

基于倏逝波的光纤生物传感器研究*

邓立新 冯莹 魏立安 柳琰

(国防科技大学光电科学与工程学院,长沙 410073)

摘要 构建了一种以光纤束作为激发光信号和荧光信号传输通道的光纤生物传感器结构. 根据光纤探针的倏逝波理论和模式匹配理论对光纤探针的几何形状进行了设计, 制作了数组光纤探针并需要对其中一部分进行荧光标记. 选择了光纤探针置于空气中和水溶液中两种情况, 对光纤传感器系统进行了信号检测实验, 对比标记了的和未标记的相同几何结构参数的光纤探针两者在系统中被探测的信号差异. 从二者的差别区分出系统所探测的倏逝波激发的荧光信号, 证明了该光纤传感器系统的可行性.

关键词 传感器技术; 生物传感器; 倏逝波; 光纤

中图分类号 TP212 **文献标识码** A

0 引言

目前, 国内外都对光纤生物传感器进行了大量的研制和开发^[1,2], 并取得了一定的进展^[3~5].

考虑到目前国内报道的光纤生物传感器系统结构通常只用光纤构造探针部分, 且一般很少考虑探针的优化设计, 而国外报道的系统其光路结构大多仍以分立的光学元件为主^[1], 这将导致信号在空间传播时损耗过多, 并且系统对光路的准直性要求很高, 降低了系统的灵敏度和鲁棒性. 为了进一步提高传感器系统的灵敏度^[6]以及增强其便携性, 本文在传感器的光路系统中采用了光纤束作为激发光信号及荧光信号的传输通道, 减少了荧光信号在空中的传播损耗和对光路的准直要求. 同时, 对光纤探针的几何形状进行了优化设计, 加工制作了五组组合锥型光纤探针. 在这五组光纤探针中, 每组包含两根几何参数完全相同的光纤探针, 其中一根进行 Cy5 荧光染料标记, 另一根保持空白留作对比之用. 将各组光纤探针连入传感器系统并进行了实验测试, 对此结构的光纤生物传感器的荧光探测能力进行了初步检验.

1 传感器原理与结构

1.1 倏逝波原理

当激发光在光纤探针中传播时, 将会在光纤的纤芯与包层界面处发生全反射, 由于入射光束和反射光束的相互作用, 在光纤的轴向形成驻波. 在纤芯和包层的界面, 驻波具有有限的电场幅度. 由于场强不能突然变到零, 所以它在低折射率的包层中

呈指数衰减

$$E = E_0 \exp(-\delta/d_p) \quad (1)$$

式中 δ 为到界面的距离. 存在于低折射率介质中的呈指数衰减的场就是所谓的倏逝场. 其电磁场辐射由透射深度 d_p , 即界面到场强为界面处幅度的 $1/e$ 处距离来表征, 其中

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi} \frac{1}{\sqrt{n_1^2 \sin^2 \theta - n_2^2}} \quad (2)$$

式(2)表明透射深度 d_p 依赖于入射光线与界面法线之间的夹角 θ , 其中 n_1 和 n_2 分别为全反射界面两侧介质的折射率, λ 为入射光波波长.

对于光纤生物传感器来说, 由于倏逝场的作用范围局限于光纤探针表面的一个薄层, 一般只有几十到几百个纳米, 只有结合在探针表面上的荧光分子才能被激发. 所以, 利用倏逝场来进行分子识别检测与传统的方法相比能很好地区分吸附与未吸附的分子, 省去了繁复的洗涤步骤. 将检测时间从常规实验室分析的几个小时减少到十几分钟^[8].

1.2 探针连接与设计

在传感器系统中, 采用如图 1 方法^[7]将光纤探针与传输激发光和荧光信号的光纤束连接起来, 其中, 光纤束由六根均匀排列、纤芯半径为 $250 \mu\text{m}$ 的塑料光纤和一根处于中心位置的单模石英光纤组成. 在该结构中, 利用单模光纤来传输激发光信号, 它与利用多模光纤传输信号相比具有信号更加稳定的特点. 六根排列在单模光纤周围的塑料光纤用来耦合与传输光纤探针端面出射的荧光信号, 这主要利用塑料光纤具有较大的数值孔径, 在空中信号收集能力强的特点. 为了保证光纤探针和光纤束的中心一致性, 在接头处采用直插的连接方法.

* 国防科技大学基础研究资助项目

Tel: 0731-4573760 Email: dlx2001dlx@sohu.com

收稿日期: 2004-09-16

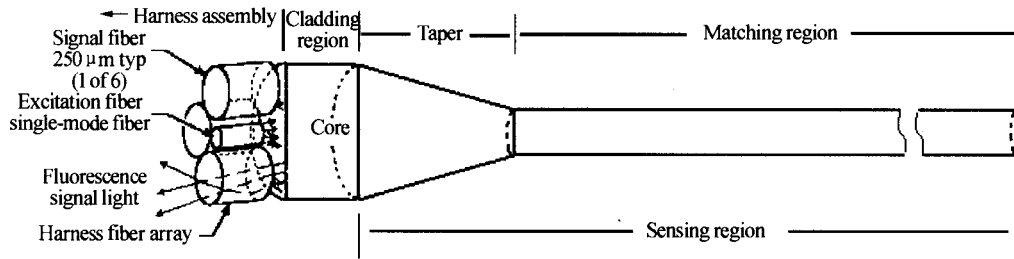


图 1 光纤探针与光纤束的连接
Fig. 1 Interconnection of fiber bundle and probe

由于光纤探针的几何结构对传感器的探测灵敏度至关重要,利用光纤的波导理论对光纤探针各部分的模式容量进行了理论分析计算,然后根据模式匹配的方法以及倏逝场能量最大化的原理对光纤探针进行了优化设计^[8],最后光纤探针均采用组合锥型结构(如图 2),以提高光纤探针的倏逝场能量和荧光耦合与传输效率,从而改善系统的检测门限和灵敏度. 光纤探针由专门设计的光纤探针加工装置进行制作,这对光纤探针的参数准确性和制作的重复性奠定了基础.

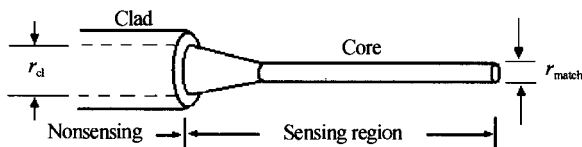


图 2 组合锥型光纤探针
Fig. 2 Configuration of combination taper probe

1.3 系统结构

本传感器系统结构如图 3,其中光纤探针由纤芯直径为 1 mm 的石英光纤加工而成,测量时光纤探针置于反应池中. 激光器所发出的激发光在由汇聚透镜耦合进单模光纤前,先由斩波器进行调制,然后再由单模石英光纤传输至光纤探针. 当激发光在光纤探针中传播时,倏逝波将对标记于光纤探针表面的荧光分子进行激发,产生的荧光信号经光纤探

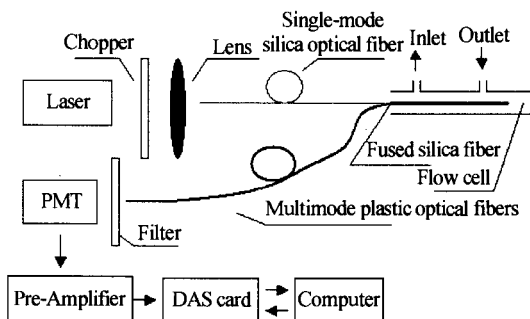


图 3 倏逝波光纤维传感器系统
Fig. 3 Instrumental setup of the fiber-optic evanescent wave biosensor

针耦合后再由多模塑料光纤束导出. 由于多模塑料光纤束在从光纤探针端面处耦合荧光信号时也将耦合从探针端面反射的激发光信号,所以在荧光信号经光电倍增管探测之前需用高通滤光片进行滤波. 光电倍增管所探测到的信号再经后续系统进行处理.

用作荧光标记的荧光染料为 Cy5,该染料的中心激发波长为 650 nm,激发的中心荧光波长为 670 nm. 选用波长为 635 nm、5 mW 的半导体激光器作为激发光源. 光电倍增管采用北京滨松公司的 CR131 型.

由于本实验所采用的 Cy5 荧光染料其吸收发光的峰值波长和发射荧光的峰值波长十分接近,其光谱见图 4,而荧光信号又很微弱,为了很好的区

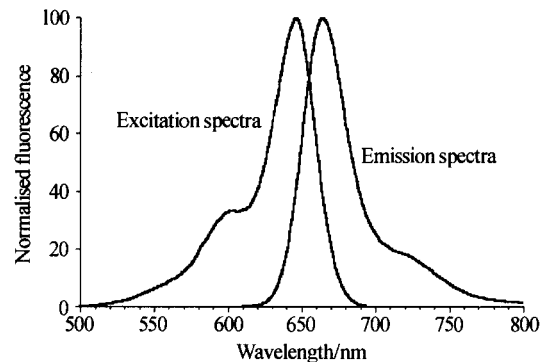


图 4 Cy5 荧光染料的激发和发射光谱图
Fig. 4 Excitation spectra and emission spectra of Cy5

分激发光信号和荧光信号,获得高的检测灵敏度,采取如下解决方法:

1) 选用波长在荧光染料的激发光谱内,但较其峰值激发波长稍短的窄带半导体激光器提供激发光,激发光的中心波长为 635.90 nm,带宽为 2 nm. 该方法可以使荧光信号和激发光信号的波长差适当加大,但不会对荧光的激发效率产生明显影响.

2) 选用专用滤光片,使滤光片对荧光信号的透过率尽量高而对激发光信号基本处于截止状态. 选用的滤光片其光谱透过率曲线如图 5,它在 635.90 nm 处的透过率小于 10^{-6} ,而对 670 nm 以上谱线的透过率大于 70%.

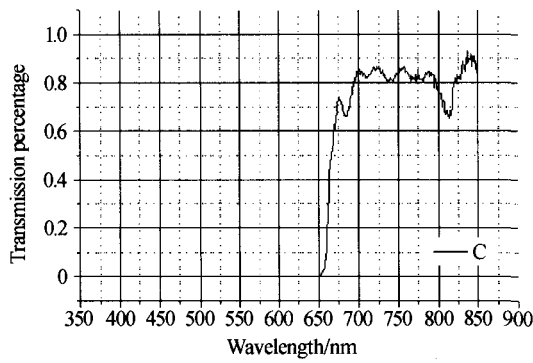


图5 滤光片的透过率曲线
Fig. 5 Spectral transmission curve of filter

2 实验方法与结果

在基于倏逝波的光纤生物传感器研究中,探测系统对生物分子的识别过程一般通过免疫反应来完成.但是,由于抗体抗原的制备和保存对实验条件有额外的要求,所以在该系统实验中,在基本原理完全一样的情况下,直接用 Cy5 荧光染料分子标记于光纤探针的表面,以代替通过抗体抗原免疫反应将荧光染料分子吸附于光纤探针表面的方法.虽然过程上存在差异,但这两种方法对于检测系统的倏逝波激发和探测荧光的效果并没有不同.

根据光纤的模式匹配理论以及对光纤探针的倏逝波分析,参照文献[8]的设计方法,将 10 根光纤探针按不同设定参数分 5 组进行加工,其中每组的两根光纤探针其加工过程和设定的几何结构参数完全相同.五组探针分别按 1、2、3、4、5 编号,将每组中的一根光纤探针用 Cy5 荧光染料进行标记,而另一根光纤探针不作任何标记.其中 Cy5 荧光染料的标记方法如下^[9]:

将光纤探针的一段除去包层后,光纤先用 1 mol/L NaOH 浸泡 10 min,然后用 1 mol/L HCl 浸泡 10 min.用去离子水冲洗 3 次后自然晾干.光纤随后被置入 10% APES(丙酮溶液)中作用 1 h,用丙酮漂洗 6 次洗去残余的 APES.然后将光纤放入 110℃ 烤箱中 4 h.交联时使用 2.3% 戊二醛溶液,室温交联 1 h.用 20 mmol/L 磷酸钾缓冲溶液 (PH7.0) 连续漂洗 6 次,再用去离子水漂洗后晾干,然后将光纤探针浸于 1 μ mol/L Cy5-dCTP 溶液 10 min 进行荧光染料分子的固定.

2.1 实验结果

将每组光纤探针中已标记和未标记的光纤探针分别连入系统,对比两根光纤探针对应的系统检测结果,从两根光纤探针的结果差异即可分析出系统所检测信号中探测到的荧光信号所占比例.

实验分两种情况进行,首先将光纤探针置于空

气中,分别测量五组光纤探针连入系统所检测到的信号,结果如表 1 和图 6.

表 1 光纤探针置于空气中的系统测量值

Probe	1#	2#	3#	4#	5#
Unlabelled probe	11.8V	17.6V	19.2V	20.3V	22.5V
Labeled probe	36.0V	46.8V	39.4V	39.4V	38.2V

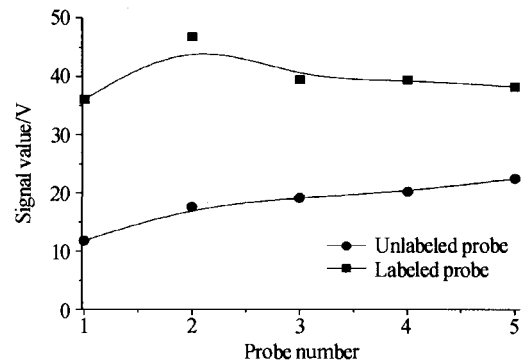


图6 光纤探针置于空气中的系统测量结果
Fig. 6 The measured results of system when probes in air

然后,再将五组光纤探针分别置于水溶液中,并对系统所检测到的探测信号值进行了测量.在测量过程中,为了防止激发光从光纤探针的底部端面直接射出,以及杂散信号从探针底部端面直接耦合进探针对测量造成干扰,对光纤探针的底部进行了密封处理.实验结果如表 2 和图 7.

表 2 光纤探针置于水溶液中的系统测量值

Probe	1#	2#	3#	4#	5#
Unlabelled probe	13.4V	11.0V	12.7V	14.1V	14.5V
Labeled probe	31.2V	40.8V	44.6V	37.6V	33.2V

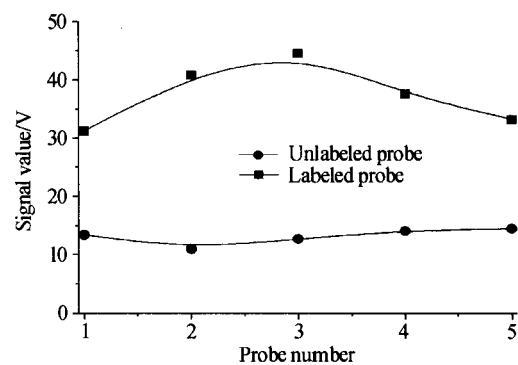


图7 光纤探针置于水溶液中的系统测量结果
Fig. 7 The measured results of system when probes in water

2.2 实验结果讨论

从实验结果可以看出,由于在进行光纤探针加工时选取的结构参数不同,所以不同组的光纤探针之间对信号的感应还是有较大的差异.但对于同一组中标记的和未标记的两根光纤探针而言,由于其加工过程和几何结构参数是完全相同的,其差别只是一根进行了荧光染料标记而另一根没有,所以它们两者之间的测量结果差异就表明了系统对标记于光纤探针表面荧光染料分子的倏逝波激发及其荧光信号的探测

效果. 通过对比系统对荧光染料标记的探针和未被荧光染料标记的探针的测量值可以看出, 它们之间的信号差异较大, 这说明系统所探测到的荧光信号明显, 整个传感器系统具有很好的可行性.

实验分光纤探针置于空气中和在水溶液中两种情况进行. 通过实验结果对比, 可以发现将光纤探针置于水溶液中的实验结果要比其置于空气中的效果要好, 系统所探测的荧光信号更加明显. 究其原因, 这是因为在开始的光纤探针加工过程中, 对光纤探针的参数设计主要是以水溶液的折射率为计算参照的, 实验的光纤探针结构参数较为接近光纤探针置于水溶液中时的最优匹配参数, 而与光纤探针置于空气中的情况有较大的差别.

从整个实验结果可以发现, 对于光纤探针置于空气中和水溶液中两种情况以及对不同参数的光纤探针组而言, 虽然在信号幅度上存在差异, 但整个实验现象具有很好的一致性, 与理论分析情况相吻合.

3 结论

在基于倏逝波激发的光纤生物传感器研究中, 由于倏逝波的能量非常小, 所产生的荧光信号十分微弱, 所以能否成功的探测到倏逝波所激发和收集的荧光信号就成为整个系统的关键部分. 在本实验中, 为了减少荧光信号在空中的传播损耗, 增强系统的简便性和灵敏性, 采用了光纤束作为激发光信号和荧光信号的传输通道. 同时, 为了提高系统的灵敏度, 在系统的光纤探针部分, 根据光波导的模式传输理论和倏逝波原理进行了专门的探针设计^[8]. 为此还制作了专门的光纤探针制作装置. 利用该装置, 可以根据设计给定的几何参数进行光纤探针的制作. 在系统实验中, 分探针置于空气中和水溶液中两种情况分别进行了系统检测, 从实验的结果来看, 整个实验的结果具有很好的一致性, 这表明该系统在倏逝波激发和探测荧光信号方面具有良好的效果.

参考文献

- 1 George P A, Keeley D K, Kristin L G, *et al.* Multi-analyte interrogation using the fiber optic biosensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 2000, **14**(10):771~777
- 2 孙艳, 孙峰, 杨玉孝, 等. 用于纳米生物膜层厚度测试的光纤生物传感器. *光子学报*, 2002, **31**(6):657~661
Sun Y, Sun F, Yang Y X, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(6):657~661
- 3 Anderson G P, Rowe-Taitt C A, Ligler F S. Raptor: A Portable, Automated Biosensor Proceedings of the First Joint Conference on Point Detection for Chemical and Biological Defense, Williamsburg, Virginia, 23 ~ 27 October, 2000. 138~144
- 4 翟俊辉, 黄惠杰, 杨瑞馥, 等. 光纤生物传感器用于核酸的特异性检测. *分析化学*, 2003, **31**(1):34~37
Zhai J H, Huang H J, Yang R F, *et al.* *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2003, **31**(1):34~37
- 5 杨玉孝, 王永峰, 熊开利, 等. 光纤生物免疫传感器原理及关键技术研究. *光子学报*, 2005, **34**(1):121~125
Yang Y X, Wang Y F, Xiong K L, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2005, **34**(2):121~125
- 6 徐国雄, 黄震, 倪旭翔, 等. 生物芯片检测系统中荧光信号强度及系统灵敏度分析. *光子学报*, 2004, **33**(10):1192~1195
Xu G X, Huang Z, Ni X X, *et al.* *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(10):1192~1195
- 7 Golden J P, Saaski E W. Portable multichannel fiber optic biosensor for field detection. *Opt Eng*, 1997, **36**(4):1008~1013
- 8 邓立新, 冯莹, 唐波. 光纤免疫生物传感器的探针设计. *传感技术学报*, 2004, **17**(3):520~525
Deng L X, Feng Y, Tang B. *Chinese Journal of Sensors and Actuators*, 2004, **17**(3):520~525
- 9 Giacomini C, Villarino A, Franco-Fraguas L. Immobilization of β -galactosidase from *Kluyveromyces lactis* on silics and agarose: comparison of different methods. *J Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998, **4**(3):313~327

The Research of Fiber Optic Evanescent Wave Biosensor

Deng Lixin, Feng Ying, Wei Li'an, Liu Long

College of photoelectric Science and Engineering, National University of Defense Technology, Changsha 410073

Received date: 2004-09-16

Abstract A fiber-optic evanescent wave biosensor has been developed which transmitted excitation laser beam and fluorescence signal through fiber bundle. Based on the theory of evanescent wave and mode matching in probe, the geometric figure of probe was designed, and five group probes were made. According to needs, some of them with Cy5 were also labeled. Then, probes were put in air and water, and the signal of the fiber-optic biosensor was examined respectively. Comparing the different results between labeled probe and unlabeled one, the existing of fluorescence signal in fiber-optic biosensor detected signal and the feasibility of the designed fiber-optic biosensor were confirmed and proved respectively.

Keywords Sensor technology; Biosensor; Evanescent wave; Fiber



Deng Lixin was born in 1973. He obtained his B. S. and M. S. degrees from National University of Defense Technology in 1995 and 2001 respectively. He is currently pursuing the Ph. D. degree in the National University of Defense Technology. His main research interests focus on fiber optic technologies and biosensors.