

氧化石墨烯包覆金纳米壳修饰长周期光栅的 免疫传感器

石胜辉, 吴德操, 王鑫, 聂青林, 刘志江, 罗彬彬*, 刘恩华, 柳鹏, 赵明富**

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

摘要 提出一种基于氧化石墨烯包裹金纳米壳(EGO-AuNS)修饰长周期光纤光栅(LPFG)的新型免疫传感器,并将其应用于禽流感病毒(AIV)检测。利用静电结合原理将石墨烯(GO)包裹在金纳米壳(AuNS)表面形成 EGO-AuNS 复合材料;采用硅烷偶联剂以共价键结合方式将其固定在 LPFG 表面;再以 AIV 单克隆抗体(AIV-MAbs)为特异性生物分子识别单元,固定于光栅表面构成 EGO-AuNS-LPFG 免疫传感器。结果表明:在折射率(RI) 1.333–1.411 范围内,EGO-AuNS-LPFG 传感器 RI 灵敏度高达 -66.60 nm/RIU ,约为普通 LPFG 传感器的 6 倍。通过对不同浓度等级 AIV 抗原溶液的检测,表明该免疫传感器的检测极限约为 8 ng/mL ,饱和点约为 $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$,在其线性响应区域的检测灵敏度约为 $2946.25 \text{ pm}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$,约为基于 GO 涂覆包层腐蚀型普通 LPFG 的 AIV 免疫传感器灵敏度的 7.3 倍;此外,其对 AIV 分子的解离系数约为 $3.49 \times 10^{-9} \text{ mol/L}$ 。通过对几种尿囊液的对照检测实验,表明该免疫传感器且具有良好的特异性和临床性有效性,因此它在生物医学领域有较大应用潜力。

关键词 光纤传感;长周期光纤光栅;氧化石墨烯包覆金纳米壳;禽流感病毒;免疫检测

中图分类号 TN253

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202040.1806001

An Immunosensor Based on the Graphene-Oxide-Encapsulated Au-Nanoshell-Coated Long-Period Fiber Grating

Shi Shenghui, Wu Decao, Wang Xin, Nie Qinglin, Liu Zhijiang,
Luo Binbin*, Liu Enhua, Liu Peng, Zhao Mingfu**

Chongqing Key Laboratory of Optical Fiber Sensor and Photoelectric Detection,
Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China

Abstract In this study, a novel immunosensor based on graphene-oxide (GO)-encapsulated Au-nanoshell (EGO-AuNS)-coated long-period fiber grating (LPFG) is presented for avian influenza virus (AIV) detection. The EGO-AuNS composites were obtained by coating GO on the surface of AuNS via electrostatic bonding, and immobilized on the surface of LPFG via covalent bonding using a silane coupling agent. Then, AIV monoclonal antibodies (AIV-MAbs), which serve as specific biomolecule recognition units, were fixed on the grating surface to realize the EGO-AuNS-LPFG immunosensor. The experimental results indicate that the refractive index (RI) sensitivity of the EGO-AuNS-LPFG immunosensor is -66.60 nm/RIU when RI is from 1.333 to 1.411, which is six times greater than that of the LPFG-based sensor. Based on the detection of AIV antigen solutions with different concentrations, the limit of detection of the immunosensor is observed to be approximately 8 ng/mL . Further, the immunosensor becomes saturated at approximately $50 \text{ }\mu\text{g/mL}$ and exhibits a linearity sensitivity of approximately $2946.25 \text{ pm}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$, which is 7.3 times greater than that of the GO-coated cladding-etched LPFG immunosensor. Based on the detection results of several allantoic fluids, the proposed immunosensor exhibits good specificity and clinical effectiveness. Furthermore, it exhibits considerable promise for application in the biomedical field.

Key words fiber sensing; long-period fiber grating; graphene-oxide-encapsulated Au nanoshell; avian influenza virus; immunoassay

OCIS codes 060.2370; 280.4788; 060.3735

收稿日期: 2020-04-20; 修回日期: 2020-06-01; 录用日期: 2020-06-09

基金项目: 国家自然科学基金(61875026)、重庆市教育委员会科学技术研究计划青年项目(KJQN201801121)、重庆市自然科学基金面上项目(cstc2019jcyj-msxmX0093, cstc2016jcyjA0476)、重庆理工大学研究生创新项目(ycx20192046, ycx20192048, ycx20192049)

* E-mail: luobinbin@cqut.edu.cn; ** E-mail: zmf@cqut.edu.cn

1 引 言

长周期光纤光栅 (LPFG) 因其易于操作、抗电磁干扰、耐化学腐蚀、远距离传感和尺寸小等优点被广泛应用于扭转检测^[1] 和目标分析物 (如细菌^[2]、蛋白质多肽类^[3]、免疫球蛋白^[4]、DNA^[5] 等) 的免标识生物检测, 但其灵敏度较低。为此, 在 LPFG 表面修饰对各种功能敏感的薄膜并提高其灵敏度, 以实现对抗体抗原^[6-10]、细胞膜受体^[11] 以及病毒^[12-13] 等目标生物分子的检测。如: Liu 等^[14] 利用化学键与物理吸附相结合原理, 将氧化石墨烯 (GO) 沉积于双峰 LPFG 表面, 并将其应用于抗 IgG 检测, 在低折射率 (RI) 1.333~1.347 范围内, LPFG 的 RI 灵敏度为 2538 nm/RIU。

自从 Novoselov 等^[15] 首次利用微机械剥离法成功地从石墨中分离出石墨烯后, 石墨烯以完美的二维结构、独特的电子、光学和化学性质而备受关注^[16]。GO 作为石墨烯基材料的重要衍生物, 其表面含有丰富的羟基和羧基等含氧官能团, 同时拥有较大比表面积、良好亲水性、优异生物兼容性等优异特性^[17], 被广泛应用于生物传感领域。Xu 等^[18] 基于化学交联法, 利用 GO-葡萄糖氧化酶功能化 LPFG, 构建了超快无标识葡萄糖生物传感器。Liu 等^[19] 采用 GO 纳米片修饰 LPFG 构成高灵敏生物传感器, 并用于检测血红蛋白, 该传感器灵敏度为 1.9 dB/(mg·mL⁻¹), 可检测浓度为 0.05 mg/mL。Esposito 等^[20] 利用 PC-GO (PC, Polycarbonate) 多层膜修饰单端 LPFG 构成超灵敏生物传感器检测牛血清蛋白 (BSA) 浓度, 在 0.1 × 10⁻¹⁰ ~ 1000 × 10⁻¹⁰ mol/L 范围, 检测极限 (LOD) 小于 0.1 × 10⁻¹⁰ ~ 1000 × 10⁻¹⁰ mol/L。另一方面, 贵金属纳米颗粒/壳, 特别是具有独特光学和电学特性、高生物相容性等优异特性的金纳米颗粒 (AuNPs)^[21] 被用于传感时, 由于靶分子在金膜上的吸收性差, 传感器的灵敏度受限。此外, 制备这种传感器需要特殊的旋转真空喷镀或溅射系统, 以确保金膜尽可能均匀地沉积于传感器表面。故 AuNPs 用于石墨烯片上进行修饰, 形成的 GO-AuNPs 复合材料, 可以实现与靶分子的更多结合位点, 增强靶分子的吸收, 提高传感器的灵敏度^[22-23]。因此, 在设计用于各种生物传感应用的 LPFG 传感器时, 多层纳米材料薄膜层是增强其灵敏度的基本方法。

在之前研究中, 本课题组报道了 GO 修饰包层腐蚀 LPFG 的禽流感病毒 (AIV) 免疫传感器, 但该

传感器的检测灵敏度较低^[24]。基于此, 本文制作并研究了 GO 包覆金纳米壳 (EGO-AuNS) 复合材料修饰 LPFG 的免疫生物传感器, 并应用于 AIV 检测。首先, 利用静电结合原理制备 EGO-AuNS 复合材料, 并将其以共价键结合方式固定在 LPFG 表面, 构成 EGO-AuNS-LPFG 传感器, 使用场发射扫描电子显微镜对传感器表面形貌进行表征, 并对其光谱特性及 RI 灵敏度进行分析; 进一步以 AIV-MAbs 为识别单元固定于传感器表面, 针对 AIV 抗原分子进行检测, 对生物传感器的 LOD 和检测范围等参数进行分析, 并与 GO 修饰包层腐蚀 LPFG 的 AIV 免疫传感器^[24] 性能参数进行比较; 最后, 通过对几种尿囊液的检测, 对其特异性、临床试验等性能进行评估。

2 传感检测理论模型

LPFG 结构会使光纤前向传输的纤芯导模耦合到同向传输的不同阶次包层模 LP_{0m} ($m=1, 2, 3, \dots$) 中, 纤芯导模与包层模耦合的波长由相位匹配方程确定^[25], 相位匹配方程为

$$\lambda_{\text{res}} = (n_{\text{eff}}^{\text{co}} - n_{\text{eff}}^{\text{cl},m}) \cdot \Lambda, \quad (1)$$

式中: $n_{\text{eff}}^{\text{co}}$ 和 $n_{\text{eff}}^{\text{cl},m}$ 分别是纤芯导模和第 m 阶包层模的有效折射率; Λ 是 LPFG 周期; λ_{res} 为谐振波长。研究表明: 仅仅当 LPFG 周围介质折射率 (SRI) 略低于包层折射率 (CRI) 时, 在输出光谱中可观察到光栅包层模 λ_{res} 的移动/谐振峰幅度的变化^[26]。然而, 当 RI 低于 CRI 时, LPFG 灵敏度急剧衰减, 并且对周围高于 CRI 的介质不敏感。这种缺陷可以通过在 LPFG 表面沉积多层薄膜材料来解决^[27]。因此, 沉积高灵敏度薄膜材料的 LPFG 可以作为传感器应用于化学和生物化学领域。

当在 LPFG 表面沉积 RI 为 n 的薄膜材料时, 包层模有效折射率 $n_{\text{eff}}^{\text{cl},m}$ 将受到光栅 SRI 的影响。此时, 包层周围薄膜介质折射率的影响可以表示为^[25]

$$\frac{d\lambda_{\text{res}}}{dn_{\text{sur}}} = \frac{d\lambda_{\text{res}}}{dn_{\text{eff}}^{\text{cl},m}} \cdot \frac{dn_{\text{eff}}^{\text{cl},m}}{dn_{\text{sur}}}, \quad (2)$$

其中 n_{sur} 是 SRI。对特定生物方面测定的应用, 需要在 LPFG 的表面上沉积灵敏度调节层、生物功能层和受体层, 这对吸附目标分子至关重要。

基于光纤光栅结构的传感器的 RI 灵敏度 $S_{v,m}$ 通常定义为特定包层模谐振波长的变化相对于 SRI 的变化, 表达式为

$$S_{v,m} = \frac{\Delta\lambda_{\text{res},m}}{\Delta n}, \quad (3)$$

式中, $\lambda_{res,m}$ 为第 m 个包层模 $\Delta\lambda_{res}$ 的变化, Δn 为 SRI 的变化。然而, LPFG 应用于生物传感时, 需要重新定义其灵敏度 S_A , 以便讨论传感器相对每个沉积层平均厚度的灵敏度以及该层 RI 的变化, 用于表征生物传感表面的生化反应^[28], 因此, 在这种情况下, 沉积层灵敏度 S_A 被定义为^[28-29]

$$S_A = \frac{d\lambda_{res}}{dH_{AL}} + \frac{d\lambda_{res}}{dn_{AL}} = S_{TH} + S_{LRI}, \quad (4)$$

式中: S_{TH} 为包层模对生物分子层平均厚度变化的灵敏度; S_{LRI} 为包层模对应层 RI 变化引起的灵敏度。

对生物传感器来说, 在光纤光栅表面上的标准生物功能层和受体层, 对吸附目标分析物非常重要。考虑到抗体与抗原之间的生化反应特征, 生物传感器对 AIV 分子的吸附特性满足 Langmuir 模型^[30], 即

$$\frac{C}{\Delta\lambda} = \frac{C}{\Delta\lambda_{max}} + \frac{1}{\Delta\lambda_{max}} \cdot K_d, \quad (5)$$

式中: C 为 AIV 抗原的浓度; $\Delta\lambda_{res}$ 为传感器检测过程中的谐振波长蓝移量最大值的绝对值; K_d 为传感器的解离系数, 表示对 AIV 生物分子的解离能力, 与表示对 AIV 生物分子结合能力的参数——亲和系数 K_a 呈倒数关系。此外, 在设计 and 表征生物传感器时, LOD 是分析其性能非常重要的参数。LOD 表示传感器在理想实验条件下能够检测的分析物浓度的假设最小值。根据生物传感器的校准曲线和国际纯化学与应用化学联合会 (IUPAC) 建议, LOD 定义为^[31]

$$x_{LOD} = f^{-1}(\bar{y}_{blank} + 3\sigma_{max}) \quad (6)$$

式中: \bar{y}_{blank} 为空白测量的平均值; σ_{max} 为空白测量的最大标准偏差。

3 材料和方法

3.1 生化样品及 EGO-AuNS 复合溶液制备

本实验所用化学试剂均为分析纯, 使用的工作液均通过灭菌的去离子水配制。GO 溶液 (浓度 2 mg/mL), 购自南京先丰纳米材料科技有限公司; AuNS 溶液 (浓度 0.75 mg/mL, 直径约为 150 nm, 金壳壁厚约为 5 nm, 内部材料为 SiO_2 , 吸收峰为 800~810 nm), 购自中科雷鸣 (北京) 科技有限公司; 3-氨丙基三乙氧基硅烷 (APTES, 纯度 99%)、N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS, 纯度 99%) 和 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺 (EDC, 纯度 99%) 均购自 Sigma-Aldrich 中国公司; 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) 和吐温 (Tween) 购自美国 GEN-View 公司;

4-吗啉乙烷-磺酸水合物 (MES, 0.1 mol/L, pH = 6.0) 缓冲液购自上海通用化学试剂厂。脱脂奶粉封闭液 (SMPSF) 由脱脂奶粉、Tween 和三乙醇胺缓冲盐水 (Tris buffered saline, TBS, 0.1 mol/L, pH = 7.4) 按一定比例混合而成, 用于对光栅表面 GO 羧基端进行封闭处理。AIV 单克隆抗体 (AIV monoclonal antibodies, AIV-MAbs, 浓度 2 mg/mL) 购自美国 Abcam 公司。H5 亚型 AIV 病毒株, 由南京农业大学动物医学院传染病组馈赠。禽流感 H5N1 弱毒株, 由重庆市疾病预防控制中心馈赠, 新城疫病毒 (NDV-AV29) 株, 购自中国兽医药品监察所。

室温下, 取 2 mg/mL 的 GO 分散液 30 mL 超声处理 30 min 后, 置于转速为 10000 r/min 的离心机中离心 20 min, 得到 1 mg/mL 的 GO 分散液; 接着, 取 0.75 mg/mL 的金纳米壳 (AuNS) 溶液 5 mL, 加入 1 mg/mL 的 GO 分散液使其充分混合后, 将混合溶液置于磁力搅拌器上搅拌 1 h; 最后, 将混合溶液置于转速为 15000 r/min 的离心机中离心 20 min 以形成 GO 包覆 AuNS (EGO-AuNS) 混合液。由于水溶性 AuNS 溶液中的金纳米壳表面带负电荷, 故金纳米壳与 GO 之间可通过静电结合的方式使得 GO 包覆在 AuNS 表面, 整个包覆原理过程如图 1 所示。

3.2 EGO-AuNS-LPFG 生物传感器制作

实验采用普通 LPFG, 其周期约为 568 μm , 栅区长度为 1 cm, 损耗峰强度约为 30 dB。首先, 使用质量分数为 5% 的稀 HNO_3 浸泡 LPFG 栅区 1 h, 去除光栅表面的灰尘及多余杂质, 再用去离子水 (DI 水) 和无水乙醇反复冲洗光栅表面后, 置于 60 $^\circ\text{C}$ 的对流烘干机中烘干 10 min, 保证光栅表面清洁干燥。之后, 取 8 mg/mL 的 NaOH 溶液 10 mL 浸泡光栅 3.5 h (40 $^\circ\text{C}$), 再于常温浸泡 30 min, 以激活 LPFG 表面的一OH 基团, 用超纯水反复冲洗光栅表面以去除多余杂质, 置于 50 $^\circ\text{C}$ 的对流烘干机中干燥 10 min。接着, 将羟基化的栅区浸没于 300 μL (避免涂覆层被浸泡) 体积分数为 5% 的 APTES 溶液浸泡 1 h 后, 使用超纯水冲洗光栅表面, 去除未结合的单体, 并在 70 $^\circ\text{C}$ 的烘箱中烘烤 30 min 以增强 APTES 单层的稳定性。取 500 μL 所制备的 EGO-AuNS 混合溶液在室温下浸泡光栅 12 h, AuNS 表面 GO 上的一COOH 基团与光栅表面的一NH₂ 基团通过共价键结合的方式牢固地连接在一起。待反应结束后用超纯水和无水乙醇反复冲洗其表面, 冲去未结合的 EGO-AuNS。将光栅放入 50 $^\circ\text{C}$ 对流烘干机中烘干 10 min 以确保 EGO-AuNS 涂层的稳

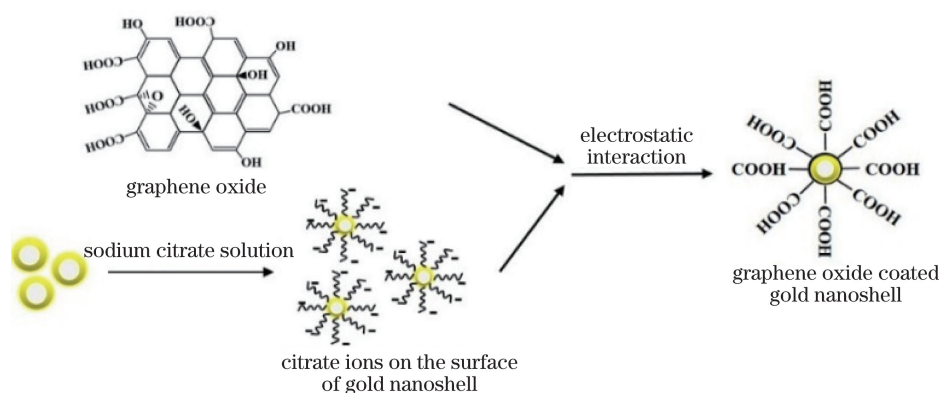


图1 GO包裹 AuNS 过程示意图

Fig. 1 Mechanism for encapsulation of graphene oxide with AuNS

定性,最终得到 EGO-AuNS-LPFG 传感器。

进一步,将 EDC(0.004 g)和 NHS(0.002 g)以 2:1 的质量比溶于 200 μL 的纯超水中,取 MES 缓冲液 300 μL 混合均匀,得到 EDC/NHS 活化剂;将 EGO-AuNS-LPFG 传感器浸入 300 μL 的 EDC/NHS 活化剂中 1 h 以活化其表面的一COOH 基团;然后,在室温下将 EGO-AuNS-LPFG 传感器置于 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 AIV-MAbs 溶液(300 μL)中反应

1 h,使 GO 上的一COOH 基团与 AIV-MAbs 上的氨基结合在光栅表面固定 AIV-MAbs。待反应结束后用 PBS 反复冲洗传感器以去除其表面未结合的 AIV-MAbs;最后,用配制好的 SMPSF 封闭液浸泡 EGO-AuNS-LPFG 传感器 1 h,以封闭光栅表面未被 AIV-MAbs 封闭的羧基位点。EGO-AuNS-LPFG 生物传感器的整个制备的表面化学反应过程如图 2 所示。

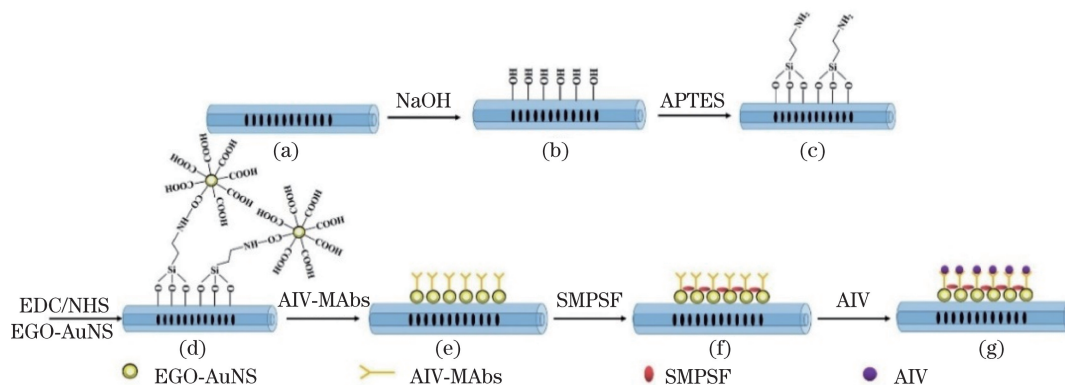


图2 EGO-AuNS-LPFG 免疫传感器制作过程。(a)表面预处理;(b)羟基化;(c)硅烷化;(d)修饰 EGO-AuNS;
(e)活化羧基基团;(f)传感器表面修饰 AIV-MAbs 及封闭多余结合位点;(g)AIV 抗原检测

Fig. 2 Fabrication of the EGO-AuNS-LPFG immunosensor. (a) Surface pre-treatment; (b) hydroxylation; (c) silylation;
(d) modification with EGO-AuNS; (e) activation of carboxyl group; (f) surface modification with AIV-MAbs and sealing of redundant binding sites; (g) detection for AIV antigens

3.3 实验系统

EGO-AuNS-LPFG 传感系统如图 3 所示。由光纤光栅解调系统(MOI-SM125, 波长分辨率 5 μm)的一个通道(CH1)发射扫频激光(1510 ~ 1590 nm, 频率 1 Hz),并将扫频激光入射到 SMF-28 继续传输至光纤隔离器,该隔离器用于防止后向散射和反射光对前向传输光的影响。EGO-AuNS-LPFG 传感器的两端水平固定在载玻片上,

中间可移动的载玻片用于替换不同浓度的被测液体。为防止外界空气、灰尘等杂质对生物环境的干扰,整个传感器用一个玻璃槽罩住。传感器表面的识别分子与待测目标生物分子发生的特异性结合反应改变了 LPFG 的某些光学特征,导致 LPFG 中前向传输包层模谐振峰发生变化。将光纤光栅解调系统的另一个通道(CH2)连接到计算机上实时显示谐振峰的变化,完成对待测生物溶液的检测。

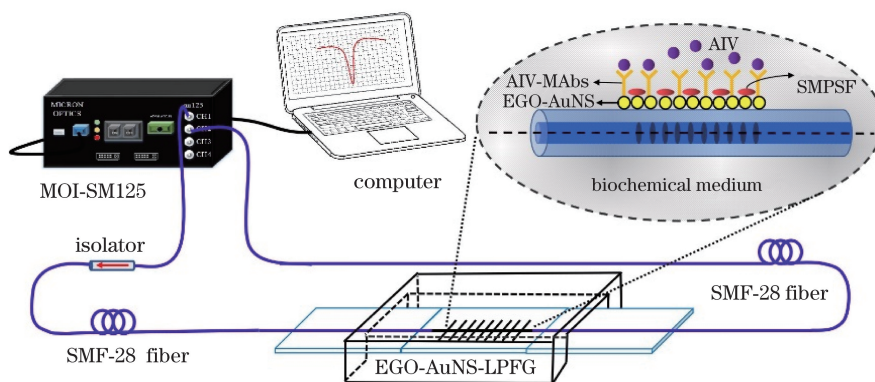


图 3 实验系统原理图

Fig. 3 Schematic diagram of the experimental system

4 结果与讨论

4.1 EGO-AuNS-LPFG 形貌表征及其光谱特性

利用场发射扫描电子显微镜 (FESEM, ZEISS SIGMA HD) 对 EGO-AuNS-LPFG 表面形貌进行表征, 结果如图 4 所示。由图可见, EGO-AuNS 复合材料较为均匀地分布在 LPFG 表面, 但存在有明显褶皱, 从热力学的角度而言, 褶皱的存在可降低 GO 材料的表面能, 从而维持 EGO-AuNS 复合材料附着在光栅表面的稳定性。而图 4(c) 也证明了 GO

通过静电结合的方式包覆在 AuNS 表面。图 5 为 EGO-AuNS 复合材料沉积在 LPFG 表面的能谱图, 其对应的光栅表面元素成分如表 1 所示。由表 1 可知, C、O、Si、Au 元素质量分数分别为 51.80%、32.21%、10.44% 和 5.55%, 其中 C 元素和部分 O 元素来自光纤表面 GO, Si 元素和部分 O 元素来自光纤 (SiO₂) 材料, Au 元素则是来自光纤表面的 AuNS。这些结果均为 LPFG 表面成功修饰 EGO-AuNS 复合材料提供了有利依据, 所使用的表面修饰方法能够有效地将 EGO-AuNS 固定于光栅表面。

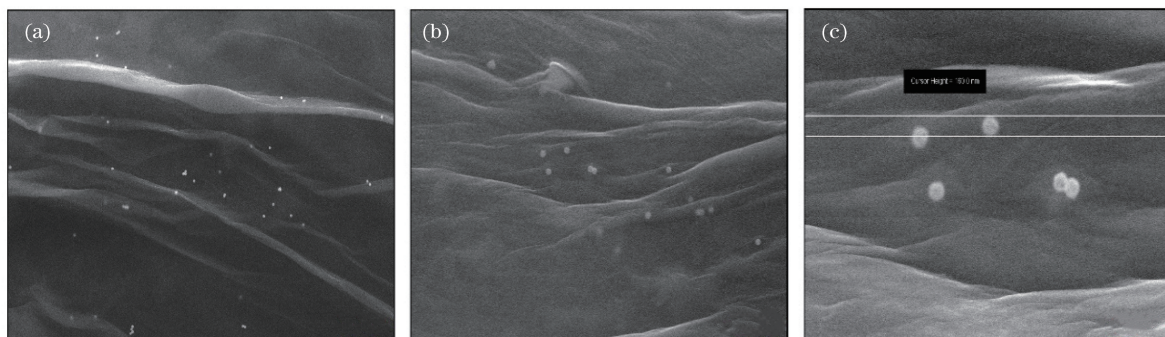


图 4 EGO-AuNS-LPFG 的 FESEM 图像。(a) 5000 \times ; (b) 10000 \times ; (c) 50000 \times

Fig. 4 FESEM graphs of the EGO-AuNS-LPFG images. (a) 5000 \times ; (b) 10000 \times ; (c) 50000 \times

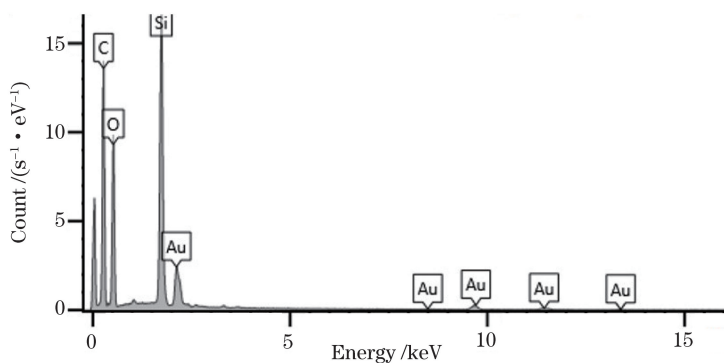


图 5 EGO-AuNS-LPFG 能谱图

Fig. 5 Energy spectrum of the EGO-AuNS-LPFG

表 1 EGO-AuNS-LPFG 表面元素成分

Table 1 Corresponding percentage content for the surface of the EGO-AuNS-LPFG %

Chemical element	Mass fraction	Atomic percentage
C	51.80	64.13
O	32.21	29.93
Si	10.44	5.52
Au	5.55	0.42
Amount	100.00	100.00

为研究 EGO-AuNS 复合材料对 LPFG 光谱的影响,图 6 分别给出了裸 LPFG 及 EGO-AuNS-LPFG 的 LP₀₇ 包层模光谱。由图 6 可知,LPFG 表面修饰 EGO-AuNS 复合材料后,其谐振波长位置较裸光栅发生红移,红移量约为 0.83 nm。同时, EGO-AuNS-LPFG 谐振峰的衰减幅度较未修饰复合材料时减小 14.26 dB 左右,这是由于 AuNS 可利用杂化效应调节金纳米壳的内径和外径的比率,从而改变局域表面等离子共振(LSPR)吸收峰的位置,使其有效共振吸收范围覆盖可见光和近红外区域(1600 nm)^[32],导致光栅谐振峰的衰减幅度减小。

4.2 EGO-AuNS-LPFG 折射率传感特性

为了比较 EGO-AuNS 复合材料修饰 LPFG 前后光栅传感器 RI 灵敏度的变化,使用图 3 所示实验系统,依次将质量分数为 0%~45% 的蔗糖溶液(对

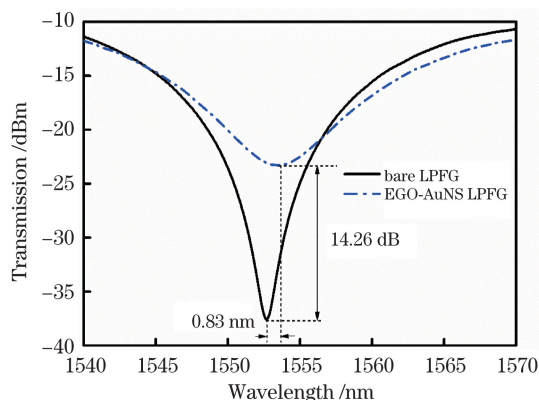


图 6 EGO-AuNS-LPFG 光谱

Fig. 6 Transmission spectrum of the EGO-AuNS-LPFG

应 RI 范围为 1.333~1.411)滴到中间载玻片上。为保证每次测量准确性,将传感器探头完全浸入测量溶液中,直到计算机显示出稳定的光谱为止,然后取出传感器探头并用无水乙醇和超纯水彻底冲洗并干燥。图 7(a)和(b)分别为 EGO-AuNS 复合材料修饰 LPFG 前后包层模 LP₀₇ 光谱随蔗糖溶液 RI 的变化关系。由图 7(b)可知,当 EGO-AuNS 复合材料沉积在 LPFG 表面后,其谐振波长随着蔗糖浓度的增加向短波长方向的漂移量更明显。这是由于 GO 增强了 AuNS 的 LSPR 效应,从而导致 LPFG 在 C~L 波段处对外界 RI 的变化更加敏感,谐振波长蓝移量越明显。

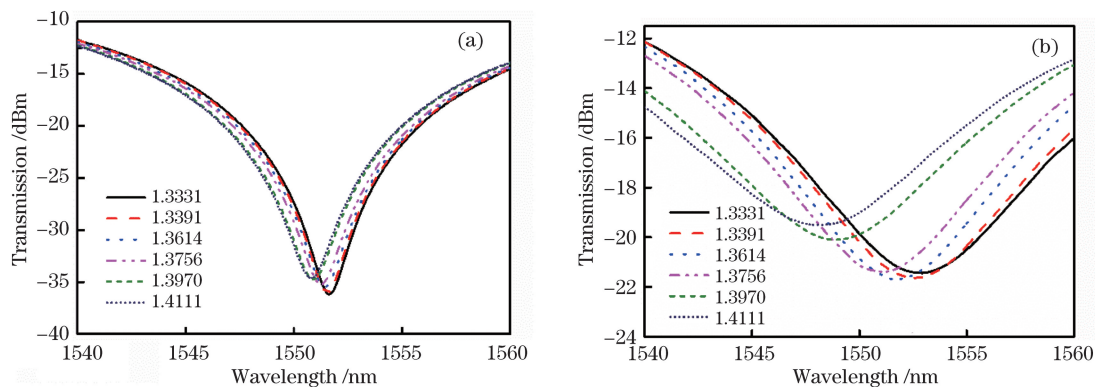


图 7 LPFG 修饰 EGO-AuNS 前后光谱随蔗糖溶液 RI 变化关系。(a)修饰前;(b)修饰后

Fig. 7 Transmission spectra of the bare LPFG and the EGO-AuNS coated LPFG immersed in different sucrose concentrations.

(a) Bare LPFG; (b) EGO-AuNS coated LPFG

图 8 给出了光栅表面修饰 EGO-AuNS 复合材料前后其谐振波长随 RI 变化关系。修饰 EGO-AuNS 复合材料后 LPFG 第 7 阶包层模对应谐振波长的蓝移量约为 -5.32 nm,在 RI 1.333~1.411 范围内,根据(3)式,其灵敏度约为 -66.60 nm/RIU,较裸 LPFG(未采用复合材料进行修饰)RI 灵敏度提高了约 6 倍;较在 LPFG 表面自组装 Au 颗粒构

成的 SPR 传感器 RI 灵敏度(23.45 nm/RIU)提高了约 3 倍^[33],也较 GO 修饰 LPFG 的平均 RI 灵敏度略高^[34]。因此,GO 和 AuNS 构成的复合材料为 LPFG 应用于生物传感领域提供了更加敏感材料。但更重要的是,在生物传感应用中,GO 的表面和边缘众多的含氧基团极大地增加了光栅表面与生物分子(本研究中为 AIV 单克隆抗体)的结合位点,为其

后续对特异性抗原的检测灵敏度的提高起到了关键性作用。

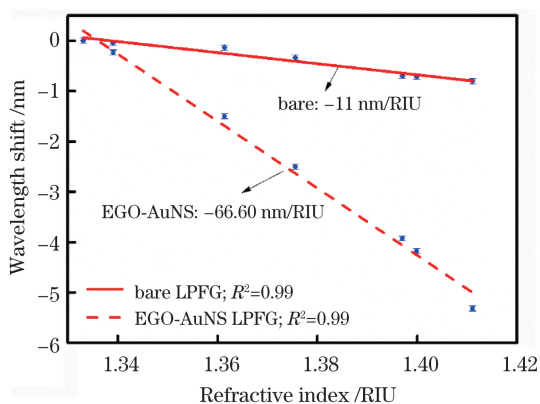


图 8 修饰 EGO-AuNS 前后 LPFG 的波长 RI 灵敏度变化
Fig. 8 Resonant wavelength of the bare LPFG and EGO-AuNS coated LPFG against RI of different sucrose solutions

4.3 EGO-AuNS-LPFG 生物传感器免疫测定

利用图 3 所示实验系统,使用所制备 EGO-AuNS-LPFG 生物传感器对不同浓度 AIV 抗原溶液(由 PBS 缓冲液配制,质量分数从 5 ng/mL 到 100 $\mu\text{g/mL}$)进行检测。1)用该生物传感器检测 PBS 缓冲液,记录对应谐振波长并作为参考波长。2)依次对不同浓度等级的 AIV 抗原溶液进行免疫

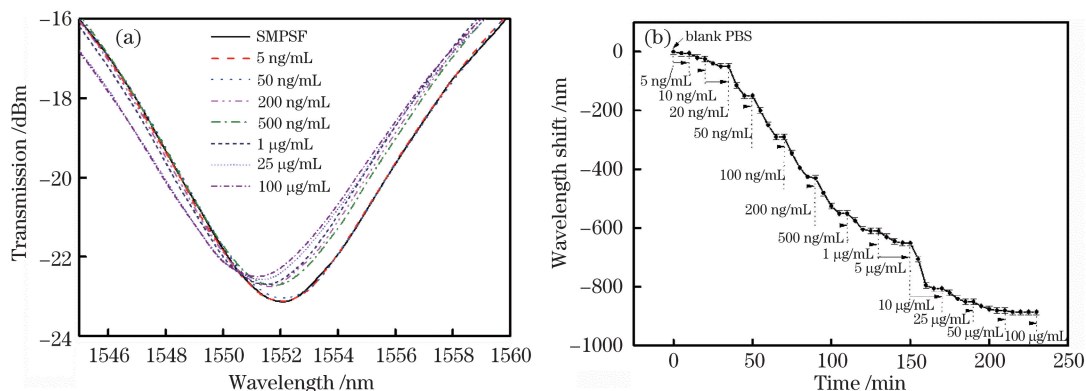


图 9 AIV 免疫检测过程中传感器光谱变化和相应谐振波长漂移量随时间的变化。(a)光谱变化;(b)相应谐振波长漂移量
Fig. 9 Spectral evolution and the corresponding wavelength shift of the immunosensor for AIV detection against time.

(a) Spectral evolution;(b)corresponding wavelength shift

图 10 给出图 9(a)中传感器的谐振波长蓝移量的绝对值与 AIV 抗原溶液浓度之间的关系。根据图 10 并结合(6)式计算,可得该 AIV 生物传感器的 LOD 约为 8 ng/mL,较基于 GO-eLPFG 的 AIV 免疫传感器 LOD(40 ng/mL)降低了约 5 倍^[24],与 DeLisa 等^[6]利用未修饰 GO 的裸 LPFG 生物传感器对人 IgG 的 LOD(2 $\mu\text{g/mL}$)降低了约 250 倍,与目前临床上广泛应用的 AIV 胶体金诊断试纸的

检测,通过光纤光栅解调仪监测整个免疫反应的动态过程。图 9(a)和(b)分别为 EGO-AuNS-LPFG 传感器光谱随浓度等级响应和整个过程谐振波长蓝移量随时间变化关系。由图 9 可知,当 AIV 抗原溶液的质量浓度从 5 ng/mL 增大至 100 $\mu\text{g/mL}$ 和从 5 ng/mL 增大至 50 $\mu\text{g/mL}$ 时,谐振波长的总蓝移量分别为 885 pm 和 880 pm;且当 AIV 抗原溶液的质量浓度从 5 ng/mL 增大至 25 $\mu\text{g/mL}$ 时,其谐振波长的总蓝移量为 850 pm,故当 AIV 抗原溶液的浓度在 50 $\mu\text{g/mL}$ 附近该生物传感器的谐振波长蓝移量趋于饱和,表明该 AIV 生物传感器表面的 AIV-MAbs 的结合位点与所检测的 AIV 抗原完全结合。由此可知,该 EGO-AuNS-LPFG 生物传感器对 AIV 检测范围为 5 ng/mL~50 $\mu\text{g/mL}$ 。与 GO-eLPFG 的 AIV 生物传感器相比^[22],检测范围有所减小,这可能是由于该过程中 GO 表面的羧基基团一部分与光纤上的羟基相结合,另一部分与硅烷偶联剂(APTES)相结合,同时还有一部分羧基基团被包裹在 AuNS 表面未能参与表面修饰所致。整个 AIV 免疫检测过程中,仅需 10~20 min 便可以检测出每个浓度等级的 AIV 抗原溶液,即该生物传感器对 AIV 的光谱响应就能达到稳定状态,由此表明该生物传感器具有对 AIV 快速检测的能力。

LOD(1.7 $\mu\text{g/mL}$)^[35]相比降低了约 212.5 倍,这说明该 AIV 生物免疫传感器满足 AIV 的临床检测需求。此外,根据图 10 拟合结果和(5)式计算,得到该 EGO-AuNS-LPFG 传感器对 AIV 抗原分子的解离系数约为 3.49×10^{-9} mol/L,因此该免疫传感器对 AIV 抗原分子具有较好的亲和力。同时,从图 10 中的插图可知,在质量浓度为 0~100 ng/mL 的范围内,该 AIV 生物传感器谐振波长蓝移量的绝对值

与 AIV 生物分子浓度之间的线性度良好,该 AIV 生物传感器的灵敏度为 $2946.25 \text{ pm}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$,该值约是基于 GO 涂覆包层腐蚀型普通 LPFG 的 AIV 免疫传感器^[24]灵敏度的 7.3 倍。

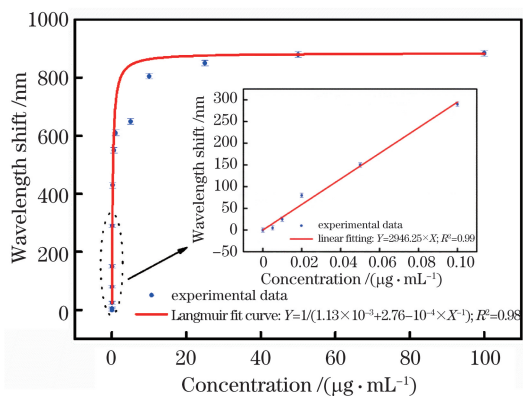


图 10 波长漂移量绝对值与抗原浓度关系拟合曲线 (插图为低浓度线性拟合区)

Fig. 10 Wavelength shift of the GO-AuNS-LPFG immunosensor for different AIV concentration levels (Inset corresponds to the linear fitting area)

4.4 EGO-AuNS-LPFG 免疫传感器的特异性及临床性试验

为评估该 EGO-AuNS-LPFG 免疫传感器的特异性和临床性,使用质量浓度为 5% 的 HF 溶液对传感器轻微腐蚀以去除传感器表面所有涂覆层,对光栅再次使用前述相同方法进行表面修饰,重新将 AIV-MAbs 生物分子固定于传感器表面,并封闭多余位点。首先,将该重新制备的 AIV 免疫传感器分别对不含 AIV 的尿囊液(AIV 空白尿囊液,Blank-AIV Allantoic Fluid)和新城疫病毒原液(NDV 尿囊液,NDV Allantoic Fluid)进行检测。每次检测反应 20 min,之后使用 PBS 和去离子水冲洗传感器表面多次,并记录传感器在 PBS 环境下的光谱。由于尿囊液中含有许多其他生物分子杂质(如:杂蛋白、生物盐及细胞等),但不含 AIV 抗原分子,因此,这两个检测步骤能够实现该传感器对 AIV 抗原结合的特异性检测。结果表明,该免疫传感器在检测过程中谐振波长较参考谐振波长基本保持不变,说明其对 AIV 空白尿囊液和 NDV 尿囊液没有任何特异性结合的能力。

接着,使用该免疫传感器依次检测浓度等级分别为 5, 10, 500, 50, 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的通过病毒扩增的 AIV 病毒原液(即, AIV 尿囊液, AIV Allantoic Fluid),检测方法同上。以上整个检测过程中传感器谐振的波长变化如图 11 所示,可见,当 AIV 抗原

溶液由 5 ng/mL 增加到 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,传感器的谐振波长总漂移量约为 740 pm,小于在第一次 AIV 高纯度抗原检测过程中谐振波长总漂移量(约 880 pm)。这个差异是因为第一次检测用的 AIV 是经纯化后的高浓度抗原蛋白,而第二次检测为了符合临床环境,使用的尿囊液里含有整个 AIV 病毒。需要注意的是,基于通过 HF 轻微腐蚀并重新固定的 AIV-MAbs 进行 AIV 临床测试,不仅验证了该 AIV 生物传感器良好的特异性和临床性,同时也较好地重现了第一次的实验效果。

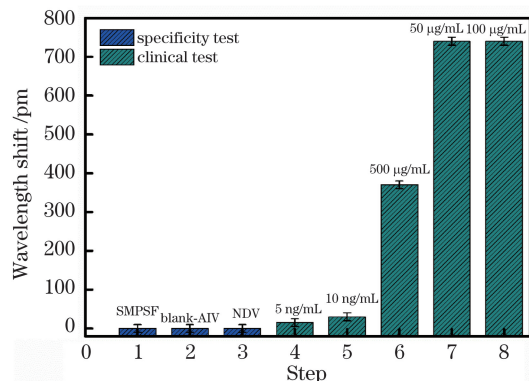


图 11 EGO-AuNS-LPFG 免疫传感器对 AIV 的特异性和临床性测试过程的谐振波长变化

Fig. 11 Wavelength shift for specificity and clinical assays of the EGO-AuNS-LPFG immunosensor

5 结 论

结合 GO 及金纳米壳优异光学特性,提出一种 EGO-AuNS 复合材料修饰普通 LPFG 用于 AIV 检测的新型免疫传感器。实验结果表明,EGO-AuNS-LPFG 传感器在 1.333~1.411 的 RI 范围内灵敏度约为 $-66 \text{ nm}/\text{RIU}$,较裸 LPFG 的 RI 灵敏度提高了约 6 倍;通过对不同浓度梯度 AIV 抗原溶液检测,表明该免疫传感器检测极限约为 8 ng/mL ,检测饱和点约为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$;在 0~100 ng/mL 范围内,具有较好的线性相关度,灵敏度约为 $2946.25 \text{ pm}/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$,约为基于 GO 涂覆包层腐蚀型普通 LPFG 的 AIV 免疫传感器灵敏度的 7.3 倍。最后,通过对几种尿囊液的对照检测实验,表明该免疫传感器具有良好的特异性和临床性。同时,该无标记生物传感器还具有快速检测的优点,在生物医学领域有较大应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Huang X C, Wu X W, Gao S C, et al. Response characteristic of twisting second-azimuthal-order few-

- mode long-period fiber grating[J]. Chinese Journal of Lasers, 2019, 46(12): 1206001.
- 黄新成, 吴小文, 高社成, 等. 角向二阶少模长周期光纤光栅的扭转响应特性[J]. 中国激光, 2019, 46(12): 1206001.
- [2] Srinivasan R, Umesh S, Murali S, et al. Bare fiber Bragg grating immunosensor for real-time detection of *Escherichia coli* bacteria[J]. Journal of Biophotonics, 2017, 10(2): 224-230.
- [3] Sridevi S, Vasu K S, Asokan S, et al. Sensitive detection of C-reactive protein using optical fiber Bragg gratings [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2015, 65: 251-256.
- [4] Pilla P, Sandomenico A, Malachovská V, et al. A protein-based biointerfacing route toward label-free immunoassays with long period gratings in transition mode[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2012, 31(1): 486-491.
- [5] Sun D D, Guo T, Ran Y, et al. *In-situ* DNA hybridization detection with a reflective microfiber grating biosensor[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 61: 541-546.
- [6] DeLisa M P, Zhang Z, Shiloach M, et al. Evanescent wave long-period fiber Bragg grating as an immobilized antibody biosensor[J]. Analytical Chemistry, 2000, 72(13): 2895-2900.
- [7] Chiavaioli F, Biswas P, Trono C, et al. Sol-gel-based titania-silica thin film overlay for long period fiber grating-based biosensors [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(24): 12024-12031.
- [8] Chiavaioli F, Biswas P, Trono C, et al. Towards sensitive label-free immunosensing by means of turn-around point long period fiber gratings[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2014, 60: 305-310.
- [9] Qi Y F, Jia C, Liu L, et al. Biosensing properties of nanofilm-modified long-period fiber gratings[J]. Acta Optica Sinica, 2018, 38(10): 1006005.
- 齐跃峰, 贾翠, 刘磊, 等. 纳米膜修饰长周期光纤光栅生物传感特性研究[J]. 光学学报, 2018, 38(10): 1006005.
- [10] He Z H, Tian F, Zhu Y N, et al. Long-period gratings in photonic crystal fiber as an optofluidic label-free biosensor [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2011, 26(12): 4774-4778.
- [11] Malachovská V, Ribaut C, Voisin V, et al. Fiber-optic SPR immunosensors tailored to target epithelial cells through membrane receptors [J]. Analytical Chemistry, 2015, 87(12): 5957-5965.
- [12] Luo B B, Xu Y F, Wu S X, et al. A novel immunosensor based on excessively tilted fiber grating coated with gold nanospheres improves the detection limit of Newcastle disease virus[J]. Biosensors and Bioelectronics, 2018, 100: 169-175.
- [13] Luo B B, Wu S X, Wang L L, et al. Newcastle disease virus immunosensor based on 81° tilted fiber grating [J]. Acta Optica Sinica, 2017, 37(11): 1106001.
- 罗彬彬, 吴胜昔, 王玲玲, 等. 基于 81° 倾斜光纤光栅的新城疫病毒免疫传感器[J]. 光学学报, 2017, 37(11): 1106001.
- [14] 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.
- [15] Novoselov K S, Geim A K, Morozov S V, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films [J]. Science, 2004, 306: 666-669.
- [16] Wang L, Xiong Q R, Xiao F, et al. 2D nanomaterials based electrochemical biosensors for cancer diagnosis [J]. Biosensors and Bioelectronics, 2017, 89: 136-151.
- [17] Zhang J, Sun Y, Wu Q, et al. Preparation of graphene oxide-based surface plasmon resonance biosensor with Au bipyramid nanoparticles as sensitivity enhancer [J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2014, 116: 211-218.
- [18] Xu B, Huang J, Ding L Y, et al. Graphene oxide-functionalized long period fiber grating for ultrafast label-free glucose biosensor[J]. Materials Science and Engineering: C, 2020, 107: 110329.
- [19] Liu C, Xu B J, Zhou L, et al. Graphene oxide functionalized long period fiber grating for highly sensitive hemoglobin detection[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 261: 91-96.
- [20] Esposito F, Sansone L, Taddei C, et al. Ultrasensitive biosensor based on long period grating coated with polycarbonate-graphene oxide multilayer[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2018, 274: 517-526.
- [21] Cheng J, Su X O, Wang S, et al. Highly sensitive detection of clenbuterol in animal urine using immunomagnetic bead treatment and surface-enhanced Raman spectroscopy[J]. Scientific Reports, 2016, 6: 32637.
- [22] Feng D X, Li L H, Han X W, et al. Simultaneous electrochemical detection of multiple tumor markers using functionalized graphene nanocomposites as non-enzymatic labels[J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2014, 201: 360-368.
- [23] Li Q, Wang Q, Yang X H, et al. High sensitivity surface plasmon resonance biosensor for detection of microRNA and small molecule based on graphene oxide-gold nanoparticles composites [J]. Talanta,

- 2017, 174: 521-526.
- [24] Shi S H, Wang X, Luo B B, et al. Avian influenza virus immunosensor based on etched long period fiber grating coated with graphene oxide [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2020, 49(1): 0106002.
石胜辉, 王鑫, 罗彬彬, 等. 氧化石墨烯修饰腐蚀型长周期光纤光栅的禽流感病毒免疫传感器 [J]. *光子学报*, 2020, 49(1): 0106002.
- [25] Vengsarkar A M, Lemaire P J, Judkins J B, et al. Long-period fiber gratings as band-rejection filters [J]. *Journal of Lightwave Technology*, 1996, 14(1): 58-65.
- [26] Simões E, Abe I, Oliveira J, et al. Characterization of optical fiber long period grating refractometer with nanocoating [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 153(2): 335-339.
- [27] del Villar I, Matías I R, Arregui F J, et al. Optimization of sensitivity in long period fiber gratings with overlay deposition [J]. *Optics Express*, 2005, 13(1): 56-69.
- [28] Bandyopadhyay S, Biswas P, Chiavaioli F, et al. Long-period fiber grating: a specific design for biosensing applications [J]. *Applied Optics*, 2017, 56(35): 9846-9853.
- [29] Bandyopadhyay S, Shao L Y, Wang C, et al. Study on optimization of nano-coatings for ultra-sensitive biosensors based on long-period fiber grating [J]. *Sensing and Bio-Sensing Research*, 2020, 27: 100320.
- [30] 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.
- [31] Socorro-Leránoz A B, Santano D, del Villar I, et al. Trends in the design of wavelength-based optical fibre biosensors (2008—2018) [J]. *Biosensors and Bioelectronics*: X, 2019, 1: 100015.
- [32] Tam F, Moran C, Halas N. Geometrical parameters controlling sensitivity of nanoshell plasmon resonances to changes in dielectric environment [J]. *The Journal of Physical Chemistry B*, 2004, 108(45): 17290-17294.
- [33] Tang J L, Cheng S F, Hsu W T, et al. Fiber-optic biochemical sensing with a colloidal gold-modified long period fiber grating [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2006, 119(1): 105-109.
- [34] Shi S H, Wang X, Zhao M F, et al. Sensing characteristics of long period fiber grating functionalized with graphite oxide [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2019, 27(11): 2305-2314.
石胜辉, 王鑫, 赵明富, 等. 基于氧化石墨烯修饰长周期光纤光栅的传感特性 [J]. *光学精密工程*, 2019, 27(11): 2305-2314.
- [35] Li B B, Xue Q, Li J F, et al. Development of a complex gold-immunochromatography test strip for Newcastle disease virus and avian influenza virus [J]. *Animal Husbandry & Veterinary Medicine*, 2009, 41(8): 33-37.
李蓓蓓, 薛强, 李锦丰, 等. 新城疫病毒和禽流感病毒复合型胶体金免疫层析试纸条的制备 [J]. *畜牧与兽医*, 2009, 41(8): 33-37.