

基于双通道探针式 81° 倾斜光纤光栅的 甲胎蛋白免疫检测

吕清明¹, 罗彬彬^{1*}, 杨琪¹, 张杨¹, 吴胜昔², 谷志鹏², 石胜辉¹, 吴德操¹, 巫涛江³, 赵明富¹

¹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;

²重庆理工大学药物化学与分子药理学重庆市重点实验室, 重庆 400054;

³重庆能源职业学院, 重庆 402247

摘要 提出了一种双通道探针式 81° 倾斜光纤光栅(81°TFG)传感器,并将其用于甲胎蛋白(AFP)的免疫检测研究。首先,在 81°TFG 端面镀银膜形成反射式 81°TFG,构建由 2×2 耦合器和两支 81°TFG 探针组成的双通道传感器。然后,在栅区表面修饰大尺寸 AuNs 粒子和 GO,并以 AFP 单克隆抗体为特异性识别单元修饰栅区表面,实现基于双通道探针式 81°TFG 局域表面等离子体共振(LSPR)的 AFP 免疫传感器。最后,在复杂血清环境下完成免疫检测实验,结果表明,该传感器对 AFP 抗原质量浓度的检测极限在 1~10 pg/mL 之间,检测的饱和点约为 200 ng/mL,灵敏度约为 0.155 nm/log(mg/mL),对肝癌患者的血清具有良好的特异性响应。相比单通道透射式 81°TFG 传感器,该传感器能实现对目标分子阳性和阴性样本的同时对照检测,从而增强临床检测应用中的可靠性,且操作更简便、应用潜力更大。

关键词 光纤光学; 双通道探针式 81° 倾斜光纤光栅; 局域表面等离子体共振; 免疫传感器; 甲胎蛋白

中图分类号 TN253

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202141.0706004

Immunodetection of Alpha-Fetoprotein Based on Dual-Channel Probe Type 81° Tilted Fiber Grating

Lü Qingming¹, Luo Binbin^{1*}, Yang Qi¹, Zhang Yang¹, Wu Shengxi², Gu Zhipeng²,
Shi Shenghui¹, Wu Decao¹, Wu Taojiang³, Zhao Mingfu¹

¹Chongqing Key Laboratory of Optical Fiber Sensor and Photoelectric Detection,
Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

²Chongqing Key Laboratory of Medicinal Chemistry and Molecular Pharmacology,
Chongqing University of Technology, Chongqing 400054, China;

³Chongqing Energy College, Chongqing 402247, China

Abstract In this study, a dual-channel probe type 81° tilted fiber grating (81°TFG) sensor is proposed and used for the evaluation of alpha-fetoprotein (AFP) immunoassays. First, the end face of 81°TFG is plated with a silver film to form the reflective type 81°TFG, and a dual-channel sensor is constructed by a 2×2 coupler and two 81°TFG probes. Then, large-size AuNs and GO are modified on the grating surface, and AFP monoclonal antibodies are used as the specific recognition unit to modify the grating surface to achieve a dual-channel probe type 81°TFG local surface plasmon resonance (LSPR) AFP immunosensor. Finally, the immune detection experiment is completed in a complex serum environment. The results demonstrated that the detection limit of the sensor for the mass

收稿日期: 2020-09-27; 修回日期: 2020-11-10; 录用日期: 2020-11-23

基金项目: 国家自然科学基金(61875026)、重庆市教委科技项目(KJZD-K201901101, KJQN20181121)、重庆市自然科学基金(cstc2019jcyj-msxmX0093)、重庆理工大学研究生创新项目(ycx20192049, clgyx20202039)

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

concentration of AFP antigen is within the range of 1–10 pg/mL, the detection saturation point and sensitivity are ~200 ng/mL and ~0.155 nm/log(mg/mL), respectively, it has a satisfactory specific response to the serum of liver cancer patients is observed. Compared with the single-channel transmission type 81°TFG sensor, the sensor could simultaneously control the detection of positive and negative samples of the target molecules; therefore, enhancing the reliability in clinical detection applications, and the operation is simpler and the application potential is greater.

Key words fiber optics; dual-channels probe type 81° tilted fiber grating; local surface plasmon resonance; immunosensor; alpha-fetoprotein

OCIS codes 060.2370; 060.3735; 280.1415

1 引言

甲胎蛋白(AFP)是与肝癌肿瘤相关的胚胎特异-球蛋白,也是临床上检测肝癌肿瘤的标志物^[1],其分子量约为 70 kDa。当患者的肝脏细胞受到刺激或患有乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒引起的肝硬化及肝细胞癌时,其肝脏细胞可重新获得合成 AFP 的能力,导致体内 AFP 呈现高表达,因此,AFP 被广泛应用于原发性肝癌的早期筛查、诊断以及复发监控、预后检测^[2-4]。目前,血清标志物检测方法主要包括酶联免疫吸附测定(ELISA)法与化学发光免疫分析法^[5]、免疫胶体金技术^[6]、蛋白质芯片法^[7]等。但这些纯粹的生化方法存在步骤繁琐、检测灵敏度不高、仪器设备昂贵等缺点,因此探索高效、可靠、低成本的检测技术对于肝癌的早期诊断、复发监控具有重要意义。

光纤生物传感器具有微尺寸、免标记及抗电磁干扰等优点^[8-12],可与各种纳米粒子材料结合构成极高灵敏度的光纤局域表面等离子体共振(LSPR)传感器^[13-14],也可集成二维材料如 GO 构成生物亲和性能良好的传感器^[15-17],因此,各种集成 GO 的光纤 LSPR 传感器得到了人们的广泛关注。其中,Zhou 等^[18]提出的 81°倾斜光纤光栅(81°TFG)是一种极大角度倾斜光纤光栅,具有高折射率(RI)灵敏度和极低温度交叉敏感性^[19-20],可用于制作扭矩^[21]、振动^[22]、pH 值^[23]、液位^[24]及生物标记物^[25]等传感器。本课题组研究了用于检测细胞程序性死亡-配体 1(PD-L1)的大尺度 AuNs 修饰极大倾角光纤光栅构成的 LSPR 传感器^[26]、用于检测牛血清白蛋白(BSA)的 GO 修饰包层腐蚀型 81°TFG^[27]等单通道透射型生物传感器。由于待测目标参量种类和特性的多样化,单通道透射式传感器已无法满足实际检测的需要。

本文提出了一种基于双通道探针式 81°TFG-LSPR 原理的 AFP 免疫传感器,首先,用两个传感通道同时修饰 AFP 单克隆抗体(AFP MAbs)并将

其作为目标分子识别单元;然后,用通道 1 和通道 2 分别对相同质量浓度的 BSA 溶液和标准 AFP 抗原溶液进行检测,一次性完成传感器的特异性对照实验;最后,同时用两个传感通道分别对健康人体血清和肝癌患者血清进行免疫分析,以评估该双通道传感器的临床应用潜力。

2 基本原理和特性

2.1 探针式 81°TFG 的原理及特性

一般而言,极大倾角光纤光栅的角度为 78°~83°,该范围内传感器的 RI 灵敏度和温度灵敏度受包层模谐振阶数的影响较大,受其倾斜角度的影响较小。为了保证光栅高阶包层模谐振出现在常用的通信波段(C-L 波段),同时能保证获得较高的 RI 灵敏度,倾斜角度通常为 81°、光栅周期约为 32 μm,此时光栅在 C-L 波段对应的高阶包层模阶数为 32 阶^[19]。81°倾斜条纹极大增强了光纤的双折射效应,体现出比小角度 TFG 更强的偏振相关性,原因是同一个高阶包层模存在横磁模(TM 模)、横电模(TE 模)简并模^[28],其纤芯基模与同向包层模之间的相位匹配条件可表示为^[29]

$$\lambda = (n_{co}^{eff} - n_{cl,m}^{i,eff}) \frac{\Delta_G(T, \epsilon)}{\cos \theta}, \quad (1)$$

式中, λ 为包层模的谐振波长, n_{co}^{eff} 为纤芯基模的有效 RI, $n_{cl,m}^{i,eff}$ 为第 m 阶包层模式的有效 RI, i 为 TE 模或 TM 模中的一种, Δ_G 为光栅的正常周期, θ 为光栅的倾斜角度, n_{co}^{eff} 、 $n_{cl,m}^{i,eff}$ 和 Δ_G 为温度 T 与应变 ϵ 的函数, $n_{cl,m}^{i,eff}$ 也是外部 RI n_{SRI} 的函数。

探针式 81°TFG 末端的端面镀有高反射率银膜,大角度倾斜条纹将部分入射线偏振光从纤芯基模耦合到高阶包层模,包层模的光被端面银膜反射。根据光路可逆原理可知,其中一部分光被 81°TFG 从包层耦合到纤芯中反向传播,如图 1(a)所示。由于探针式 81°TFG 是在 81°TFG 栅区端面镀银膜制成的反射型传感器,端面的银膜对光能量的反射率不能达到 100%,且光在包层中的传输损耗较大,导

致反射回来的包层模能量损耗较多,其谐振峰相对于透射式 81°TFG 的谐振峰整体下移。但两者的偏振相关特性相似,可通过控制线偏振光的偏振方向完全激发 TM 模、TE 模或同时激发两个简并模,透射式 81°TFG 和探针式 81°TFG 在 C-L 波段的偏

振相关光谱分别如图 1(b)、图 1(c)所示。由于探针式 81°TFG 感知外部环境的光程是透射式 81°TFG 的两倍,理论上探针式 81°TFG 比透射式 81°TFG 对外界参数特别是环境 RI 的变化更敏感,灵敏度更高。

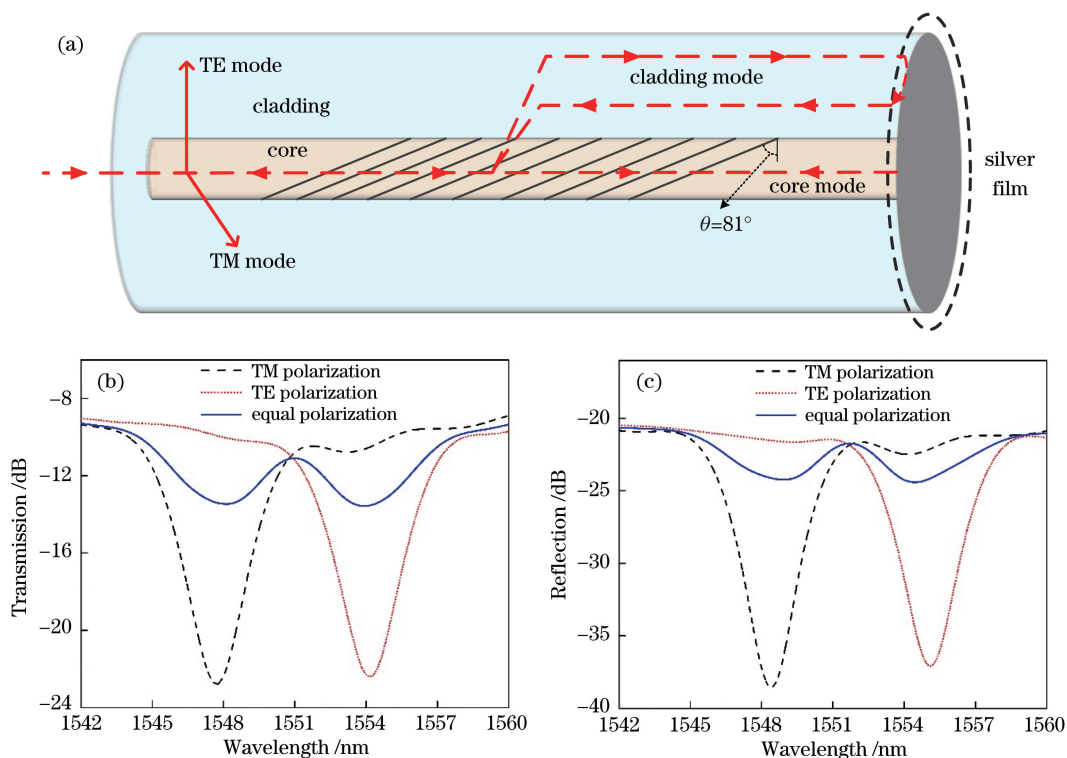


图 1 TFG 的偏振相关光谱。(a) 探针式 81°TFG 的光路耦合原理;(b) 透射式 81°TFG;
(c) 探针式 81°TFG

Fig. 1 Polarization correlation spectrum of the TFG. (a) Optical path coupling principle of probe type 81°TFG;
(b) transmission type 81°TFG; (c) probe type 81°TFG

2.2 双通道探针式 81°TFG 传感器系统

双通道探针式 81°TFG 传感器系统的结构如图 2 所示,主要由宽带光源、隔离器(isolator)、起偏器(polarizer)、偏振控制器(PC)、2×2 光耦合器(分光比为 1:1)、两支探针式 81°TFG 传感器、光谱分析仪组成,其中,SMF 为单模光纤。由宽带光源(ASE,工作波长为 1250~1650 nm)发出的宽带光,

经隔离器、起偏器通过 2×2 耦合器的两个端口分别输入两个 PC,每个 PC 独立控制一支 81°TFG 探针的偏振态,使两支 81°TFG 探针同时完全工作在 TM 模状态,两支 81°TFG 探针末端处的银膜将包层和纤芯的光反射,包层内的反射光经过栅区再次耦合进纤芯,与纤芯的反射光一同经过 2×2 光耦合器的另一个端口输入光谱分析仪(AQ637D,工作波

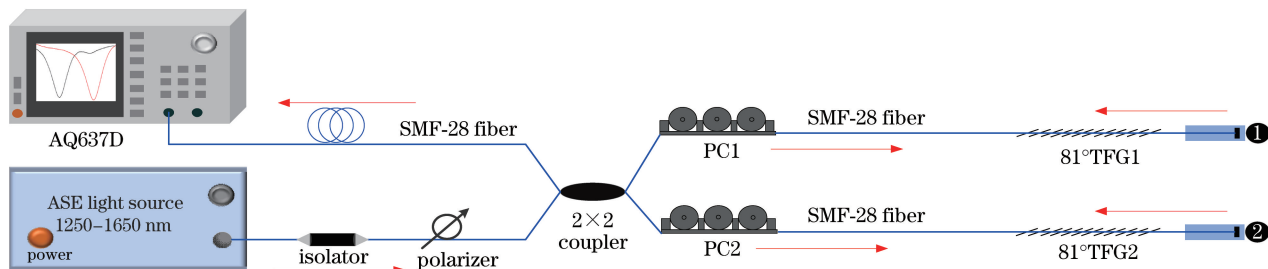


图 2 实验系统的原理图

Fig. 2 Schematic diagram of the experimental system

长为 600~1700 nm,分辨率为 0.03 nm),构成双通道传感器。其中,隔离器的作用是防止后向散射和反射光对前向传输光的影响,起偏器的作用是产生线偏振光,通过 PC 控制其偏振态。

2.3 双通道探针式 81°TFG 的制作与特性分析

选取两支 81°TFG,其周期约为 32 μm ,栅区长度约为 1.2 cm。首先用光纤切割刀在距离 81°TFG 栅区末端 1 cm 处切割出平整的端面,然后在探针末端端面镀一层银膜,形成反射镜结构,以减少反射光谱的损耗,保证传感器的光谱稳定性。采用还原法在端面镀银膜,具体操作:首先取 640 μL 新制备的硝酸银溶液和 440 μL 氢氧化钾溶液在试管中摇匀混合,产生棕色沉淀;然后加入少量氨水并搅拌致沉淀溶解,产生银氨离子 $[\text{Ag}(\text{NH}_3)_2]^+$,并加入 64 μL 右旋葡萄糖溶液;最后将两支 81°TFG 端面插入试管,浸没在溶液中,并将试管放置在 50~70 $^\circ\text{C}$ 水浴加热 40 s,取出光栅并在空气中干燥后,可在 81°TFG 末

端的端面沉积一层银膜制成探针式结构 81°TFG。

采用独立的 PC 使两支 81°TFG 探针同时完全激发为 TM 模式。首先,将探针式 81°TFG2 的栅区置于 RI 为 1.3749 的 NaCl 溶液中,将探针式 81°TFG1 栅区依次置于 RI 为 1.3331~1.3794 的 NaCl 溶液中进行 RI 灵敏度标定;然后,采用相同的方法对探针式 81°TFG2 进行 RI 灵敏度标定。图 3(a)和图 3(b)分别为探针式 81°TFG1 和探针式 81°TFG2 栅区置于不同 RI NaCl 溶液的光谱变化情况。可以发现,固定双通道传感器的一个通道,将另一个通道置于不同 RI 溶液中时,固定通道的光谱几乎不受另一个通道 RI 变化的影响,而置于不同 RI 溶液的通道对应的光谱会随外界环境 RI 的变化而变化,两个通道相互独立且几乎不相互影响,这验证了双通道探针式 81°TFG 生物传感器的可行性,在其表面修饰不同生物分子识别单元时,该传感器具有同时检测两种不同目标生物分子的能力。

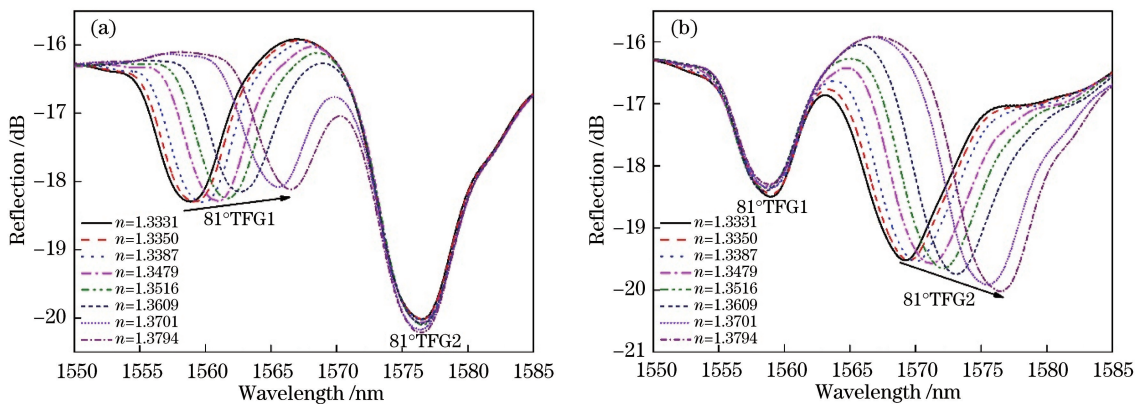


图 3 双通道探针式 81°TFG 传感器的 RI 灵敏度标定。(a) 探针式 81°TFG1; (b) 探针式 81°TFG2

Fig. 3 RI sensitivity calibration of the dual-channel probe type 81°TFG sensor. (a) Probe type 81°TFG1; (b) probe type 81°TFG2

2.4 双通道探针式 81°TFG-LSPR 免疫传感器的制作

大尺度 AuNs 由金壳包裹的球型二氧化硅(直径约为 160 nm,吸收峰约为 820 nm)组成,其 LSPR 有效共振吸收范围覆盖可见光到近红外波段(400~1600 nm)^[30],覆盖了 81°TFG 在 C-L 波段的谐振峰。但金具有的疏水性,限制了其在生物传感应用中对生物蛋白分子的吸附能力。而 GO 富含各种含氧基团,具有远高于其他纳米粒子载体的固载率和亲水性,容易通过共价偶联方式与蛋白质结合^[31]。因此,实验中的免疫传感器用大尺寸 AuNs 作为 LSPR 的载体,用 GO 改善 81°TFG-LSPR 传感器的疏水特性,以增强传感器对生物分子蛋白的吸附能力。

单个探针式 81°TFG-LSPR 传感器的制作与文

献[26]中的方法一致,其表面的生物功能化采用 AFP MAbs,整个免疫传感器表面的修饰过程如图 4 所示。具体步骤:1)用 1000 μL 质量浓度为 8 mg/mL 的 NaOH 溶液激活光纤表面的羟基(—OH),羟基化的栅区浸没在硅烷偶联剂 MPTMS 溶液(100 μL 的 MPTMS 与 9900 μL 的冰乙酸配制,体积分数为 1%),在 65 $^\circ\text{C}$ 环境下静置 8 min,在光纤表面引入巯基(—SH);2)将离心处理后的大尺寸 AuNs 修饰于光栅表面,避光反应 8 h, AuNs 以共价键方式结合到光栅表面,制成 81°TFG-LSPR 传感器;3)用 GO 分散液(质量浓度为 2 mg/mL,400 μL)孵化 81°TFG-LSPR 传感器 6 h,在光栅表面沉积 GO 膜;4)用 1-(3-二甲氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺盐酸盐(EDC)/N-羟基琥珀酰亚胺

(NHS)配置的溶液活化 GO 表面的羧基(—COOH);
5)将两根处理好的光栅浸入 200 μL 的 AFP MAbs 溶液(100 μL 质量浓度为 1.6 mg/mL 的 AFP MAbs 和 100 μL 质量浓度为 0.8 mg/mL 的 PBS)孵化 1 h,使 AFP MAbs 通过共价键结合在 GO 表面;
6)将传感器浸入 200 μL 的脱脂奶粉(SMPSF)封闭液

中 1 h,封闭 GO 表面未结合 AFP MAbs 的剩余羧基位点。构成双通道传感器的两支探针式 81°TFG 同时采用上述表面修饰及生物功能化方法,整个过程在恒温干燥箱中进行,目的是在其表面固定 AFP MAbs 单克隆抗体作为生物识别单元,增强传感器灵敏度并使其具有对 AFP 抗原的高度特异性。

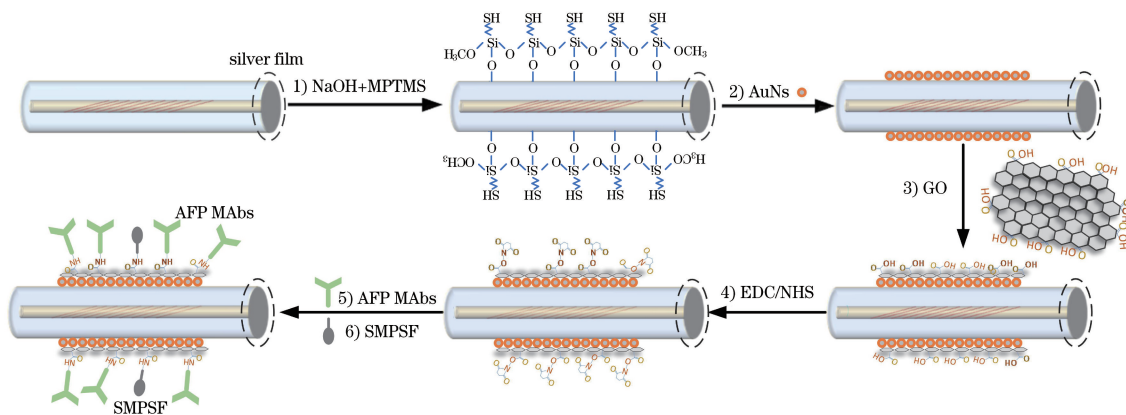


图 4 探针式 81°TFG-LSPR 的表面修饰以及生物功能化过程

Fig. 4 Surface modification and biofunctionalization process of the probe type 81°TFG-LSPR

用图 2 及 2.3 节的标定方法在两支探针式 81°TFG 表面修饰 AuNs 及 GO 前后进行 RI 灵敏度标定,如图 5 所示。探针式 81°TFG1 和 81°TFG2 在修饰 AuNs 及 GO 后的 RI 灵敏度分别为 169.14 nm/RIU (RIU 为单位 RI)和 175.50 nm/RIU,相比修饰前,分别提高了约 10.44%、10.19%。值得一提的是,在生物传感应用中,GO 的表面和边缘众多的含氧基团极大增加了光栅表面与生物分子的结合位点,为后续提高特异性抗原的检测灵敏度起到了关键性作用^[16]。

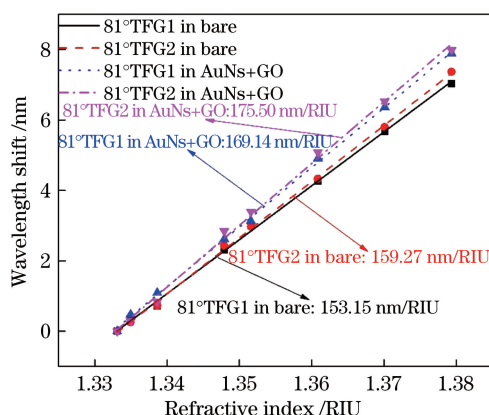


图 5 探针式 81°TFG 修饰前后的 RI 灵敏度

Fig. 5 RI sensitivity of probe type 81°TFG before and after modification

3 实验与讨论

3.1 探针式 81°TFG 表面的修饰效果

利用场发射扫描电子显微镜 (FESEM, ZEISS SIGMA HD)对 81°TFG 表面修饰 AuNs 及 GO 后的形貌进行表征,结果如图 6 所示。图 6(a)为光纤表面只修饰 AuNs 时的 FESEM 图像,可以发现, 81°TFG 表面 AuNs 有少量团聚现象;图 6(b)为光纤表面修饰 AuNs 及 GO 后的 FESEM 图像,可以发现, AuNs 氨基化导致部分 AuNs 脱落,但改善了光纤表面的 AuNs 团聚现象,且 AuNs 以及光纤表面包裹着一层致密的 GO 薄膜。

对探针式 81°TFG 表面修饰 AuNs 和 GO 后的元素成分进行了能谱分析,结果如图 7 所示,其中, cps 为每秒计数值,对应的光栅表面元素成分如表 1 所示。可以发现, C、O、Si、Au 元素含量的质量分数分别为 20.44%、51.05%、20.70% 和 7.81%。其中, C 元素和部分 O 元素来自光纤表面的 GO, Si 元素和部分 O 元素来自光纤 (SiO_2) 材料, Au 元素则来自光纤表面的 AuNs, 这表明本修饰方法能够有效地将 AuNs 及 GO 修饰在光栅表面上。

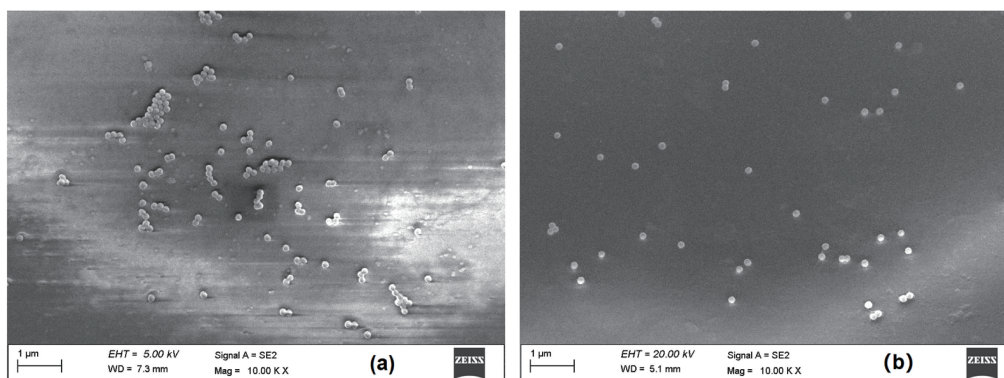


图 6 探针式 81° TFG 的 FESEM 图像。(a) 修饰 AuNs; (b) 修饰 AuNs 与 GO

Fig. 6 FESEM images of the probe type 81° TFG. (a) Modified with AuNs; (b) modified with AuNs and GO

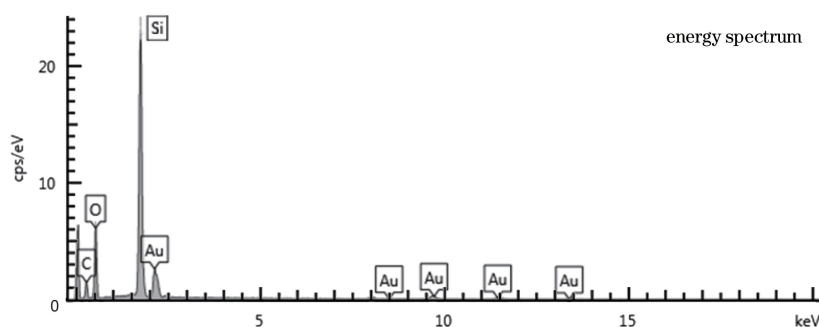


图 7 探针式 81° TFG 表面修饰 AuNs 及 GO 后的能谱图

Fig. 7 Energy spectrum of the probe type 81° TFG surface modified with AuNs and GO

表 1 探针式 81° TFG 表面修饰 AuNs 和 GO 后的元素质量分数

Table 1 Elemental mass fractions of AuNs and GO after surface modification of probe type 81° TFG unit: %

Chemical element	Mass fraction	Atomic percentage
C	20.44	30.02
O	51.05	56.28
Si	20.70	13.00
Au	7.81	0.70
Amount	100	100

3.2 AFP 检测的性能及对照实验

用 PBS 配置相同质量浓度的 BSA 溶液和标准 AFP 抗原溶液, 质量浓度从低到高依次为 1, 10, 100, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1, 10, 100, 200, 500 ng/mL 。用图 2 中的实验系统, 同时在通道 1 和通道 2 分别加入相同质量浓度的 BSA 溶液 (200 μL) 和标准 AFP 抗原溶液 (200 μL) 浸没探针式 81° TFG-LSPR 传感器栅区, 并用光谱仪记录光谱的动态变化过程 (1 min 记录一次)。当光谱趋于稳定后 (15 min 后), 用 PBS 冲洗两个通道中的探针式 81° TFG, 并将其置于空白 PBS 中。考虑到光谱仪的稳定性和外界环境的微小变化对传感器光谱的干扰, 连续记

录 5 组传感器在 PBS 中的光谱后取平均值作为对应质量浓度等级的最终响应光谱, 找出对应质量浓度的谐振波长, 然后以表面修饰后的传感器在 PBS 中的谐振波长为基点, 计算对应质量浓度的波长红移量。

图 8(a) 和图 8(b) 分别为检测过程中双通道探针式 81° TFG1 的光谱变化和谐振波长红移量随时间的变化。从图 8(a) 可以发现, 对于通道 1, 随着 BSA 质量浓度的增加, 双通道探针式 81° TFG2 的谐振波长几乎没有变化, 这表明其表面修饰的 AFP MAbs 没有和 BSA 分子发生特异性结合; 相反, 随 AFP 抗原溶液质量浓度的增加, 探针式 81° TFG2 的谐振波长发生了明显红移, 当 AFP 抗原溶液的质量浓度分别为 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 对应谐振波长分别发生了 0.055 nm 和 0.155 nm 的红移, 这表明双通道传感器对 AFP 抗原的检测极限在 1 ~ 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 之间; 此外, 当 AFP 抗原溶液的质量浓度分别为 200 ng/mL 和 500 ng/mL 时, 红移量分别为 0.855 nm 和 0.880 nm, 波长红移量变化趋于平稳。原因是随着 AFP 抗原溶液质量浓度的增加, 光栅表面能和 AFP 抗原发生特异性结合的 AFP MAbs 位点逐步减少, 其对 AFP 抗原检测的饱和点

约为 200 ng/mL。值得一提的是,图 8(b)在不同质量浓度溶液的检测过程中,通道 1 对应的谐振波长出现小幅波动,这是由光谱仪的稳定性以及外界环境的微小变化引起的;而通道 2 对应的谐振波长出

现明显的波动,原因是除光谱仪的稳定性和外界环境的微小变化引起的波动外,传感器表面还存在 AFP MAbs 与 AFP 抗原之间结合和解离的动态过程。

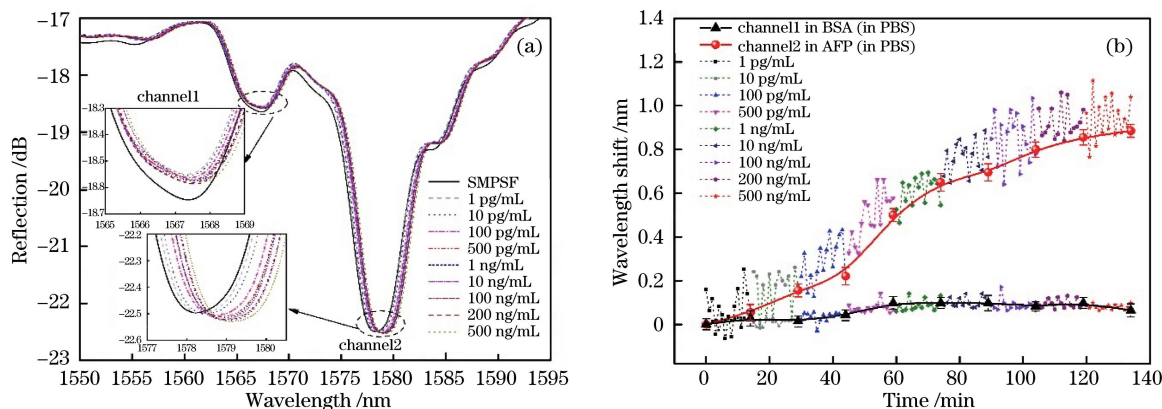


图 8 双通道免疫传感器的 AFP 抗原检测对照实验。(a)光谱随质量浓度的变化曲线;
(b)谐振波长漂移量随时间的变化曲线

Fig. 8 AFP antigen detection control experiment of dual-channel sensor. (a) Change curve of the spectrum with mass concentration; (b) change curve of the resonance wavelength shift with time

图 9 为图 8 中对应的两个通道谐振波长红移量与 BSA 溶液及 AFP 抗原溶液质量浓度对数之间的关系。可以发现,通道 1 对应的谐振波长红移量随 BSA 溶液质量浓度对数的增加没有发生明显变化,而通道 2 谐振波长红移量 y 与 AFP 抗原溶液浓度对数 x 呈较好的线性关系,可通过线性拟合表示为

$$y = 0.155x + 2.196. \quad (2)$$

由(2)式可知,传感器对 AFP 抗原的特异性检测灵敏度约为 0.155 nm/log(mg/mL)。

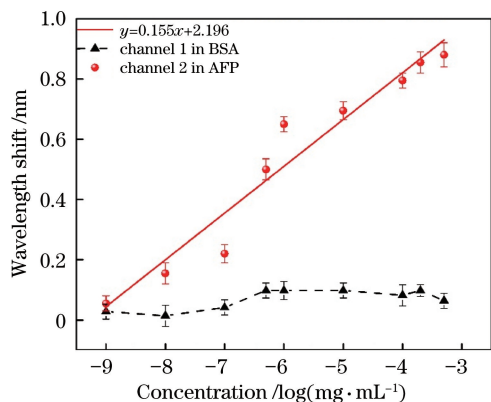


图 9 谐振波长红移量随抗原溶液质量浓度的变化曲线
Fig. 9 Change curve of resonant wave long red shift with anti-primary solution quality concentration

3.3 AFP 血清免疫检测实验

为了评估该双通道探针式 81°TFG-LSPR 传感器在复杂血清环境下的临床检测能力,用质量浓度

为 20% 的 HF 溶液对两根 81°TFG 探针轻微腐蚀以去除光纤表面所有的涂覆层,并用与上文相同的方法对两根 81°TFG 探针进行表面修饰和生物功能化。由于健康人体血清中 AFP 的质量浓度为 0~7 ng/mL^[32],肝癌晚期患者的血清中 AFP 质量浓度可达到 100~1000 ng/mL^[33],制作的双通道生物传感器对 AFP 抗原质量浓度检测的饱和点约为 200 ng/mL,综合考虑后,实验中用 PBS 将肝癌患者血清与健康人体血清稀释 10 倍。将稀释后健康人体血清、肝癌患者血清分别分为 A、B、C、D、E、F 六组,并用通道 1 和通道 2 进行检测。取 A 组的健康人体血清和肝癌患者血清 200 μ L 分别同时浸泡通道 1 和通道 2,每 1 min 记录一次光谱数据,待光谱稳定后(15 min)用 PBS 充分清洗两个通道,并记录传感器在空白 PBS 中的谐振波长,用相同的方法完成 B~F 组血清样本的检测。由于附着在光纤表面血清中的其他血浆蛋白、脂肪、碳水化合物、无机物等无法与光纤表面的 AFP MAbs 发生特异性结合,基本上被 PBS 从光纤表面冲洗掉,因此可忽略血清背景对传感器谐振波长的干扰,认为谐振波长的漂移量主要由血清中 AFP 分子与 AFP MAbs 特异性结合引起的。

健康人体血清和肝癌患者血清都含有其他杂质分子,区别在于肝癌患者血清中的 AFP 分子含量远高于健康人体血清。图 10(a)和图 10(b)分别为双通道传感器对不同血清免疫检测过程中的光谱变化

及谐振波长红移量随时间的变化情况。从图 10(b) 可以发现,通道 1 检测健康人体血清的谐振波长红移量约为 0.20 nm,而通道 2 检测肝癌患者血清的谐振波长红移量约为 0.75 nm。参考 3.2 节图 8(b) 对标准 AFP 抗原溶液的检测结果,当 AFP 抗原溶液的质量浓度分别为 100 pg/mL 和 100 ng/mL 时,

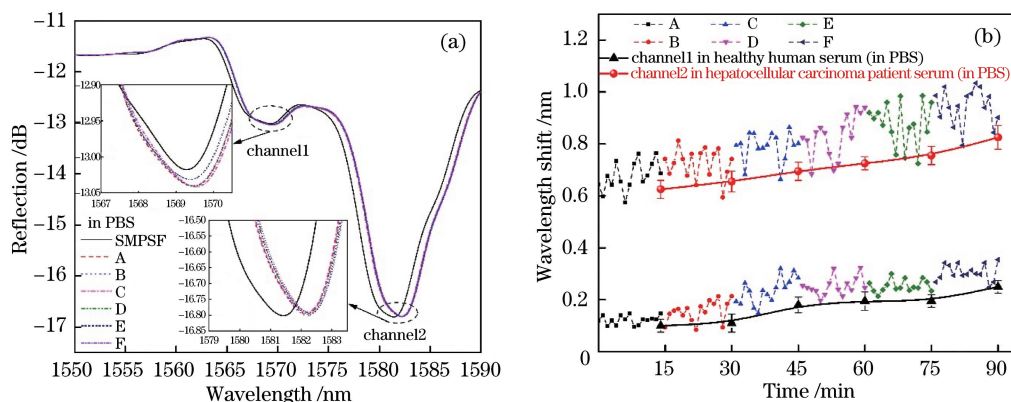


图 10 双通道生物传感器临床性实验光谱及谐振波长变化。(a)光谱的变化曲线;(b)波长的变化曲线
Fig. 10 Clinical experiment spectrum and resonance wavelength changes of dual-channel biosensor.

(a) Change curve of the spectrum; (b) change curve of the wavelength

4 结 论

提出了一种集成 GO 的双通道探针式 81°TFG-LSPR 的 AFP 免疫传感器,分析了该双通道传感器的光谱特性和传感特性,并用不同质量浓度的 BSA 和标准 AFP 抗原溶液进行检测实验。结果表明,该传感器的两个通道相互独立,互不影响;且传感器能实现对 AFP 抗原的特异性检测,对 AFP 的检测极限在 $1\sim 10\text{ pg/mL}$ 之间,检测范围为 $1\text{ pg/mL}\sim 200\text{ ng/mL}$,在该范围内对 AFP 抗原的检测灵敏度约为 $0.155\text{ nm}/\log(\text{mg/mL})$ 。最后,用该双通道传感器的通道 1 和通道 2 分别同时检测六组健康人体血清和肝癌患者血清,结果表明,该双通道探针式 81°TFG-LSPR 免疫传感器具有检测速度快、操作简单的优点,且可实现对目标生物分子阳性和阴性样本的同时检测,在临床检测领域有较大的应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Mizejewski G J. Biological roles of alpha-fetoprotein during pregnancy and perinatal development [J]. *Experimental Biology and Medicine*, 2004, 229(6): 439-463.
- [2] Zhao Q, Wang X P, Xu B, et al. Advanced progress in alpha-fetoprotein and hepatocarcinoma immunity [J]. *Journal of Biology*, 2016, 33(2): 95-99.
赵倩, 王小平, 胥冰, 等. 甲胎蛋白与肝癌免疫的研究进展[J]. *生物学杂志*, 2016, 33(2): 95-99.
- [3] Zhou Y M, Yang J M, Li B, et al. Clinicopathologic characteristics of intrahepatic cholangiocarcinoma in patients with positive serum α -fetoprotein [J]. *World Journal of Gastroenterology*, 2008, 14(14): 2251-2254.
- [4] He C, Peng W, Liu X J, et al. Post-treatment alpha-fetoprotein response predicts prognosis of patients with hepatocellular carcinoma: a meta-analysis [J]. *Medicine*, 2019, 98(31): e16557.
- [5] Ma J F, Yang X X, Sun L, et al. Application of chemiluminescence immunoassay technology and enzyme-linked immunosorbent assay in hepatitis B virus serology [J]. *Guide of China Medicine*, 2019, 17(27): 161-162.
马吉芳, 杨晓樾, 孙澜, 等. 化学发光免疫分析技术和酶联免疫吸附试验在乙肝病毒血清学检验中的应用[J]. *中国医药指南*, 2019, 17(27): 161-162.
- [6] Wu J H, Meng L. Immunocolloidal gold technology: advances and application [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2019, 35(13): 146-151.
武晋慧, 孟利. 免疫胶体金技术及其应用研究进展[J]. *中国农学通报*, 2019, 35(13): 146-151.
- [7] Zhao H Y. Research progress and clinical application of protein chip technology [J]. *Journal of Liaoning Medical University*, 2016, 37(3): 110-112.
赵海英. 蛋白芯片技术研究进展及其临床应用[J]. *辽宁医学院学报*, 2016, 37(3): 110-112.
- [8] Lou J, Wang Y, Tong L. Microfiber optical sensors:

- a review[J]. *Sensors* (Basel, Switzerland), 2014, 14(4): 5823-5844.
- [9] Huang Y Y, Tian Z, Sun L P, et al. High-sensitivity DNA biosensor based on optical fiber taper interferometer coated with conjugated polymer tentacle[J]. *Optics Express*, 2015, 23(21): 26962-26968.
- [10] Esposito F, Zotti A, Ranjan R, et al. Single-ended long period fiber grating coated with polystyrene thin film for butane gas sensing[J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2018, 36(3): 825-832.
- [11] Yuan Y, Guo T, Qiu X H, et al. Electrochemical surface plasmon resonance fiber-optic sensor: in situ detection of electroactive biofilms[J]. *Analytical Chemistry*, 2016, 88(15): 7609-7616.
- [12] Lao J J, Han L Z, Wu Z, et al. Gold nanoparticle-functionalized surface plasmon resonance optical fiber biosensor: in situ detection of thrombin with 1 nM detection limit[J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2019, 37(11): 2748-2755.
- [13] Sharma P, Semwal V, Gupta B D. A highly selective LSPR biosensor for the detection of taurine realized on optical fiber substrate and gold nanoparticles[J]. *Optical Fiber Technology*, 2019, 52: 101962.
- [14] Nayak J K, Parhi P, Jha R. Graphene oxide encapsulated gold nanoparticle based stable fibre optic sucrose sensor[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 221: 835-841.
- [15] Jiang B Q, Zhou K M, Wang C L, et al. Label-free glucose biosensor based on enzymatic graphene oxide-functionalized tilted fiber grating [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2018, 254: 1033-1039.
- [16] Hernaez M, Zamarreño C, Melendi-Espina S, et al. Optical fibre sensors using graphene-based materials: a review[J]. *Sensors*, 2017, 17(12): 155.
- [17] Zhao J, Wang Y, Wang Y P. Graphene-oxide-enhanced surface plasmon resonance fiber sensor[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2019, 56(23): 230601.
赵静, 王英, 王义平. 氧化石墨烯增强型表面等离子体共振光纤传感器[J]. *激光与光电子学进展*, 2019, 56(23): 230601.
- [18] Zhou K M, Zhang L, Chen X F, et al. Optic sensors of high refractive-index responsivity and low thermal cross sensitivity that use fiber Bragg gratings of $>80^\circ$ tilted structures[J]. *Optics Letters*, 2006, 31(9): 1193-1195.
- [19] Yan Z J, Wang H S, Wang C L, et al. Theoretical and experimental analysis of excessively tilted fiber gratings[J]. *Optics Express*, 2016, 24(11): 12107-12115.
- [20] Luo B B, Yan Z J, Sun Z Y, et al. Novel glucose sensor based on enzyme-immobilized 81° tilted fiber grating[J]. *Optics Express*, 2014, 22(25): 30571-30578.
- [21] Chen X, Zhou K, Zhang L, et al. In-fiber twist sensor based on a fiber Bragg grating with 81° tilted structure[J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2006, 18(24): 2596-2598.
- [22] Luo B B, Xie L, Wang Y J, et al. Performance optimization of excessively tilted fiber grating cantilever beam vibration sensor[J]. *Acta Optica Sinica*, 2019, 39(8): 0806006.
罗彬彬, 谢浪, 王亚杰, 等. 极大倾角光纤光栅悬臂梁振动传感器性能优化 [J]. *光学学报*, 2019, 39(8): 0806006.
- [23] Luo B B, Zou W G, Zhao M F, et al. pH sensor based on fiber grating with extremely large tilt angle and its sensitivity enhancement[J]. *Acta Optica Sinica*, 2017, 37(1): 0106009.
罗彬彬, 邹文根, 赵明富, 等. 极大倾斜角度光纤光栅 pH 值传感器及其增敏研究 [J]. *光学学报*, 2017, 37(1): 0106009.
- [24] Yan Z J, Mou C B, Sun Z Y, et al. Hybrid tilted fiber grating based refractive index and liquid level sensing system [J]. *Optics Communications*, 2015, 351: 144-148.
- [25] Luo B B, Wu S X, Zhang Z H, et al. Human heart failure biomarker immunosensor based on excessively tilted fiber gratings[J]. *Biomedical Optics Express*, 2017, 8(1): 57-67.
- [26] Luo B B, Wang Y J, Lu H F, et al. Label-free and specific detection of soluble programmed death ligand-1 using a localized surface plasmon resonance biosensor based on excessively tilted fiber gratings [J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(10): 5136-5148.
- [27] Wang Y J, Luo B B, Shi S H, et al. Biosensor based on cladding-etched 81° tilted fiber grating coated with graphene oxide[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2019, 48(12): 87-94.
王亚杰, 罗彬彬, 石胜辉, 等. 氧化石墨烯集成腐蚀型 81° 倾斜光栅生物传感器 [J]. *光子学报*, 2019, 48(12): 87-94.
- [28] Yan Z J, Sun Z Y, Zhou K M, et al. Numerical and experimental analysis of sensitivity-enhanced RI sensor based on ex-TFG in thin cladding fiber [J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2015, 33(14): 3023-3027.
- [29] Yan Z, Sun Q, Wang C, et al. Refractive index and temperature sensitivity characterization of excessively tilted fiber grating[J]. *Optics Express*, 2017, 25(4): 3336-3346.

- [30] 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.
- [31] Singh D P, Herrera C E, Singh B, et al. Graphene oxide: an efficient material and recent approach for biotechnological and biomedical applications [J]. *Materials Science and Engineering: C*, 2018, 86: 173-197.
- [32] Zhao Q, Wang X P, Xu B, et al. Advanced progress in alpha-fetoprotein and hepatocarcinoma immunity [J]. *Journal of Biology*, 2016, 33(2): 95-99.
赵倩, 王小平, 胥冰, 等. 甲胎蛋白与肝癌免疫的研究进展 [J]. *生物学杂志*, 2016, 33(2): 95-99.
- [33] Wang S S, Li H, Li G. Molecular structure and biological function of alphafetoprotein [J]. *World Chinese Journal of Digestology*, 2014, 22(11): 1487-1494.
王珊珊, 李慧, 李刚. 甲胎蛋白的分子结构及生物学功能 [J]. *世界华人消化杂志*, 2014, 22(11): 1487-1494.