

光纤生物免疫传感器原理及关键技术研究*

杨玉孝¹ 王永峰¹ 熊开利¹ 刘斌² 谭玉山¹ 谭洪³ 陈端军³

(1 西安交通大学机械工程学院, 西安 710049)

(2 第四军医大学口腔医院, 西安 710032)

(3 Biofiber Identification, 1031 Prouty Way, San Jose, CA95129, U. S. A)

摘要 利用建立的反射光谱分析系统(Rifs)和 SiO₂ 表面蛋白分布的原子力显微镜(AFM)表征, 提出了利用生物膜层反射光谱曲线极值点波长变化实时监测抗体抗原免疫反应的新方法. 实验表明, 得到的生物免疫反应动力曲线与反应过程有很好的对应关系. 该方法克服了目前生物检测中膜厚算法的不足, 方法简单有效, 能够实现对生物反应过程的实时监测.

关键词 生物传感器; 光谱仪; 光纤传感器; 免疫检测

中图分类号 TH744.1 **文献标识码** A

0 引言

基于光学原理的生物免疫传感器, 是直接将对抗体抗原免疫反应转变为可检测的连续信号, 省去了对抗体或抗原蛋白分子的标记过程, 保持了蛋白的生物活性, 活动元件少、无电接触、抗电磁干扰能力强, 通过参数控制, 能够获得很高的稳定性. 而且能实现原位、实时地对抗体抗原结合过程进行表征, 对免疫分析中抗体抗原结合动力学研究有非常大的帮助, 是当前生物传感器领域竞相研究的热点^[1-4].

利用薄膜光学干涉技术检测生物免疫反应形成生物膜的厚度, 实现对生物免疫反应过程的监测是一种不同于以往的新思路. 众所周知, 抗体和抗原都是具有生物活性的蛋白质, 具有一定大小的分子量和体积. 抗体与抗原蛋白结合时, 由于特定的结构, 决定了其结合的特异性. 那么, 如何利用高精度薄膜厚度测量技术直接测试大量蛋白分子聚集时形成蛋白生物膜的平均厚度或抗体抗原结合时生物膜平均厚度或折射率的变化, 是该方法的核心技术. 利用生物膜层反射光谱分析技术 Rifs (Reflectometric Interference Spectroscopy) 研制的非标记光学生物传感器就是沿着这一思路发展起来的新技术^[5-7].

本文通过对光纤生物免疫传感器关键技术的深入研究, 结合传感器表面蛋白分布的原子力显微镜(AFM)表征, 提出了利用生物膜层反射光谱曲线极值点波长变化实时监测抗体抗原免疫反应过程的新方法. 它能够很好地克服目前生物检测中膜厚极值算法的不足和光源特性等对系统测试精度的影响,

可连续采集试验数据, 实现对生物免疫反应过程的实时监测. 大量实验表明, 利用该方法得到的抗体抗原生物免疫反应动力曲线与反应过程有很好的对应关系.

1 测试原理及理论基础

利用光学生物传感器进行免疫检测时, 固定在传感器端面的生物活性蛋白分子与相匹配的蛋白发生特异性结合, 形成生物蛋白层. 当具有一定带宽的可见光入射生物蛋白层时, 根据薄膜干涉的简化模型和光线反射折射定律^[8,9], 如图1所示, 入射光线

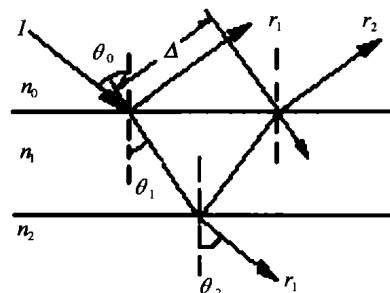


图1 薄膜干涉简化模型

Fig.1 Principle of film interference

I 在生物膜层表面被分成两部分, 形成第一部分反射光 r_1 , 并沿光纤传输到反射光谱仪干涉. 进入生物层的透射部分在生物层的第二个界面产生反射, 形成的第二部分反射光为 r_2 , r_1 、 r_2 产生的光程差为

$$\Delta = 2n_1 d \cos \theta_1 \quad (1)$$

由于使用光纤生物传感器进行免疫检测时, 其端面形成的生物膜层的折射率小于光纤纤芯折射率 ($n_2 = 1.33, n_1 = 1.46, n_0 = 1.5$)^[8], 而光束是由光密介质射向光疏介质, 所以, 两束反射光之间不存在半波损失的问题. 两束反射光由于几何关系上存在光程差而引起的相位变化为

$$\varphi = k\Delta = \frac{4\pi}{\lambda} n_1 d \cos \theta_1 \quad (2)$$

*教育部“教育振兴行动计划”和西安交通大学自然科学基金(2001001)资助项目

Tel: 029- 82663930 Email: yuxiao@mail. xjtu. edu. cn

收稿日期: 2003-11-19

当光束垂直入射或小角度入射生物层时,两束反射光 r_1, r_2 在空间相遇形成干涉条纹的光强分布为

$$I_R = I_1 + I_2 + 2\sqrt{I_1 I_2} \cos(4\pi nd/\lambda) \quad (3)$$

式中 I_1 和 I_2 分别表示生物层上下界面形成反射光的反射光强, d 表示形成生物膜层的平均厚度, n 为生物膜层的平均光折射率, λ 为入射光波长.

式(3)表明, 抗体抗原生物层上下界面形成的反射干涉光强 I_R 与入射光波长 λ 存在类余弦关系, 而且随着光波波长的增加, 类余弦曲线周期逐渐增大. 同时, 式(3)也表明其极大值和极小值的位置与薄膜的光学厚度 nd 密切相关. 当光学厚度 nd 增加时, 反射干涉光谱曲线整体向波长增加方向移动. 在实际生物检测应用中, 由于光源特性、光谱仪器件性能的影响, 以及形成的蛋白生物膜是建立在 SiO_2 光学薄膜基底上, 所以, 光谱仪测得的反射干涉光谱总是携带有光学薄膜基底的反射光、光源的光谱特性和线阵 CCD 探测器的频谱响应特性等信息, 无法得到生物层的绝对反射光谱. 在这种情况下, 通常都要将测得的光谱进行归一化处理来去除光源等因素的影响. 图 2 为计算机模拟结果.

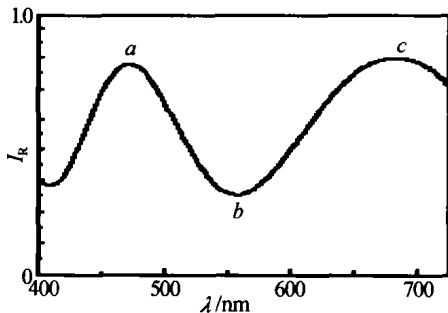


图 2 I_R - λ 关系曲线

Fig. 2 Relationship between I_R and λ

当 $\varphi = 2m\pi$ 或光程差 $\Delta = m\lambda$ 时, 其中 $m = 0, 1, 2, 3, \dots$, 根据式(3)可知, 反射光 r_1, r_2 的空间干涉光强为最大值, 形成亮条纹; 当 $\varphi = (2m + 1)\pi$ 或光程差 $\Delta = m\lambda + \frac{\lambda}{2}$ 时, 其中 $m = 0, 1, 2, 3, \dots$, 两束反射光的空间干涉光强为最小值, 形成暗条纹. 当采用宽带可见光入射生物膜层时, 利用光谱仪探测到的反射干涉光谱将出现极大、极小随波长周期性变化的曲线.

在图 2 中, 如果定义 $K = 2n_1 d/\lambda$ 为归一化反射干涉光谱曲线极值点的阶数, 每一个极值点对应一个 K 值, 则根据反射干涉光谱出现极值的条件可知, 当光束正入射或小角度入射生物薄膜时, 归一化反射干涉光谱极大值的位置为

$$\frac{4\pi}{\lambda_m} n_1 d = 2m\pi = 2K_m \pi \quad (m = 0, 1, 2, \dots) \quad (4)$$

极小值的位置为

$$\frac{4\pi}{\lambda_{m+1/2}} n_1 d = (2m + 1)\pi = 2K_{m+1/2} \pi \quad (m = 0, 1, 2, \dots) \quad (5)$$

在获取的归一化反射干涉光谱曲线上, 需要得到极值点 a, b, c 处相对应的波长值 $\lambda_a, \lambda_b, \lambda_c$. 用式 $K = 2n_1 d/\lambda$ 和式(4)、式(5), 就可以用膜厚极值算法计算出生物膜的厚度值.

生物免疫反应时, 为了提高检测的灵敏度, 反射光谱曲线往往只有一个或两个极值点, 而且抗体抗原蛋白的结合量是时间的函数, 随着时间增加, 蛋白聚集密度逐渐增大, 并趋于饱和. 蛋白分子的聚集密度不同, 形成的生物膜平均厚度不同, 生物膜层的光折射率也不相同^[8], 用上述公式很难得到生物膜的厚度值. 基于光学原理的生物传感器是通过检测免疫反应时生物膜光折射率、膜厚或其它物理参量的变化, 达到检测生物免疫反应动力学过程的目的. 所以, 如何准确地检测这一变化, 就成为研制非标记光学免疫传感器的核心技术. 本文利用建立的生物膜反射干涉光谱测试系统, 提出的检测生物膜反射光谱曲线任意极值点波长值微小变化的新方法, 实现了对抗原抗体分子结合与解离动力学过程的实时监测. 运用计算机分析得到的反射光谱曲线极值点波长变化量及变化的速率信息, 并与标准浓度曲线相比较, 就可以直接判定待测样本溶液中相对应抗原的浓度. 抗原浓度越大, 生物病毒越多, 病情越严重.

2 反射光谱测试分析系统

测试系统由宽带可见光光源、Y 型光纤、反射式光栅光谱仪、光纤生物传感器、样品流动注入及恒温系统和计算机数据采集及反射光谱分析组成, 如图 3 所示. 测试系统由 6.5 W 的钨卤素灯提供宽带可见光, 经耦合器进入 $\Phi 0.60$ mm 的 Y 型光纤和光纤生物传感器工作端, 并将生物膜层上下界面形成的反射光导入反射式光栅光谱仪.

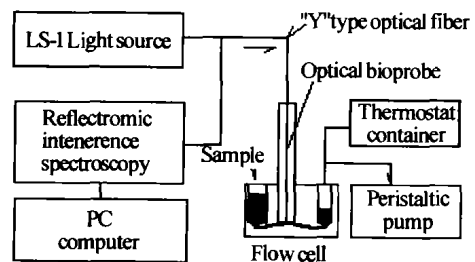


图 3 反射干涉光谱测试分析系统

Fig. 3 Sketch map of testing system

反射式光栅光谱仪选用美国 Ocean-optics 公司的 USB2000 光谱仪, 采用 USB 接口与计算机连接, 光学狭缝分别为 $50 \mu\text{m} / 10 \mu\text{m}$, 反射光栅为 1200 L/mm , 线阵 CCD 为 2048 像元素. 反射式光

栅光谱仪光路布置如图 4 所示,图 4 中 M_1 、 M_2 分别为准直镜和物镜.

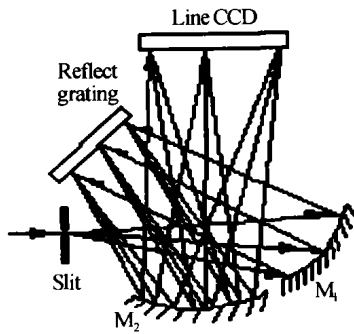


图 4 反射式光栅光谱仪的光路图
Fig.4 Structure of spectrometer

3 实验方法及结果

3.1 实验材料及仪器

1)羊抗兔-IgG 和兔-IgG 纯品粉剂由华美生物公司和北京中山生物技术公司提供,其中羊抗兔-IgG 为生物素化纯品试剂,兔-IgG 为纯品粉剂,在第四军医大学口腔生物分子学实验室用磷酸盐稀释缓冲液(0.01M,PH7.4)配制而成. 2)小牛血清白蛋白 BSA 和三氨基丙基三乙基硅烷(3-aminopropyltriethoxysilane)试剂,购自美国 Sigma 公司. 3) Rifs 测试系统. 4)原子力显微镜 AFM 为美国 Digital 公司产品, Nanoscope-IIa 型,运用共振模式测试. 5)其他试剂由第四军医大学口腔生物分子实验室提供.

3.2 实验方法及实验结果

生物免疫实验是在第四军医大学口腔生物分子研究室严格按生物实验规范进行. 实验开始前,首先将镀有光学膜系及 SiO_2 基底的光纤工作端用水虎鱼溶液(浓硫酸与双氧水份数比为 70%:30% 的混合溶液)浸泡 2 h 以上,用三次蒸馏水严格清洗工作端,去除水虎鱼残液、烘干,然后用干丙酮配好的三氨基丙基三乙基硅烷稀释液对清洁后的 SiO_2 表面进行硅烷化处理,使羊抗兔-IgG 抗体蛋白与 SiO_2 以共价键方式结合,以增加 SiO_2 表面与抗体蛋白的结合力. 包被时,将处理好的光纤工作端浸入质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的羊抗兔-IgG 稀释缓冲液中,在 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下流动包被 3h,用小鼠血清白蛋白 BSA(Bovine Serum Albumin)封闭光纤端面暴露的蛋白结合位点,最后,用 PBS (Phosphate Buffer Saline)磷酸盐洗涤缓冲液流动洗涤三次,去掉羊抗兔-IgG 蛋白分子层表面的非特异性结合蛋白. 这时,包被有羊抗兔-IgG 生物活性蛋白分子的光纤生物免疫传感器就制成了. 整个包被过程利用建立的反射干涉光谱测试分析系统可以实时监测. 图 5 为包被试验实际测试曲线. 图 6 为光纤生物传感器

SiO_2 表面包被蛋白分布的 AFM 表征结果.

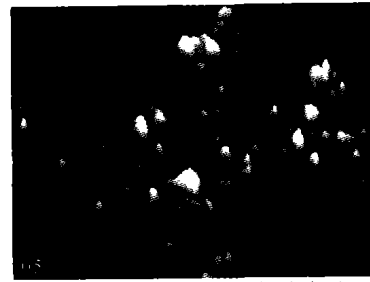


图 5 实际测试包被及反应动力曲线
Fig.5 Real phase shift of immunoreaction

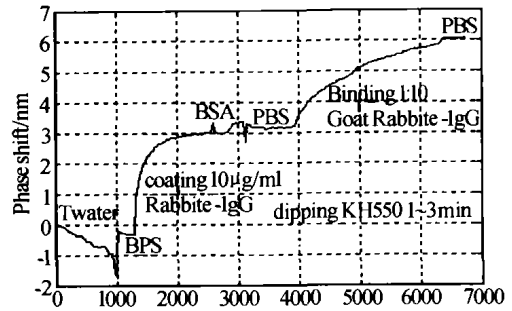


图 6 传感器表现蛋白分布的 AFM 表征
Fig.6 Distribution of biosensory by AFM method

生物检测时,将制备有生物活性敏感单元的光纤生物免疫传感器分别浸入质量浓度为 100 ng/ml 、10 ng/ml 的兔-IgG 流动注入待测样本液中,实时监测抗体抗原反应时生物膜反射干涉光谱曲线极值点位置的移动. 约 45 min 后极值点位置变化趋于饱和,说明抗体抗原免疫反应基本达到平衡. 用 PBS 洗涤缓冲液原位流动冲洗传感器反应工作端,去除非特异性结合的蛋白分子,最后测试的反射干涉光谱曲线极值点位置变化量即为生物反应的最大变化量. 图 7 为生物免疫反应实际测试结果.

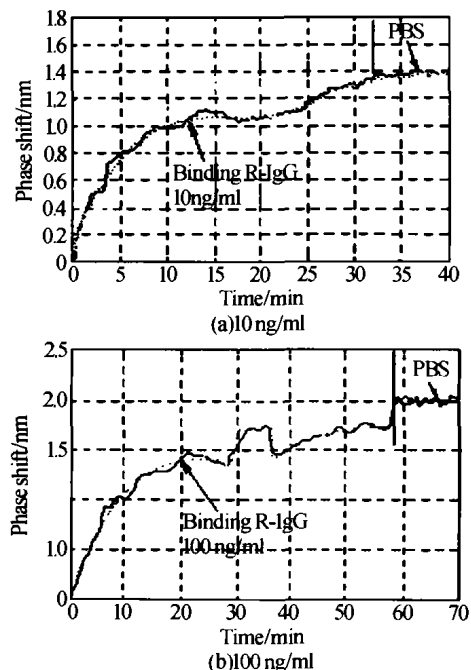


图 7 羊抗兔-IgG 与兔-IgG 蛋白实测免疫反应动力曲线
Fig.7 Dynamic curve of G-R-IgG and R-IgG immunoreaction

4 实验结果讨论

在包被过程中,刚开始时,由于传感器表面与蛋白的结合位点很多,蛋白分子结合速度很快,吸附动力曲线速率变化很大,15 分钟时蛋白吸附量基本达到饱和,15 分钟后结合速度曲线趋于平缓,剩余的结合位点继续与蛋白分子发生化学反应. 在蛋白相互作用下,形成的蛋白层也会发生一定量的物理次级吸附,所以在洗涤阶段,蛋白次级吸附部分在 PBS 流动注入洗涤时被洗掉,结合动力曲线上表现为一定程度的下降,但下降的幅度不大,说明次级吸附量很少,共价结合的蛋白分子很牢固.

通过对传感器端面包被蛋白分子分布的 AFM 表征,可以发现蛋白分子间仍有空位存在,蛋白表面包被密度不够高,导致生物膜反射光谱曲线极值点波长变化偏小. 所以,包被密度将直接影响 Rifs 系统对免疫反应测试的灵敏度.

从 Rifs 表征的抗体抗原免疫反应结合动力曲线图中可以看出,结合动力曲线具有明显的抗体抗原结合典型过程,即实验前的曲线,结合曲线、平衡曲线,洗涤时的解离曲线和实验后曲线. 经过大量重复实验和对不同类型抗体抗原蛋白免疫反应测试,发现不同浓度的抗体抗原免疫反应动力曲线其初始阶段结合速率和抗体抗原结合最大量之间具有明显的区别. 通过测定已知不同浓度的标准结合曲线,建立相应的数据库,在实际样品溶液测试时,比较结合曲线初始段的斜率和基本达到平衡后的结合量,就可以判定实际样品溶液中待测目标物的浓度. 大量重复试验表明,测试结果具有很好的重复性.

5 结论

通过对光纤生物免疫传感器关键技术的深入研究,研制成功的非标记光纤生物免疫传感器,最大限度地保持了蛋白的生物活性,活动元件少、无电接触、抗电磁干扰能力强,通过参数控制,能够获得很高的稳定性. 提出的利用生物膜层反射光谱曲线极值点波长变化实时监测抗体抗原免疫反应的新方法,能够很好地克服目前生物检测中膜厚极值算法

的不足和光源特性等对系统测试精度的影响,可连续采集试验数据,方法简单有效,大量重复实验表明,利用该方法得到的生物免疫反应动力曲线与抗体抗原反应过程有很好的对应关系,能够实现原位、实时地对抗体抗原结合过程进行表征,对免疫分析中抗体抗原结合动力学研究有非常大的帮助.

参考文献

- 1 Haake Hans-Martin, Schutz A, Gauglitz G. Label-free detection of biomolecular interaction by optical sensors. *Fresenius J Anal Chem*, 2000, **366**: 576 ~ 585
- 2 Marazuela M D, Moreno-Bondi M C. Fiber-optic biosensors-an review. *Anal Bioanal Chem*. 2002, **372**:664 ~ 682
- 3 司士辉. 生物传感器. 北京: 化学工业出版社, 2003. 70 ~ 75
Si S H. Biosensor. Beijing: Chemical Industry Press, 2003. 70 ~ 75
- 4 Anderson G P, et al. Multi-analyte interrogation using the fiber optica biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, **14** (10):771 ~ 777
- 5 Brecht A, Gauglitz G. Recent developments in optical transducers for chemical and biochemical applications. *Sensors and Actuators*, 1997, **B38-39**, 1 ~ 3
- 6 Cunningham B, Peter L, Bo L, et al. Colorimetric resonant reflection as a direct biochemical assay technique. *Sensors and Actuators*, 2002, **B81**:316 ~ 328
- 7 Hanel C, Gauglitz G. Comparison of reflectometric interference spectroscopy with other instruments for label-free optical detection. *Anal Bioanal Chem*, 2002, **372**:91 ~ 100
- 8 杨玉孝. 光纤生物免疫传感器原理及其应用研究. [博士学位论文]西安交通大学, 2003
Yang Y X. Research on the Theory of Label-free Optical Fiber Biosensor and its Applications. [Dissertation of Ph. D.] Xi'an Jiaotong University, 2003
- 9 石顺祥, 张海兴, 刘劲松. 物理光学与应用光学. 西安: 西安电子科技大学出版社, 1998. 120 ~ 130
Shi S X, Zhang H X, Liu J S. Physical Optics and Applied Optics. Xi'an: Xi'an Electronic Science and Technology University Publishing Company, 1998. 120 ~ 130

Study of the Key Technology of Optical Fiber Biosensor

Yang Yuxiao¹, Wang Yongfeng¹, Xiong Kaili¹, Liu Bin², Tan Yushan¹, Tan Hong³, Chen Duanjun³

1 *Institute of Laser & IR Applications, Xi'an Jiaotong Univ., Xi'an 710049*

2 *College of Stomatology, Fourth Military Medical Univ., Xi'an 710032*

3 *Biofiber Identification, 1031 Prouty Way, San Jose, CA95129, U. S. A*

Received date: 2003-11-19

Abstract By using of the Rifs (Reflectometric Interference Spectroscopy) system and the testing result of AFM (atomic force microscope), a novel method for directly monitoring the change of reflectometric spectrum extremum during antigen-antibody interactions is proposed. Experiments show that the process of immunoreactions can be directly monitored and the results can be saved continuously by this method. Compared with film thickness extremum method, this method is simple, sensitive and effective for immune dynamics study.

Keywords Biosensor; Spectrometer; Optical fiber biosensor; Immune dynamics study

Yang Yuxiao was born in 1961, an associate professor, teaching in Xi'an Jiaotong University. He obtained his Ph. D. from Xi'an Jiaotong University. More than 40 papers have been published in journals since 1982, his interests are in the fields of opto-electronic precision measurement and nondestructive testing.