

基于双峰谐振长周期光纤光栅的 H9N2 亚型禽流感病毒传感器

石胜辉¹, 聂青林¹, 蒋上海¹, 吴胜昔², 汤斌^{1*}, 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

摘要 H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)虽为低致病性 AIV,但严重危害养禽业的健康发展和公共卫生系统。快速有效的检测方法有利于病毒的早期诊断、预防及控制。提出一种高特异性、低检测极限(LOD)的纳米二氧化钛(nano-TiO₂)粒子修饰双峰谐振长周期光纤光栅(DR-LPFG)的检测 H9N2 AIV 的光学生物传感器。利用改性 nano-TiO₂ 粒子修饰 DR-LPFG,再将抗 H9N2 单克隆抗体分子(anti-H9N2 MAbs)与 TiO₂ 表面羧基以共价键结合,固定于光栅表面制得生物传感器。该传感器机理在于测量固定在 DR-LPFG 表面的 anti-H9N2 MAbs 与 H9N2 AIV 抗原的特异性结合引起光栅双峰谐振波长间距($\Delta\lambda$)的变化。实验结果表明:在折射率为 1.3320~1.3760 时, nano-TiO₂ 修饰 DR-LPFG 的 $\Delta\lambda$ 灵敏度为~1063.44 nm/RIU(RIU 为折射率单位)。该生物传感器对 H9N2 AIV 的 LOD 为~2.7 ng/mL,相较采用 Eudragit L100 共聚物修饰 DR-LPFG 的生物传感器的 LOD,提高了约 96.1%,检测饱和浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$,对 H9N2 AIV 的亲系数为~ $3.57 \times 10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$,对 H9N2 AIV 具有高特异性,且能实现快速检测,在临床诊断、药物分析等生物医学领域有较大应用潜力。

关键词 光纤光学; 光纤生物传感器; 长周期光纤光栅; 双峰谐振; 纳米二氧化钛粒子; H9N2 亚型禽流感病毒

中图分类号 TN253

文献标志码 A

doi: 10.3788/AOS202242.0106001

Biosensor Based on Dual-Resonance Long-Period Fiber Gratings for Detection of H9N2 Subtype Avian Influenza Virus

Shi Shenghui¹, Nie Qinglin¹, Jiang Shanghai¹, Wu Shengxi², Tang bin^{1*}, Zhao Mingfu^{1**}

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

Abstract H9N2 subtype avian influenza virus (AIV) is a low-pathogenicity AIV that seriously threatens the healthy development of the poultry industry and public health systems. By developing rapid, sensitive, and accurate methods suitable for field detection of H9N2 AIV, we could efficiently control the viral infection and its spread over time. This study proposes a novel biosensor with high specificity and a low limit of detection (LOD) for H9N2 AIV detection. The sensor employs a dual-resonance long-period fiber grating (DR-LPFG) modified with TiO₂ nanoparticles (nano-TiO₂). Anti-H9N2 monoclonal antibody molecules (anti-H9N2 MAbs) are covalently bound to the TiO₂ surface carboxyl groups on the surface of the DR-LPFG, thus preparing the biosensor. The biosensor measures the variation of the dual-resonance wavelength spacing ($\Delta\lambda$) caused by the specific interaction between the fixed anti-H9N2 MAbs on the surface of DR-LPFG and H9N2 AIV antigen. In experimental tests, the $\Delta\lambda$

收稿日期: 2021-06-07; 修回日期: 2021-06-21; 录用日期: 2021-07-19

基金项目: 国家自然科学基金(61875026,61805029)、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(cste2019jcyj-msxmX0093)、重庆理工大学研究生创新项目(yex20192046)

通信作者: *tangbin@cqut.edu.cn; **zmf@cqut.edu.cn

sensitivity of the nano-TiO₂ coated DR-LPFG sensor is about 1063.44 nm/RIU (where RIU is the refractive index unit) in the refractive index range 1.3320–1.3760. The LOD of the proposed biosensor for H9N2 AIV is ~2.7 ng/mL, 96.1% greater than that of a DR-LPFG-based biosensor modified with Eudragit L100 copolymer. The biosensor saturates at 50 μg/mL, and its affinity coefficient to H9N2 AIV is ~3.57 × 10⁸ mol⁻¹ · L. The biosensor also shows a high specificity and a rapid detection for H9N2 AIV, affirming its high application potential in biomedical fields such as clinical diagnosis and drug analysis.

Key words fiber optics; optical fiber biosensor; long-period fiber grating; dual-resonance; titanium dioxide nanoparticles; H9N2 subtype avian influenza virus

1 引言

H9N2 亚型禽流感病毒(AIV)最早于 1966 年在美国火鸡中分离得到^[1],自 1994 年起在中国养禽场出现^[2]。AIV 易与其他病毒发生频繁重组,可导致家禽业的高死亡率和经济的巨大损失。目前,用于 AIV 检测的最经典方法是病毒的分离和鉴定法^[3],然而该方法程序复杂、耗时较长(通常为数天到数周)、操作繁琐,不能满足快速检测的要求。另一种为传统血清学检测法,包括酶联免疫吸附试验法(ELISA)^[4]、间接血凝试验法^[3]和琼脂扩散法^[5]等。其中,ELISA 具有灵敏度高、通用性和可自动检测等优点,但是需要加入酶对抗体/抗原标记,且易出现漏检和假阳性。间接血凝试验法检测敏感性高、特异性强、操作简便,但红细胞凝集易受多种因素影响,同时标本中杂质、细菌污染和类属抗原等又常引起非特异性凝集反应。琼脂扩散法虽操作简单,但敏感性较差,易受反应浓度和时间的影响,出现一定的错误。此外,分子生物检测方法如聚合酶链反应分析^[6]、环介导等温扩增(LAMP)技术^[7]和 DNA 微阵列分析^[8]被用于检测流感病毒。但这些方法或特异性差,或敏感性低,或因非特异性扩增出现假阳性结果,或需要专业技术人员操作复杂精密仪器设备,检测时间较长,难以实现对 AIV 的快速、准确检测。因此,研究适用于 H9N2 AIV 的简单、快速和准确的检测方法有利于降低经济损失和人类感染,对有效控制病毒感染及扩散具有重要的意义。

与上述技术方法相比,基于长周期光纤光栅(LPFG)的传感器具有灵敏度高、实时监测、环境适应性强等优异特性,在折射率(RI)^[9]、温度及应变^[10]、扭转^[11]、模式转换^[12]及生化检测^[13-17]等领域得到了广泛研究。对于普通 LPFG,当光栅周期较小(100 μm)时,纤芯基模与高阶包层模发生耦合,在传输谱中出现双谐振峰现象^[18]。由于双谐振峰随外界 RI 的变化向相反方向发生漂移^[19],成倍地增大了 LPFG 对 RI 的响应,因此这种双峰谐振光

栅(DR-LPFG)具有比普通 LPFG 更高的 RI 灵敏度,在生物化学传感方面成为研究热点^[20-23]。Topliss 等^[20]使用杯芳烃作为功能材料,利用 DR-LPFG 实现对芳族化合物甲苯和苯的监测,实验测得对甲苯的探测灵敏度为 231 × 10⁻⁶。Smietana 等^[21]使用 T4 噬菌体作为识别分子,将其固定于 DR-LPFG 表面检测大肠杆菌细菌。噬菌体与细菌的相互结合使得光栅谐振波长红移了 1.3 nm。Janczuk-Richter 等^[22]将 3-(三乙氧基甲硅烷基)丙基琥珀酸酐与抗 T7 抗体以共价键结合并修饰于 DR-LPFG 表面,制作了生物传感器。利用抗体与抗原的特异性结合,在 T7 噬菌体浓度(每毫升试样中所含有的噬菌体数,PFU/mL)为 5 × 10³ PFU/mL 到 5 × 10⁹ PFU/mL 范围内,该传感器的检测极限(LOD)低于 5 × 10³ PFU/mL。Marques 等^[23]用硅核-金壳纳米颗粒涂层修饰 DR-LPFG,对生物素检测的 LOD 为 19 pg/mm²。另一方面,二维纳米材料具有出众的光学和化学等特性,已成为国内外学者的研究热点^[24]。在光栅表面涂覆比包层 RI 高的二维纳米材料,其透射光谱对涂层材料的光学性质表现出很强的敏感性^[25]。众所周知,金属氧化物在化学吸附时会发生物理性质的变化,从而使其成为化学和生物化学传感应用的解决方案^[25]。其中,二氧化钛(TiO₂)具有无毒、高 RI、化学稳定性和生物相容性好等特性,适用于光学生物传感。研究已经证明,TiO₂ 的表面可以对特定分子表面进行生物功能化修饰,这些分子通过静电作用^[26]或化学作用^[27]与 TiO₂ 结合。Francesco 等^[28]使用溶胶-凝胶法把 TiO₂ 薄膜涂覆于 LPFG 表面,检测抗 IgG 抗体,其 LOD 可达 g · L⁻¹ 数量级(10⁻¹¹ mol/L)。Coelho 等^[29]对涂有 TiO₂ 薄膜材料的 LPFG 与光纤表面等离子体共振(SPR)构成的传感器进行了比较研究,在 10 至 100 nmol/L 范围内,光纤 SPR 传感器对凝血酶浓度的 LOD 为 10 nmol/L。

在之前研究中,本课题组报道了基于光纤光栅

的生物传感器^[30-31],但传感器的 LOD 太低。基于此,本文提出一种用于 H9N2 AIV 检测的 nano-TiO₂ 粒子集成 DR-LPFG 的无标记生物传感器。首先,将改性 nano-TiO₂ 粒子表面的羧基与经过硅烷化处理的 DR-LPFG 以共价键结合方式固定于光栅表面,使用场发射扫描电子显微镜对其表面形貌进行表征,并对 RI 灵敏度进行分析;接着,在 DR-LPFG 表面固定作为生物识别分子的抗 H9N2 单克隆抗体分子(anti-H9N2 MAbs),构成无标识生物传感器,对 H9N2 AIV 抗原分子进行检测;最后,对新城疫病毒(NDV)尿囊液进行检测,评估其特异性性能。

2 DR-LPFG 传感原理

LPFG 的独特特性在于其与其他光纤光栅相比具有对外部环境 RI 变化更高的灵敏度。然而,当光栅表面的生物膜 RI 变化非常小时,必须使其灵敏度最大化。通常,这种灵敏度被定义为外部环境 RI 变化所引起的特定包层模谐振波长的变化。对于普通单模 LPFG,当满足相位匹配条件^[32]时,周期性的 RI 调制使得纤芯基模部分能量耦合到同向传输的高阶包层模中。相位匹配条件为

$$\beta_{\text{co}}(\lambda_{\text{res}}) - \beta_{\text{cl}}^m(\lambda_{\text{res}}) = \frac{2\pi}{\Lambda}, \quad (1)$$

式中: β_{co} 、 β_{cl}^m 分别为纤芯基模和包层模的传播常数, $\beta_{\text{co}} = n_{\text{co}}2\pi/\lambda$, $\beta_{\text{cl}}^m = n_{\text{cl}}2\pi/\lambda$; Λ 为光栅周期。LPFG 谐振波长^[32]可表示为

$$\lambda_{\text{res}}^m = (N_{\text{co}} - N_{\text{cl}}^m)\Lambda, \quad (2)$$

式中:纤芯基模的有效折射率为 $N_{\text{co}} = \beta_{\text{co}}/k_0$;第 m 次包层模的有效折射率为 $N_{\text{cl}}^m = \beta_{\text{cl}}^m/k_0$ 。 N_{cl}^m 依赖于光栅周围介质折射率(n_{sur}),这种关系使 LPFG 可应用于传感领域。

当生物识别物(例如蛋白质、DNA 和抗体)作为传感层沉积在 LPFG 表面区域上时,与所研究分析物的相互作用会引起 N_{cl}^m 的改变,导致其谐振波长迁移。此时,LPFG 谐振波长的漂移^[19,21,33]可以表示为

$$\frac{d\lambda_{\text{res}}^m}{dn_{\text{sur}}} = -\lambda_{\text{res}}^m \cdot \frac{d\lambda_{\text{res}}^m}{d\Lambda} \cdot \frac{u_m^2(\lambda_{\text{res}}^m)^3 n_{\text{sur}}}{8\pi r_{\text{cl}}^3 n_{\text{cl}}(N_{\text{co}} - N_{\text{cl}}^m)^2 (n_{\text{cl}}^2 - n_{\text{sur}}^2)^2}, \quad (3)$$

式中: u_m 是第一类零阶贝塞尔函数的第 m 个根; r_{co} 和 r_{cl} 分别为 LPFG 纤芯和包层半径。 $d\lambda_{\text{res}}^m/d\Lambda$ 对于高阶包层模式来说是非线性变化的,在特定波长

处显示为一个转折点。转折点两侧对应两个离散波长,因此在光栅传输谱中出现双谐振峰现象^[18],表明纤芯基模的能量在两个离散波长处耦合到相同的包层模中。其中,短波长处谐振波长对应左谐振峰 λ_L ,长波长处谐振波长对应右谐振峰 λ_R 。

DR-LPFG 作为一类特殊的光纤光栅,优点是双谐振波长 λ_L 和 λ_R 同时随外界环境的变化(如包层周围介质 RI、光栅表面发生的生物化学反应或生物分子的结合等)向相反的方向漂移。因此,光栅左右谐振峰波长 λ_L 和 λ_R 同时变化,即 $\Delta\lambda = \Delta(\lambda_R - \lambda_L) = \Delta\lambda_R + \Delta\lambda_L$,这意味着 DR-LPFG 用作传感器时灵敏度加倍。 $\Delta\lambda$ 强烈依赖于光纤参数(纤芯和包层 RI 及 RI 分布函数等)、光栅周期和曝光量等参数的微小变化^[34]。需要注意的是,包层模的倏逝场扩展到光纤包层区域之外,与所研究生物分析物(H9N2 AIV 抗原分子)相互作用时,结果表现为光栅 λ_L 和 λ_R 同时漂移。因此,将 DR-LPFG 传感器的灵敏度定义为与外界微扰有关的两个谐振波长间距的变化更为合理,即 $S = (\Delta\lambda_R + \Delta\lambda_L)/\Delta n$, Δn 为外界环境 RI 的变化。显然,在转折点处, $|d\lambda_{\text{res}}^m/d\Lambda| \rightarrow \infty$ 时, $\Delta\lambda$ 达到最大值,DR-LPFG 对外部环境的变化非常敏感,因此可应用于生物及生化传感等领域^[20-23]。

3 材料和方法

3.1 试剂与材料

实验所使用试剂均为分析纯,工作溶液均采用灭菌的去离子水进行制备。锐钛矿型纳米二氧化钛颗粒(nano-TiO₂,粒径为 5~10 nm,纯度为 99.8%)购自上海阿拉丁生化科技有限公司;卡波姆 940/聚丙烯酸(PAA)购自北京索莱宝科技有限公司;N-羟基琥珀酰亚胺(NHS,纯度为 99%)和 1-(3-二甲基氨基丙基)-3-乙基碳二亚胺(EDC,纯度为 99%)均购自 Sigma-Aldrich 中国公司;磷酸盐缓冲液(PBS,浓度为 0.01 mol/L,pH 为 7.4)购自武汉博士德生物技术有限公司;4-吗啉乙烷-磺酸水合物缓冲液(MES,浓度为 0.1 mol/L,pH 为 6.0)购自上海通用化学试剂厂;三羟甲基氨基甲烷(Tris)和吐温(Tween)购自美国 GEN-View 公司,自制脱脂奶粉封闭液(SMPSF)由脱脂奶粉、Tween 和三乙醇胺缓冲盐水(TBS,浓度为 0.1 mol/L,pH 为 7.4)按一定比例混合而成;新城疫病毒株(NDV-AV29)购自中国兽医药品监察所。H9N2 亚型禽流感标准病毒由重庆市动物疫病预防控制中心馈赠,实验所用

H9N2 AIV 抗原、H9N2 MAbs 均由重庆理工大学药学与生物工程学院制作并纯化。

3.2 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 传感器及其形貌表征

实验所使用的 DR-LPFG 采用逐点法制作而成。为了增强光纤光敏性,首先将掺锗石英单模光纤(芯径为 8.2 μm,包层直径为 125.0 μm)放置在温度为 100 °C 的高压(压强为 10.34 MPa)氢气环境中约 48 h 使其载氢。波长为 248 nm 的高频 KrF 准分子激光器发出的脉冲激光经过柱面镜聚焦,以增加曝光激光能量密度,进一步照射至相位掩模板对光敏光纤进行扫描曝光。为保证所制备的 DR-LPFG 的谐振波长位于通信波段范围(1250 ~ 1650 nm)内,同时结合耦合模理论的仿真结果^[19],得到光栅周期约为 136 μm,长度为 ~19 mm。最后,将光栅放置于 80 °C 的恒温箱中退火约 24 h,保证所制作的光栅具有稳定的光谱特性。

在体积为 10 mL 纯净水中加入质量为 0.02 g

的锐钛矿型 nano-TiO₂ 颗粒,经过频率为 40 kHz 的超声处理 10 min 后,得到 nano-TiO₂ 分散液;接着,按照体积比 1:1 将其与 PAA 溶液(质量浓度为 1 mg/mL)混合,再次超声(60 °C)4 h 后得到改性 nano-TiO₂ 溶液;然后,使用稀硝酸溶液(HNO₃,体积分数为 5%)浸泡栅区 ~1 h,再用无水乙醇和去离子水反复冲洗栅区后,将其置于 40 °C 的恒温箱内;同时,采用移液枪将 NaOH 溶液(纯度为 99%,浓度为 0.2 mol/L)浸没放置于载玻片上光栅 3.5 h,继续于室温下浸泡 0.5 h 后,使用超纯水反复冲洗光栅并在对流烘干机中(50 °C)烘干;烘干后的光栅浸泡于质量分数为 5% 的 APTES(纯度为 99%)溶液中 1 h,使其表面富含氨基官能团,再次用无水乙醇和去离子水冲洗多次并烘干;最后,取所制备的改性 nano-TiO₂ 混合溶液浸泡光栅 12 h, PAA 富含的羧基官能团与光栅表面的氨基通过共价键方式牢固地结合在一起,得到 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 传感器。具体过程如图 1 所示。

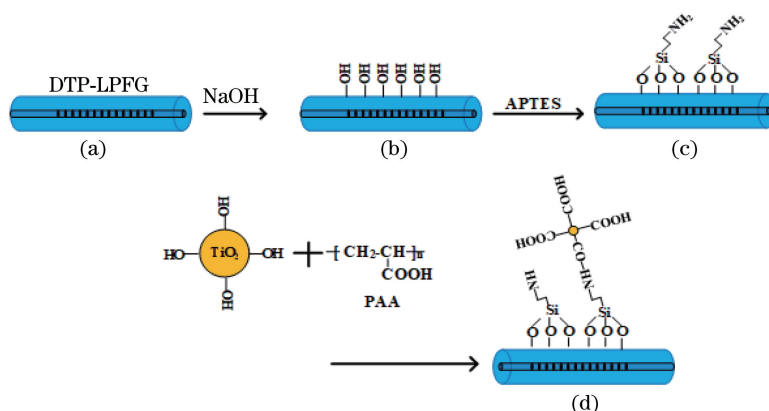


图 1 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 表面过程示意图

Fig. 1 Schematic diagram of DR-LPFG modified with nano-TiO₂ particles

利用场发射扫描电子显微镜(FESEM)对 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 的表面形貌进行表征,结果如图 2 所示。由图 2 可见,改性 nano-TiO₂ 粒子较好地沉积于光栅表面,这是因为 TiO₂ 中 Ti—O 键的极性较大,其表面水分子发生水解,提高了 TiO₂ 分散性能和表面规整性。此外,从图 2(b)可以清楚看出,光栅表面也存在一定的团聚现象,这是由于 nano-TiO₂ 粒子间的静电力和范德瓦耳斯力的存在。

3.3 DR-LPFG 传感器表面生物功能化

为了使所制备的 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 传感器具备 H9N2 AIV 生物分子检测的能力,须进一步对其进行生物功能化处理。首先,将质量比为 2:

1 的 EDC 和 NHS 溶于 200 μL 去离子水中,搅拌均匀后与 300 μL 的 MES 缓冲液混合,并调节溶液 pH 值,得到 EDC/NHS 活化剂;室温下将光栅传感器浸入活化剂中 1 h,使其表面的羧基基团彻底活化,随后用去离子水反复冲洗其表面,以去除活化剂;进一步,将传感器浸入配制好的 anti-H9N2 MAbs 溶液(质量浓度为 50 μg/mL)中 1 h, nano-TiO₂ 表面的羧基与 anti-H9N2 MAbs 上的氨基以共价键结合方式将 MAbs 固定于传感器表面,待充分反应后,用 PBS 溶液冲洗传感器表面未结合的 H9N2 MAbs;最后,使用自制 SMPSF 封闭液浸没光栅传感器 1 h,以封闭传感器表面未被 H9N2 MAbs 封闭的羧基位点。整个 DR-LPFG 传感器的

生物功能化过程如图 3 所示。需要注意的是,由于 H9N2 AIV 抗原溶液均由 PBS 配制,在后续的 H9N2 AIV 检测实验中均使用 PBS 完成传感器的

清洗工作。因此,整个实验过程中,每一步操作结束后均记录传感器在 PBS 缓冲液中的光谱,并将其作为参考光谱。

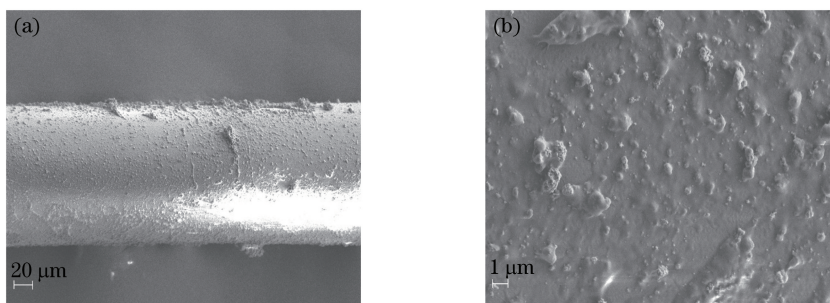


图 2 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 的场发射扫描电子显微镜图像。(a) 300×;(b) 5000×
Fig. 2 FESEM images of nano-TiO₂-intergrated DR-LPFG. (a) 300×; (b) 5000×

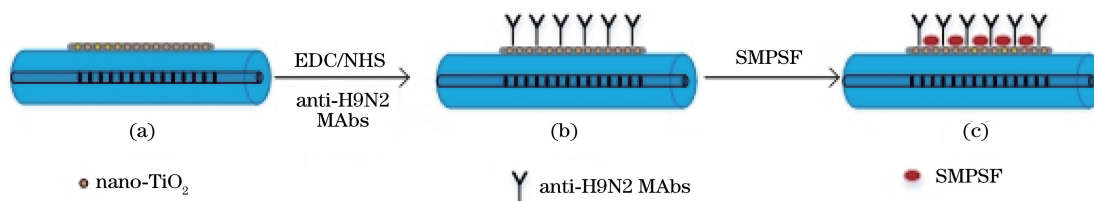


图 3 DR-LPFG 传感器生物功能化。(a)固定 nano-TiO₂; (b)表面修饰 anti-H9N2 MAbs; (c)封闭多余结合位点
Fig. 3 Biofunctionalization of the DR-LPFG sensor. (a) nano-TiO₂ immobilization; (b) sensor surface modified with anti-H9N2 MAbs; (c) sealing of redundant binding sites

3.4 实验系统

利用所制作的 DR-LPFG 对 H9N2 亚型 AIV 进行检测的实验系统及装置如图 4 所示,从超连续宽谱光源(SC-5,波长范围为 480~2200 nm,总输出功率为 800 mW)发出的宽谱光入射到 SMF-28 光纤后继续传输到光衰减器,该光衰减器可以保证光谱稳定性的同时也可防止输出光能量过高对后续光路中器件的损坏;然后,进一步传输至 DR-LPFG 生物传感器。为防止外界空气、灰尘等杂质对生物环境的干扰,该

传感器被玻璃槽罩住,且两端分别固定,保证处于自由水平状态。同时传感器的下端放置一块可移动载玻片,以方便待测溶液的替换及清洗。传感器表面的 H9N2 MAbs 与 H9N2 AIV 发生的特异性结合反应改变了 DR-LPFG 的耦合强度和共振波长。通过光谱仪(OSA; YOGAWA AQ6370D,波长范围为 600~1700 nm,分辨率为 0.03 nm)实时显示生物传感器光谱的变化,完成对待测生物溶液的检测。为避免温度引起检测误差,保持实验室温度恒定(25 ℃)。

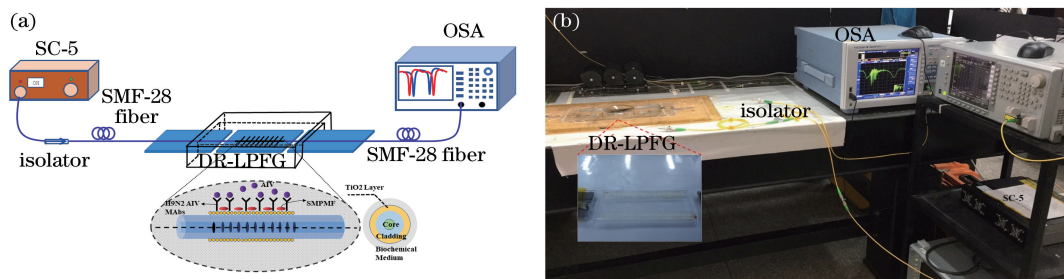


图 4 实验系统图。(a) 示意图;(b) 实物图

Fig. 4 Diagram of experimental system. (a) Schematic diagram; (b) experimental setup

4 结果与讨论

4.1 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 传感器的 RI 响应

为研究 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 的 RI 灵敏度,

首先配制体积分数为 0%~24% 的 NaCl 溶液(对应 RI 范围为 1.3320~1.3760,1.3320 为去离子水的 RI),然后将光栅传感器浸入不同 RI 液体中,并使用 OSA 记录传感器的光谱。每次测试后,使用无水乙

醇仔细清洁传感器,以消除其表面上的残留液体并干燥。从图 5(a)可以看出:随 NaCl 溶液 RI 的增加,DR-LPFG 光谱的 λ_L, λ_R 谐振峰分别发生蓝移、红移现象,这是因为 n_{sur} (NaCl 溶液 RI) 增大, N_{cl}^m 随之增大,而 N_{co} 不变, $d\lambda_{res}^m/d\lambda$ 值为负,由(3)式可知 λ_L 发生蓝移;同理, $d\lambda_{res}^m/d\lambda$ 值为正时, λ_R 发生红移;同时双峰间距 $\Delta\lambda$ 也逐渐增大,且 λ_L, λ_R 和 $\Delta\lambda$ 漂移量分别为 ~ 18.112 nm、 ~ 28.575 nm 和 ~ 46.687 nm。

为进一步研究 nano-TiO₂ 对传感器 RI 灵敏度的增敏效果,图 5(b)给出了 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 前后的 λ_L, λ_R 及 $\Delta\lambda$ 随 n_{sur} 变化的关系。可以看出, TiO₂ 集成 DTP-LPFG 后的 λ_L, λ_R 和 $\Delta\lambda$

所对应的 RI 灵敏度分别为 ~ 398.72 nm/RIU、 ~ 664.71 nm/RIU 和 1063.44 nm/RIU,较裸光栅所对应的 RI 灵敏度分别提高了 1.03 倍、1.02 倍和 1.05 倍。这是因为 nano-TiO₂ 沉积在光栅表面后,增强了光纤包层与周围介质之间的光-物质相互作用,从而提高了 RI 灵敏度。尽管表面修饰 TiO₂ 对 DR-LPFG 的 RI 灵敏度提升效果并不明显,但较普通螺旋型 LPFG (RI 灵敏度为 $48 \sim 51$ nm/RIU^[35]),优势仍然非常明显。同时由于 nano-TiO₂ 本身所具有的优良亲水性和生物兼容性,能够增强光栅表面结合生物分子的能力,为后续 H9N2 AIV 抗原分子的检测提供了可能。

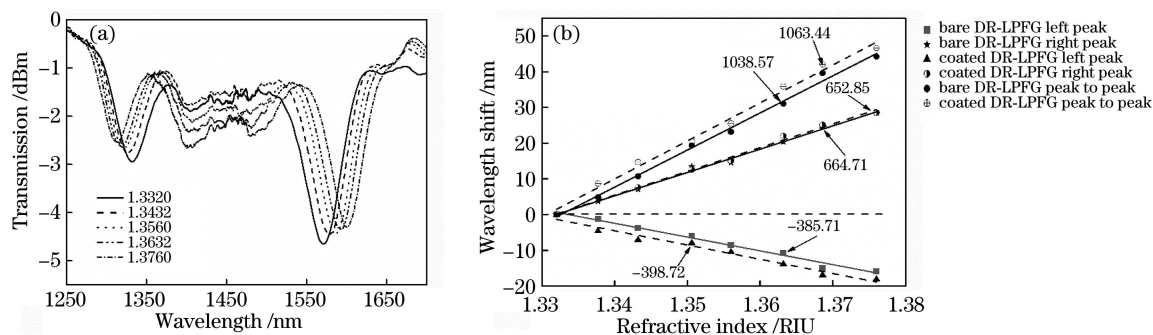


图 5 nano-TiO₂ 集成 DR-LPFG 传感器 RI 响应。(a)光谱随 NaCl 溶液 RI 变化关系;
(b)涂覆 nano-TiO₂ 前后传感器的 RI 灵敏度变化

Fig. 5 RI response of DR-LPFG sensor modified with nano-TiO₂. (a) Transmission spectra evolution of the sensor versus the RI of NaCl solution; (b) RI sensitivity change of the sensor before and after nano-TiO₂ coating

4.2 DR-LPFG 传感器对 H9N2 AIV 检测

由于在生物功能化过程中,DR-LPFG 表面可能仍存在部分位点未与抗体分子结合,这会对实验结果产生影响,因此对该过程中传感器的光谱变化进行监测。图 6 给出了传感器表面固定 H9N2 MAbs 及利用 SMPSF 对传感器表面位点进行封闭过程中传感器双峰间距 $\Delta\lambda$ 随时间的变化关系。由

图 6(a)可知,随着反应时间的增加,AIV 抗原分子逐渐固定在活化后的 DR-LPFG 表面, $\Delta\lambda$ 逐渐增大,这表明其结合是一个动态过程。当这一过程持续到 ~ 50 min 时, $\Delta\lambda$ 变化逐渐平缓,此时可认为抗原分子与传感器表面位点结合基本完毕。同样,在 SMPSF 封闭位点过程中,随着反应时间的增加, $\Delta\lambda$ 也逐渐增大,当这一过程持续到 ~ 55 min 时, $\Delta\lambda$ 不

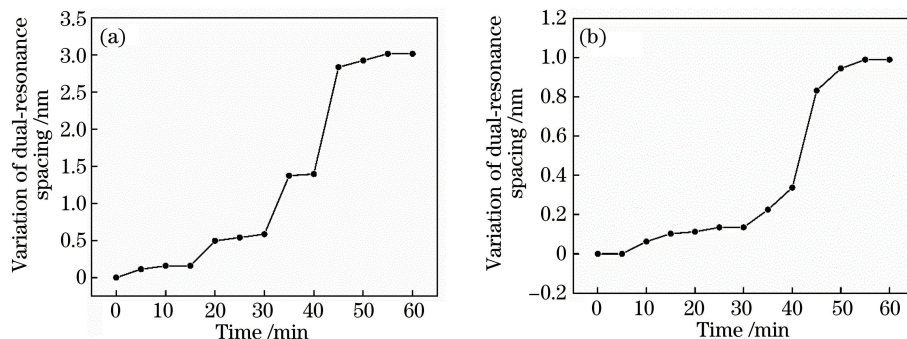


图 6 传感器双峰间距变化。(a)固定 anti-H9N2 MAbs;(b) SMPSF 位点封闭

Fig. 6 Variation of dual-resonance spacing of the biosensor. (a) anti-H9N2 MAbs immobilization;
(b) sealing of redundant binding sites with SMPSF

再发生变化,表明封闭过程结束,结果如图 6(b)所示。

为评估 DR-LPFG 生物传感器对不同质量浓度 H9N2 AIV 检测的能力,利用图 4 所示的实验系统,以传感器在 PBS 溶液中的光谱作为参考光谱。使用 PBS 缓冲液配制经过纯化后的不同质量浓度的 H9N2 AIV 抗原溶液(对应质量浓度梯度为 1 ng/mL、10 ng/mL、50 ng/mL、200 ng/mL、500 ng/mL、1 μg/mL、10 μg/mL、25 μg/mL、50 μg/mL、100 μg/mL)后,利用移液枪按 AIV 抗原溶液质量浓度从低到高逐次浸没整个传感器区域,待光谱稳定后,使用 OSA 记录每个质量浓度所对应的传感器光谱。为避免上次 H9N2 AIV 质量浓度测量对下一次实验测量结果的影响,完成每次检测后,均使用 PBS 清洗传感器表面未结合的 AIV。图 7 给出了在 H9N2 AIV 抗原检测过程中传感器光谱随 AIV 质量浓度变化情况。由图 7 可见,随着 H9N2 AIV 抗原质量浓度的不断增加,传感器的 λ_L 发生蓝移,而 λ_R 发生红移, $\Delta\lambda$ 不断增加。插图仅给出了 λ_R 在 AIV 质量浓度为 1 ng/mL、500 ng/mL、10 μg/mL 和 100 μg/mL 时的变化曲线,可以更清楚地看出 λ_R 随 AIV 质量浓度的增加发生红移。这一现象是传感器表面存在的 H9N2 MAbs 与检测过程中的 H9N2 AIV 发生特异性结合所导致的。

传感器 $\Delta\lambda$ 随 H9N2 AIV 质量浓度(c)变化及质量浓度对数($\log c$)变化关系分别如图 8(a)和图 8

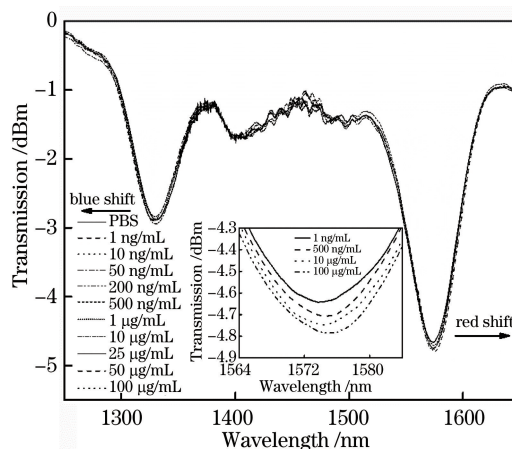


图 7 不同 H9N2 AIV 质量浓度下 DR-LPFG 光谱变化
Fig. 7 Transmission spectra evolution of the DR-LPFG against the mass concentration of H9N2 AIV

(b)所示。由图 8(a)可见:当 AIV 质量浓度从 1 ng/mL 变化到 100 μg/mL 过程中, $\Delta\lambda$ 变化为 3.20 nm;而当 AIV 质量浓度从 50 μg/mL 变化到 100 μg/mL 时,该生物传感器 $\Delta\lambda$ 变化量为 0.07 nm,这是由于传感器上可供 AIV 结合的位点越来越少,即传感器趋于饱和,因此该生物传感器的检测饱和点为 $\sim 50 \mu\text{g/mL}$ 。同时由图 8(b)可知,在 $\log c$ 为 0~5 时,该传感器的检测灵敏度为 $\sim 0.723 \text{ nm}$ 。需要注意的是,在整个实验过程中还发现传感器在检测每个质量浓度的 AIV 时,其光谱仅仅在 10~20 min 内便达到稳定状态,表明所提传感器对 H9N2 AIV 具有快速的响应,相较 LAMP 法^[4]和 ELISA 法^[7]的检测时间,分别提高了 6 倍和 9 倍。

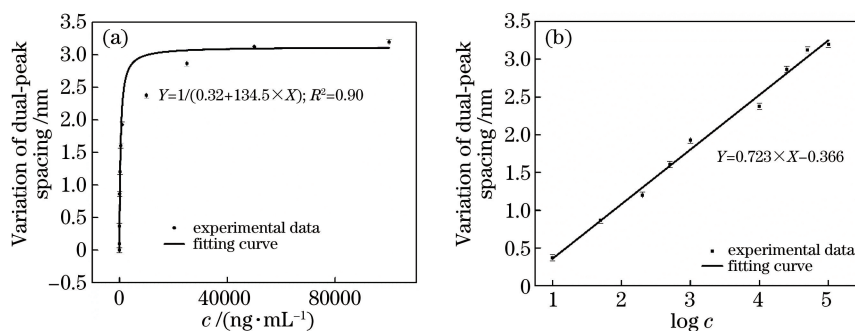


图 8 传感器双峰间距与不同参数的关系。(a) H9N2 AIV 抗原溶液的不同质量浓度;(b) H9N2 AIV 的不同质量浓度对数
Fig. 8 Relationship between dual-peak spacing of sensor and different parameters. (a) Different mass concentrations of H9N2 AIV solutions; (b) logarithm of different mass concentrations of H9N2 AIV solutions

对于该免疫型生物传感器,anti-H9N2 MAbs 与 H9N2 AIV 的特异性结合满足 Langmuir 模型^[36]:

$$\frac{c}{\Delta\lambda} = \frac{c}{\Delta\lambda_{\max}} + \frac{1}{\Delta\lambda_{\max}} \cdot K_d, \quad (4)$$

式中: c 为 H9N2 AIV 抗原溶液的质量浓度; $\Delta\lambda$ 为对应双峰间距的变化量; $\Delta\lambda_{\max}$ 为传感器在整个免疫检测过程中的双峰间距的变化最大值; K_d 为生物传感器的解离系数,与亲和系数 K_a 呈倒数关系。结合图 7 和(4)式,得到亲和系数为 $\sim 3.57 \times$

$10^8 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{L}$, 表明该传感器对 H9N2 AIV 分子具有较好的亲和性。此外, LOD 是表征生物传感器性能非常重要的一个参数。基于生物传感器的校准曲线, 同时结合国际纯粹与应用化学联合会建议, LOD^[37] 定义如下:

$$x_{\text{LOD}} = f^{-1}(\bar{y}_{\text{blank}} + 3\sigma_{\text{max}}), \quad (5)$$

式中: \bar{y}_{blank} 为空白 PBS 中测量的免疫传感器读数; σ_{max} 为对应的标准偏差; f^{-1} 表示图 8(a) 中拟合函数的反函数。根据图 8(a) 的拟合结果和 (5) 式, 计算得到该传感器 LOD 为 $\sim 2.7 \text{ ng/mL}$, 该值与葡萄球菌蛋白 A 修饰大角度倾斜光纤光栅免疫传感器的 LOD (4.1 ng/mL)^[31] 相比, 提高了 $\sim 34.1\%$; 相较 Eudragit L100 共聚物修饰 DR-LPFG 的生物传感器的 LOD ($70 \mu\text{g/L}$)^[38], 提高了 $\sim 96.1\%$; 与应用于临床的 AIV

胶体金免疫层析纸条 LOD ($\sim 1.7 \mu\text{g/mL}$)^[39] 相比, 提高了 $\sim 99.8\%$ 。数据表明, 所设计生物传感器在临床环境中完全可实现对 AIV 的检测。

生物传感器的检测极限及检测范围受到许多因素的影响, 包括抗体/抗原结合效率、非特异性结合、传输质量以及传感器自身的固有灵敏度^[40]。血清学检测法主要针对低致病性病毒的诊断, 检测时间较长, 敏感性较低; 分子生物学技术操作复杂, 同时检测敏感性和特异性依赖于 RNA 提取、扩增所使用的酶及引物、探针长度等。本文所制作的 DR-LPFG 生物传感器具有检测时间短、灵敏度高的优点, 后续将结合二维纳米材料和微流体通道技术, 进一步提高检测极限和检测灵敏度等性能。表 1 给出了检测 AIV 的各类生物传感器。

表 1 检测 AIV 的各类生物传感器

Table 1 Others proposed biosensors for AIV detection

Sensor type	Detection time	Detection limit	Disadvantage	Reference
Amperometric	1 h	10^2 PFU/mL	Complicated operation	[41]
Impedance immunosensor	1 h	20 HA unit /50 μL	Cr/Au layer for sensing layer	[42]
LPGF	10–20 min	40 ng/mL	Poor mechanical properties	[30]
DR-LPFG	Not mentioned	70 $\mu\text{g/L}$	Lower sensitivity	[38]
Magnetic SERS immunosensor	25 min	10^2 TCID ₅₀ /mL	Time-costing sampling procedures	[43]
LRET-based biosensor	2 h	7 pmol/L	Time consuming	[44]
Interferometric biosensor	30 min	0.0005 HA units/mL	Complex signal demodulation	[40]
SPR biosensor	30–50 min	193.3 ng/mL	Difficult light path adjustment	[45]

4.3 DR-LPFG 传感器的特异性实验

为验证所提传感器对 H9N2 AIV 的高特异性, 首先, 使用 HF 溶液轻微腐蚀该 DR-LPFG 生物传感器, 以清除表面所有的吸附层, 重新将 anti-H9N2 MAbs 分子按照前述的表面修饰步骤固定于传感器表面; 接着, 将重新功能化的 AIV 生物传感器放置在 PBS 溶液中, 并记录此时的光谱; 然后, 将该传感器用于新城疫病毒原液 (即 NDV 尿囊液, $300 \mu\text{L}$) 检测。由于 NDV 尿囊液中只含生物盐、杂蛋白等其他生物分子杂质, 不含 H9N2 AIV 抗原分子, 因此由图 9 可以看出, 该 DR-LPFG 生物传感器光谱较 PBS 溶液中的光谱基本保持不变, 表明该 AIV 生物传感器不会对 NDV 尿囊液产生特异性结合。最后, 使用 PBS 和去离子水将该 DR-LPFG 生物传感器洗净烘干后, 依次检测质量浓度分别为 1 ng/mL 、 10 ng/mL 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 的通过病毒扩增的 H9N2 AIV 病毒原液 (即 AIV 尿囊液)。光栅传感器 $\Delta\lambda$ 随 AIV 质量浓度变化的关系如图 9 所示, 可见, 当 AIV 抗原液质量浓度从 1 ng/mL 变化至 $50 \mu\text{g/mL}$ 时, $\Delta\lambda$ 变

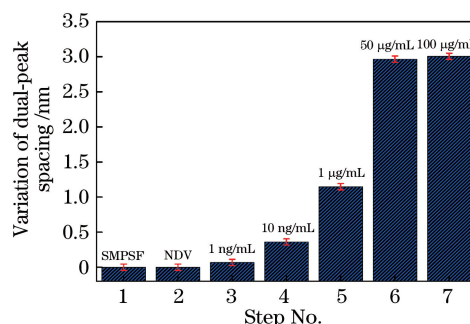


图 9 DR-LPFG 生物传感器特异性测试过程谐振双峰间距的长变化

Fig. 9 Variation of the dual-resonance spacing of the DR-LPFG based biosensor during the specific test
化为 $\sim 3.01 \text{ nm}$, 与第一次检测的高纯度 H9N2 AIV 抗原溶液的 $\Delta\lambda$ 变化量 ($\sim 2.97 \text{ nm}$, 见图 7) 相当, 表明该传感器对 H9N2 AIV 具有较好的特异性。同时, 当 AIV 质量浓度从 $50 \mu\text{g/mL}$ 变化到 $100 \mu\text{g/mL}$ 时, 该生物传感器 $\Delta\lambda$ 变化量仅仅为 0.04 nm , 可认为此时传感器检测质量浓度基本饱和, 进一步证明了该传感器对 AIV 检测的质量浓度饱和点约为 $50 \mu\text{g/mL}$ 。

5 结 论

提出一种 nano-TiO₂ 粒子修饰 DR-LPFG 的新型免疫生物传感器,并应用于 H9N2 亚型 AIV 检测。通过对 DR-LPFG 进行表面羟基化、硅烷化、修饰 nano-TiO₂ 粒子、固定 anti-H9N2 MAbs 及封闭剩余 AIV 多余结合位点等步骤,制作了具备高特异性、低 LOD 检测的生物传感器。实验结果表明, nano-TiO₂ 修饰 DR-LPFG 传感器在 RI 为 1.3320~1.3760 时灵敏度为 1063.44 nm/RIU,相较未采用 nano-TiO₂ 修饰 RI 灵敏度,提高了约 1.05 倍。该生物传感器对 1 ng/mL~100 μg/mL 质量浓度范围的 H9N2 AIV 抗原溶液质量浓度检测极限为 ~2.7 ng/mL;亲和系数为 ~3.57 × 10⁸ mol⁻¹ · L,在质量浓度为 1 ng/mL ~ 10⁵ ng/mL 时的质量浓度检测灵敏度为 ~0.723 ng/mL。所提生物传感器具有良好的特异性、免标记和快速检测等优点,在生物医学传感领域有较大应用潜力。

参 考 文 献

- [1] Homme P J, Easterday B C. Avian influenza virus infections. I. characteristics of influenza A/Turkey/Wisconsin/1966 virus[J]. Avian Diseases, 1970, 14(1): 66-74.
- [2] Liu H Q, Liu X F, Cheng J, et al. Phylogenetic analysis of the hemagglutinin genes of twenty-six avian influenza viruses of subtype H9N2 isolated from chickens in China during 1996-2001 [J]. Avian Diseases, 2003, 47(1): 116-127.
- [3] Sakurai A, Shibasaki F. Updated values for molecular diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus[J]. Viruses, 2012, 4(8): 1235-1257.
- [4] Chiu Y C, Chu W Y, Tsao Z, et al. Antigen-capture enzyme-linked immunosorbent assays for detection of different H5 avian influenza A virus [J]. Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 2012, 24(4): 716-718.
- [5] Charlton B, Crossley B, Hietala S. Conventional and future diagnostics for avian influenza [J]. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases, 2009, 32(4): 341-350.
- [6] Chen W, He B, Li C, et al. Real-time RT-PCR for H5N1 avian influenza A virus detection [J]. Journal of Medical Microbiology, 2007, 56(5): 603-607.
- [7] Kaiser L, Briones M S, Hayden F G. Performance of virus isolation and Directigen © Flu A to detect influenza A virus in experimental human infection [J]. Journal of Clinical Virology, 1999, 14(3): 191-197.
- [8] Li J, Chen S, Evans D H. Typing and subtyping influenza virus using DNA microarrays and multiplex reverse transcriptase PCR [J]. Journal of Clinical Microbiology, 2001, 39(2): 696-704.
- [9] Fu C, Zhong X, Liao C, et al. Thin-core-fiber-based long-period fiber grating for high-sensitivity refractive index measurement [J]. IEEE Photonics Journal, 2015, 7(6): 7103208.
- [10] Guo Y C, Liu Y G, Wang Z, et al. Dual resonance and dual parameter sensor of few mode fiber long period grating [J]. Acta Optica Sinica, 2018, 38(9): 0906003.
郭艳城, 刘艳格, 王志, 等. 少模光纤长周期光栅双峰谐振及双参量传感 [J]. 光学学报, 2018, 38(9): 0906003.
- [11] Huang X C, Wu X W, Gao S C, et al. Response characteristic of twisting second-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.
- [12] Tao H, Mi Y A, Ren W H, et al. Vector mode conversion based on tilted long-period fiber grating written in ring fiber [J]. Chinese Journal of Lasers, 2020, 47(6): 0606002.
陶洪, 卮月安, 任文华, 等. 基于环形光纤的倾斜长周期光纤光栅的矢量模式转换 [J]. 中国激光, 2020, 47(6): 0606002.
- [13] 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.
- [14] Quero G, Zuppolini S, Consales M, et al. Long period fiber grating working in reflection mode as valuable biosensing platform for the detection of drug resistant bacteria [J]. Sensors and Actuators B: Chemical, 2016, 230: 510-520.
- [15] James S W, Korposh S, Lee S W, et al. A long period grating-based chemical sensor insensitive to the influence of interfering parameters [J]. Optics Express, 2014, 22(7): 8012-8023.
- [16] Esposito F, Sansone L, Srivastava A, et al. Long period grating in double cladding fiber coated with graphene oxide as high-performance optical platform for biosensing [J]. Biosensors & Bioelectronics, 2021, 172: 112747.
- [17] Celebanska A, Chiniforooshan Y, Janik M, et al.

- Bioinspired carbohydrate-decorated long-period fiber grating for label-free bacteria detection [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2019, 19(24): 11965-11971.
- [18] Shu X, Huang D. Highly sensitive chemical sensor based on the measurement of the separation of dual resonant peaks in a 100- μm -period fiber grating [J]. *Optics Communications*, 1999, 171: 65-69.
- [19] Shu X, Zhang L, Bennion I. Sensitivity characteristics of long-period fiber gratings [J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2002, 20(2): 255-266.
- [20] Topliss S M, James S W, Davis F, et al. Optical fibre long period grating based selective vapour sensing of volatile organic compounds [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2010, 143(2): 629-634.
- [21] Smietana M, Bock J W, Mikulic P, et al. Detection of bacteria using bacteriophages as recognition elements immobilized on long-period fiber gratings [J]. *Optics Express*, 2011, 19(9): 7971-7978.
- [22] Janczuk-Richter M, Dominik M, Roźniecka E, et al. Long-period fiber grating sensor for detection of viruses [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2017, 250: 32-38.
- [23] Marques L, Hernandez F U, James S W, et al. Highly sensitive optical fibre long period grating biosensor anchored with silica core gold shell nanoparticles [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 75: 222-231.
- [24] Tan C L, Cao X H, Wu X J, et al. Recent advances in ultrathin two-dimensional nanomaterials [J]. *Chemical Reviews*, 2017, 117: 6225-6331.
- [25] Rees N D, James S W, Tatam R P, et al. Optical fiber long-period gratings with Langmuir-Blodgett thin-film overlays [J]. *Optics Letters*, 2002, 27(9): 686-688.
- [26] Ali M A, Srivastava S, Solanki P R, et al. Nanostructured anatase-titanium dioxide based platform for application to microfluidics cholesterol biosensor [J]. *Applied Physics Letters*, 2012, 101(8): 084105.
- [27] Shafiee H, Lidstone E A, Jahangir M, et al. Nanostructured optical photonic crystal biosensor for HIV viral load measurement [J]. *Scientific Reports*, 2014, 4: 4116.
- [28] Francesco C, Palas B, Cosimo T, 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.
- [29] Coelho L, de Almeida M M M J, Santos J L, et al. Aptamer-based fiber sensor for thrombin detection [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2016, 21(8): 087005.
- [30] 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.
- [31] Luo B B, Wu S X, Zou W G, et al. Label-free immunoassay for porcine circovirus type 2 based on excessively tilted fiber grating modified with staphylococcal protein A [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 86:1054-1060.
- [32] Zhou X, Shi S, Zhang Z, et al. Refractive index sensing by using mechanically induced long-period grating [J]. *IEEE Photonics Journal*, 2012, 4(1): 119-125.
- [33] Biswas P, Basumallick N, Bandyopadhyay S, et al. Sensitivity enhancement of turn-around-point long period gratings by tuning initial coupling condition [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2015, 15(2): 1240-1245.
- [34] Chen X F, Zhou K M, Zhang L, et al. Dual-peak long-period fiber gratings with enhanced refractive index sensitivity by finely tailored mode dispersion that uses the light cladding etching technique [J]. *Applied Optics*, 2007, 46(4): 451-455.
- [35] Cho Y, Ahmed F, Joe H E, et al. Fabrication of a screw-shaped long-period fiber grating for refractive index sensing [J]. *IEEE Photonics Technology Letters*, 2017, 29(24): 2242-2245.
- [36] Li B R, Chen C W, Yang W L, et al. Biomolecular recognition with a sensitivity-enhanced nanowire transistor biosensor [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2013, 45: 252-259.
- [37] Socorro-Lerános A B, Santano D, Villar I D, et al. Trends in the design of wavelength-based optical fibre biosensors (2008—2018) [J]. *Biosensors & Bioelectronics*: X, 2019, 1: 100015.
- [38] 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 & Bioelectronics*, 2014, 60: 305-310.
- [39] 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.

- [40] Zhang X, Dhawane A N, Sweeney J, et al. Electrochemical assay to detect influenza viruses and measure drug susceptibility [J]. *Angewandte Chemie*, 2015, 54(20): 5929-5932.
- [41] Yan X F, Li Y T, Wang R H, et al. An impedance immunosensor for detection of H5 subtype avian influenza virus [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2012, 40(10): 1507-1513.
颜小飞, 李运涛, 王蓉晖, 等. 检测禽流感 H5 亚型病毒的阻抗型免疫研究 [J]. *分析化学*, 2012, 40(10): 1507-1513.
- [42] Sun Y, Xu L, Zhang F D, et al. A promising magnetic SERS immunosensor for sensitive detection of avian influenza virus [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2017, 89: 906-912.
- [43] Ye W W, Tsang M K, Liu X, et al. Upconversion luminescence resonance energy transfer (LRET)-based biosensor for rapid and ultrasensitive detection of avian influenza virus H7 subtype[J]. *Small*, 2014, 10(12): 2390-2397.
- [44] Xu J, Suarez D, Gottfried D S. Detection of avian influenza virus using an interferometric biosensor[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 389(4): 1193-1199.
- [45] Chi L W, Marissa C, Heather M, et al. A phase-intensity surface plasmon resonance biosensor for avian influenza A (H5N1) detection [J]. *Sensors*, 2017, 17(10): 2363.