0.1M的甘氨酸-盐酸(pH 2.3)配置而成的解离液,在单次反应结束之后对抗原抗体进行解离,实现传感器重复使用。

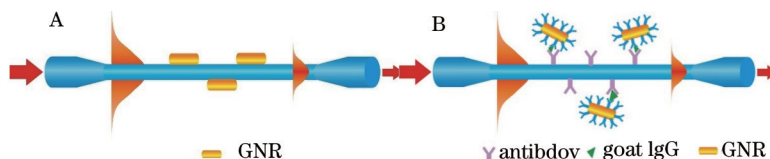


图4 (a) 单个金纳米棒粒子探测示意图; (b) 金纳米棒标记放大的抗原抗体免疫结合探测示意图

Fig.4 (a) Detection of single GNRs; (b) immunoassay detection using GNRs as signal amplification labels

4 结果和讨论

4.1 金纳米棒的表征

金纳米棒具有两个共振吸收峰。横向共振吸收峰在520 nm左右,金纳米棒长径比的变化对它吸收峰中心波长偏移影响不大;纵向共振吸收峰一般为600 nm到近红外区域,随长径比增大而红移。用电子扫描显微镜和Lambda 850分光光度计对金纳米棒大小尺寸,形貌和可见光波段的吸收谱线进行了表征测定,如图5(a)和(b):金纳米棒的纵向消光峰相对突出;而且纵向消光峰随着长径比增大,红移的现象十分显著。在实际应用中,可以利用金纳米棒纵向消光波长可调谐的特性,利用频分复用的原理,进行多目标同时检测,大大提高传感器的检测效率^[6]。

4.2 纳米光纤探测单个金纳米棒

单个金纳米棒进入到锥形纳米光纤的锥形区域时,对传输光场有消光作用。金纳米棒粒子会通过扩散运动吸附在光纤表面,如图5(c)和(d)。实时监测输出光强,得到的传输曲线如图5(e)所示。因为金纳米棒的浓度足够稀释,采样时间十分迅速,多个GNR同时吸附在光纤上的概率很小^[19],因而曲线中每个离散的下降阶跃信号,代表的是一个金纳米棒和纳米光纤表面的结合^[20]。阶跃信号的大小,可以通过(1)式,换算成有效消光效率 Q_{eff} ,得到的统计直方图如图5(f)所示。大部分的信号集中在0.002~0.006之间,总体分布呈现出高斯型。实验采用的金纳米棒粒子短轴为16 nm,长轴为50 nm左右,选用的纳米光纤直径为600 nm左右,经过第2节理论计算的 Q_{eff} 最大值为0.0077。因此统计出来的有效消光效率符合理论预期。实验的误差来源有:光纤锥型过渡区域的吸附作用,金纳米棒粒子大小分布的不均匀性,导致响应信号分布展宽^[21]。但是总体误差依然在实验允许的范围以内。证明了锥形纳米光纤对单个纳米棒粒子的响应能力,因此可以将GNR用于光学生化检测,提高检测灵敏度。

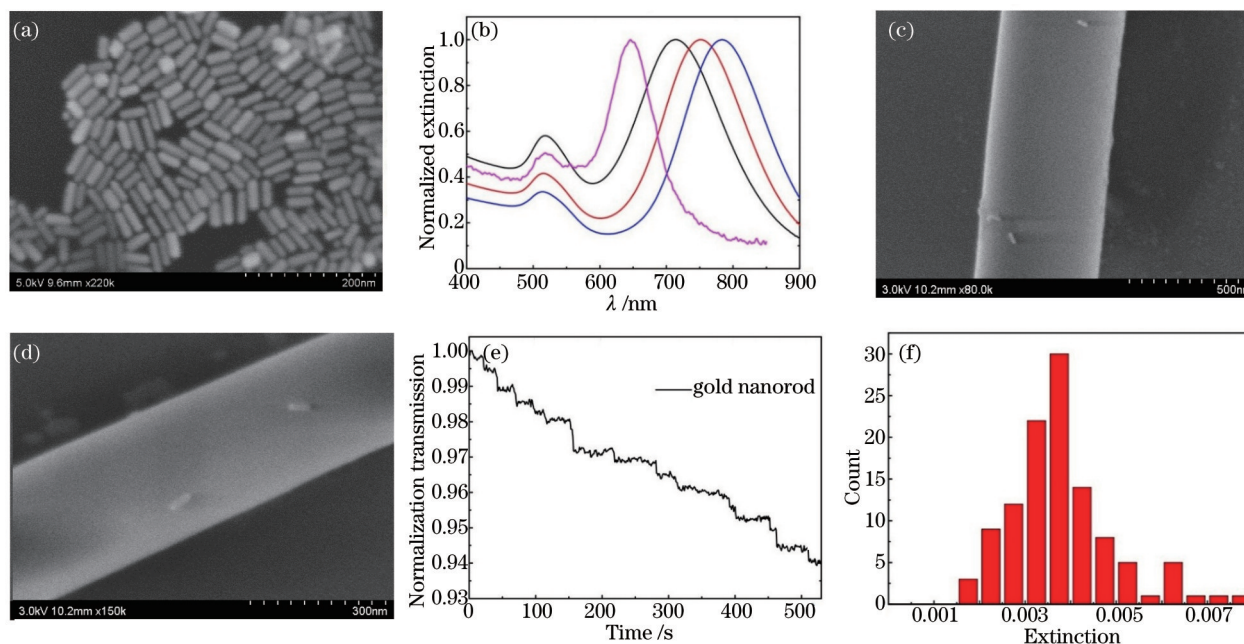


图 5 (a) 金纳米棒电镜照片; (b) 不同长径比的金纳米棒溶液的吸收光谱; (c) (d)金纳米棒附着在光纤表面电镜照片; (e) 纳米光纤传输光强随金纳米棒吸附变化; (f) 金纳米棒消光效率的统计直方图

Fig.5 (a) SEM image of GNRs; (b) absorption spectra of GNR solution with different aspect ratios; (c) (d) SEM image of GNRs adsorbed on surface of nanofiber; (e) change of the output intensity with GNRs bind to optical nanofiber; (f) distribution of measured extinction signal size

4.3 锥形纳米光纤生物检测实验

按照 3.4 节步骤,得到的生化检测响应曲线如图 6(a)所示,纵坐标为归一化传输光强,横坐标为反应时间。不同浓度的抗原引起的光强变化差异很大,反应出此种传感器十分灵敏。通过双抗夹心法结构,GNR 经过抗原抗体反应吸附在光纤表面,引起光强传输特性的改变,得到下降的响应曲线。如图 6(b)所示,1 ng/mL 抗原的响应曲线光强下降十分迅速,表示大量金纳米棒结合到光纤表面,而对于 0.02 ng/mL 抗原的响应曲线出现三个阶跃响应信号,表示单个的金纳米棒依次结合到光纤表面,在反应 20 min 以后四条反应曲线也近乎平行,说明此时已经充分反应。图 6(a)内插图是检测标度曲线,在 2 ng/mL 浓度时曲线近乎饱和。以上实验证明采用 GNR 作为信号放大标记物对于 PBS 溶液中的羊 IgG 抗原检测范围可达 0.02~2 ng/mL,具有高灵敏度,响应迅速的优点。基于金纳米棒放大的高灵敏度纳米光纤生化传感器是一个很有前景的高灵敏度生化检测手段。

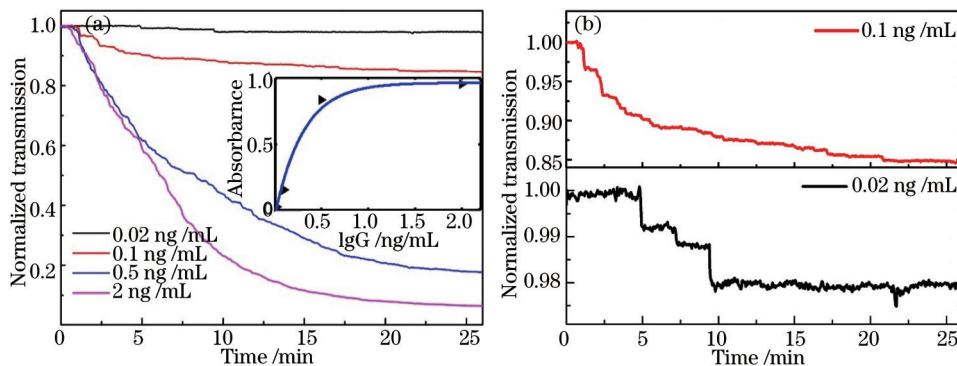


图 6 (a) 纳米光纤传输光强随金纳米棒在光纤表面免疫吸附变化; (b) 双抗夹心法响应曲线

Fig.6 (a) Output intensity versus GNRs immune bind to the optical nanofiber; (b) secondary antibody functionalized GNR enhanced sensor response to samples

5 结论与展望

提出了一种基于金纳米棒放大的高灵敏度纳米光纤生化传感器。利用边界基元法计算光纤表面的金

纳米棒粒子对纳米光纤传输特性的影响。通过实验实现纳米光纤对单个金纳米棒粒子的探测,验证了理论的正确性。进一步通过免疫生化实验,证实了金纳米棒作为标记物的信号放大作用可用于锥形纳米光纤传感器,在PBS溶液中对羊IgG检测下限可达0.02 ng/mL。提出的生化传感器体积小,成本低廉,灵敏度高,响应快速,而且纳米光纤和金纳米棒粒子的制备工艺已经相当成熟,易于实用化,希望以此能在医学临床诊断、食品安全检测、环境监测等领域发挥更大作用。

参 考 文 献

- 1 Wiejata P J, Shankar P M, Mutharasan R. Fluorescent sensing using biconical tapers[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2003, 96(1): 315-320.
- 2 Chang Y F, Chen R C, Lee Y J, *et al.*. Localized surface plasmon coupled fluorescence fiber-optic biosensor for alpha-fetoprotein detection in human serum[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, 24(6): 1610-1614.
- 3 Pérez Juste J, Pastoriza Santos I, Liz Marzán L M, *et al.*. Gold nanorods: synthesis, characterization and applications[J]. *Coordination Chemistry Reviews*, 2005, 249(17): 1870-1901.
- 4 Huang H W, Tang C R, Zeng Y L, *et al.*. Label-free optical biosensor based on localized surface plasmon resonance of immobilized gold nanorods[J]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 2009, 71(1): 96-101.
- 5 Link S, Mohamed M B, El-Sayed M A. Simulation of the optical absorption spectra of gold nanorods as a function of their aspect ratio and the effect of the medium dielectric constant[J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 1999, 103(16): 3073-3077
- 6 Yu C, Irudayaraj J. Multiplex biosensor using gold nanorods[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(2): 572-579.
- 7 Marinakos S M, Chen S, Chilkoti A. Plasmonic detection of a model analyte in serum by a gold nanorod sensor[J]. *Analytical Chemistry*, 2007, 79(14): 5278-5283.
- 8 Leung A, Shankar P M, Mutharasan R. A review of fiber-optic biosensors[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 125(2): 688-703.
- 9 Song Zhangqi, Wei Zhengtong, Zhang Xueliang, *et al.*. Research on sensing technologies based on optical micro-nano fiber evanescent field[J]. *Chinese J Lasers*, 2013, 40(s1): s105005.
宋章启, 卫正统, 张学亮, 等. 基于微纳光纤倏逝场的传感技术研究[J]. *中国激光*, 2013, 40(s1): s105005.
- 10 Ye Z, Tan M, Wang G, *et al.*. Development of functionalized terbium fluorescent nanoparticles for antibody labeling and time-resolved fluoroimmunoassay application[J]. *Talanta*, 2005, 65(1): 206-210.
- 11 Qu Xiaochao, Liang Jiaming, Yao Cuiping, *et al.*. Optical properties of gold nanoparticle and its application in biological imaging and photothermal therapy[J]. *Chinese J Lasers*, 2008, 34(11): 1459-1465.
屈晓超, 梁佳明, 姚翠萍, 等. 金纳米微粒的光学性质及其在生物成像和光热疗法中的应用[J]. *中国激光*, 2008, 34(11): 1459-1465.
- 12 Jin Shaoshen, Chen Zhe, Wei Qingsong, *et al.*. Add-drop filter by coupling between micro-nano fiber ring and side polished fiber[J]. *Chinese J Lasers*, 2014, 41(8): 0805008.
金绍深, 陈哲, 卫青松, 等. 微纳光纤环与侧边抛磨光纤耦合的上下载滤波器[J]. *中国激光*, 2014, 41(8): 0805008.
- 13 Liu Guigen. Studies on the Enhancement of Dynamic Range and Sensitivity for Fiber-Optic Biosensors[D]. Beijing: Chinese Academy of Sciences, 2013: 51-60
刘桂根. 光纤生物传动的动态范围及灵敏度增强效应研究[D]. 北京: 中国科学院大学, 2013: 51-60.
- 14 Hohenester U, Trügler A. MNPBEM- A Matlab toolbox for the simulation of plasmonic nanoparticles[J]. *Computer Physics Communications*, 2012, 183(2): 370-381.
- 15 Dai Fang, Li Kaiwei, Wu Yihui, *et al.*. Highly sensitive optical nanofiber bio-chemical sensor based on magnetic nanoparticles amplification [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(12): 1206003.
代方, 李凯伟, 吴一辉, 等. 基于纳米磁珠放大的高灵敏度纳米光纤生化传感器[J]. *光学学报*, 2014, 34(12): 1206003.
- 16 Wang S, Pan X, Tong L. Modeling of nanoparticle-induced Rayleigh-Gans scattering for nanofiber optical sensing[J]. *Optics Communications*, 2007, 276(2): 293-297.
- 17 Nikoobakht B, El-Sayed M A. Preparation and growth mechanism of gold nanorods (NRs) using seed-mediated growth method[J]. *Chemistry of Materials*, 2003, 15(10): 1957-1962.
- 18 Wang C, Chen Y, Wang T, *et al.*. Biorecognition-driven self-assembly of gold nanorods: a rapid and sensitive approach toward antibody sensing[J]. *Chemistry of Materials*, 2007, 19(24): 5809-5811.
- 19 Armani A M, Kulkarni R P, Fraser S E, *et al.*. Label-free, single-molecule detection with optical microcavities[J]. *Science*, 2007, 317(5839): 783-787.
- 20 Zhu J, Özdemir Ş K, Yang L. Optical detection of single nanoparticles with a subwavelength fiber-taper[J]. *Photonics Technology Letters, IEEE*, 2011, 23(18): 1346-1348.
- 21 Li K, Liu G, Wu Y, *et al.*. Gold nanoparticle amplified optical microfiber evanescent wave absorption biosensor for cancer biomarker detection in serum[J]. *Talanta*, 2014, 120: 419-424.

栏目编辑: 刘丰瑞