

引用格式: SHI Sheng-hui, WANG Xin, LUO Bin-bin, *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

# 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

石胜辉<sup>1</sup>, 王鑫<sup>1</sup>, 罗彬彬<sup>1</sup>, 王亚杰<sup>1</sup>, 刘志江<sup>1</sup>, 聂青林<sup>1</sup>, 马培杰<sup>2</sup>, 吕清明<sup>1</sup>,  
鲁友铭<sup>2</sup>, 吴胜昔<sup>2</sup>, 赵明富<sup>1</sup>, 巫涛江<sup>3</sup>

(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:**提出了一种使用基于氧化石墨烯修饰包层腐蚀型长周期光纤光栅应用于检测禽流感病毒的免疫传感器. 氧化石墨烯通过氢键结合在包层腐蚀型长周期光纤光栅表面上, 并通过共价键将禽流感病毒单克隆抗体与氧化石墨烯表面的羧基相结合. 利用氧化石墨烯上吸附的禽流感病毒单克隆抗体与禽流感病毒抗原的特异性结合引起的长周期光纤光栅谐振波长变化进行检测. 结果表明, 该氧化石墨烯修饰包层腐蚀型长周期光纤光栅免疫传感器对禽流感病毒的检测极限为 40 ng/mL, 传感器的解离常数为  $\sim 1.6 \times 10^{-7}$  mol/L, 检测范围为 40 ng/mL  $\sim$  200  $\mu$ g/mL. 通过对禽流感病毒空白尿囊液、禽流感病毒尿囊液和新城疫病毒尿囊液进行检测, 表明免疫传感器具有良好的特异性和临床性. 该免疫传感器具有应用于禽流感病毒快速和早期诊断的可能.

**关键词:** 光纤传感; 免疫传感器; 长周期光纤光栅; 氧化石墨烯; 禽流感病毒

中图分类号: TN253

文献标识码: A

doi: 10.3788/gzxb20204901.0106002

## Avian Influenza Virus Immunosensor Based on Etched Long Period Fiber Grating Coated with Graphene Oxide

SHI Sheng-hui<sup>1</sup>, WANG Xin<sup>1</sup>, LUO Bin-bin<sup>1</sup>, WANG Ya-jie<sup>1</sup>, LIU Zhi-jiang<sup>1</sup>, NIE Qing-lin<sup>1</sup>,  
MA Pei-jie<sup>2</sup>, LÜ Qing-ming<sup>1</sup>, LU You-ming<sup>2</sup>, WU Sheng-xi<sup>2</sup>, ZHAO Ming-fu<sup>1</sup>, WU Tao-jiang<sup>3</sup>

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

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

(3 Chongqing Energy College, Chongqing 402247, China)

**Abstract:** An immunosensor based on graphene oxide modified cladding etched long-period fiber grating sensor for detection of avian influenza virus is presented in this paper. Graphene oxide is coated on the surface of long-period fiber grating by hydrogen bonding using sodium hydroxide and the avian influenza virus monoclonal antibodies are combined with graphene oxide surface by a covalent bond. The resonant

基金项目: 国家自然科学基金 (Nos. 61875026, 61505017), 重庆市科委基础研究与前沿探索项目 (Nos. cstc 2019jcyj-msxmX0093, cstc2018jcyjAX0122), 重庆市教育委员会科学技术研究计划青年项目 (No. KJQN201801121), 重庆理工大学研究生创新项目 (Nos. ycx2018235, ycx2018231)

第一作者: 石胜辉 (1980—), 男, 讲师, 博士, 主要研究方向为光纤传感技术. Email: shshill@cqut.edu.cn

导师 (通讯作者): 罗彬彬 (1981—), 男, 教授, 博士, 主要研究方向为光纤传感技术. Email: luobinbin@cqut.edu.cn

收稿日期: 2019-07-25; 录用日期: 2019-09-18

<http://www.photon.ac.cn>

wavelength change of long-period fiber grating caused by the specific binding of avian influenza virus monoclonal antibody adsorbed on graphene oxide to avian influenza virus antigen was used for detection. The experimental results show that the limit of detection of the graphene oxide modified cladding etched long-period fiber grating immunosensor can reach 40 ng/mL, the dissociation constant  $\sim 1.6 \times 10^{-7}$  M and the detection range 40 ng/mL  $\sim 200 \mu\text{g/mL}$ . The detection results of avian influenza virus in avian influenza virus blank allantoic fluid, Avian influenza virus allantoic fluid and Newcastle disease virus allantoic fluid show that the immunosensor has good specificity and clinical characteristics. Therefore, the immunosensor could be potentially applied in the fast detection and early diagnosis of avian influenza virus.

**Key words:** Fiber optic sensor; Immunosensor; Long period fiber grating; Graphene oxide; Avian influenza virus

**OCIS Codes:** 060.2370; 120.0280; 060.2370; 060.3735; 280.1415

## 0 引言

禽流感是由禽流感病毒(Avian Influenza Virus, AIV)引起的一种急性传染病.它的爆发和流行是全球公共卫生的新威胁,因为这种疾病通常会导致高发病率和潜在死亡率.目前,关于禽流感的检测方法主要包括:病毒分离鉴定法<sup>[1]</sup>、血清学鉴定法<sup>[2]</sup>、分子生物学鉴定法<sup>[3]</sup>、基因芯片法<sup>[4]</sup>、新一代高通量测序法<sup>[5]</sup>和生物传感器检测技术等.然而,病毒分离法的分离培养和血清鉴定需要复杂的程序,这些程序耗时长(从数天到数周)<sup>[6]</sup>,且操作繁琐.酶联免疫吸附试验具有灵敏性、通用性且可自动检测等优点<sup>[7,8]</sup>,但它是不可重复使用的.琼脂扩散法虽操作方法较简单,但其敏感性较差,容易受反应浓度和时间的影响,出现一定的错误<sup>[9]</sup>.分子生物学鉴定法虽然可以提高检测的敏感性和特异性,但其敏感性和特异性依赖于对禽流感病毒 RNA 的控制,其中一些手段还存在交叉污染、操作繁琐和成本高的缺点.免疫荧光技术<sup>[10]</sup>虽然具有快速、简便、敏感性好,而且费用较低,但是需要注意的是如何避免和降低标本中出现的假阳性(非特异性荧光)问题.以上的一些免疫检测方法虽然可以直接检测病毒抗原,但需要标记且会对被测生物分子造成损伤,同时也会使操作者直接接触放射性元素,使用上存在局限性.新一代高通量测序法虽然精度高,错误机率小,但其检测需要复杂的仪器设备.因此,如何快速、准确诊断和及时检测可能爆发的禽流感病毒,研究一种能够快速、准确、重复性好的检测禽流感的方法已成为科研工作者的一项严峻挑战.

由于光纤光栅传感器具有抗电磁干扰、小型化、多路复用、无标记和实时检测等优点,光纤 Bragg 光栅(Fiber Bragg Grating, FBG)、长周期光纤光栅(Long FBG, LFBG)和倾斜光纤 Bragg 光栅(Tilted FBG, TFBG)已被广泛研究用于化学和生物医学应用<sup>[11-15]</sup>.国内外研究者主要通过用薄膜材料涂覆光纤光栅表面来改善折射率灵敏度,如 Langmuir-Blodgett 薄膜<sup>[16]</sup>、碳纳米管<sup>[17]</sup>、氧化锌<sup>[18]</sup>、二氧化钛<sup>[19]</sup>等.目前,以石墨烯、过渡金属二硫化物和拓扑绝缘体为代表的二维纳米材料,由于它们具有独特的机械、电子、光学和化学性质而备受关注<sup>[20-23]</sup>.氧化石墨烯(Graphene Oxide, GO)是一种石墨的氧化衍生物,有很强的亲水性、水溶性及生物相容性,由于其基底平面和片状边缘富含各种含氧基团,如羟基、环氧基、羧基等,使得 GO 可通过共价键固定各种生物分子<sup>[24]</sup>,此外,GO 还可通过非共价相互作用如氢键, $\pi$ - $\pi$ 堆积和静电相互作用来吸附生物分子.WANG Y 等<sup>[25]</sup>在倾斜角为  $10^\circ$  的 TFBG 上修饰 GO 用于相对湿度(RH)传感,灵敏度为 0.129 dB/% RH.JIANG B 等<sup>[26]</sup>在  $82^\circ$  倾斜光纤光栅上涂覆 GO,用于检测低浓度葡萄糖溶液,在  $0 \sim 8$  mmol/L 的浓度范围内其灵敏度为 0.25 nm/(mmol/L).LUO B 等<sup>[27]</sup>在  $81^\circ$  倾斜光纤光栅上涂覆 GO,用于对牛血清蛋白检测,在 1.5 nmol/L 到 75 nmol/L 的检测范围内,其检测极限为 0.88 nmol/L.在此,本文提出一种基于 GO 涂覆腐蚀型长周期光纤光栅(GO-eLPFG)检测 AIV 病毒的免疫传感器.首先羟基化 eLPFG 表面,GO 的羧基基团通过氢键稳定的固定在光栅表面.通过场发射扫描电子显微镜和原子力显微镜对光纤的表面形貌进行表征,进一步对 GO-eLPFG 进行表面功能化处理,实现其对 AIV 病毒的无标记和特异性检测.

## 1 原理及方法

### 1.1 试剂及制备

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.氧化石墨烯溶液(浓度

2 mg/mL),购自南京先丰纳米材料科技有限公司;氢氟酸(HF)溶液(浓度 40%)、氢氧化钠(NaOH,纯度 99%)、稀硝酸溶液(HNO<sub>3</sub>,5%)、无水乙醇(C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>O)、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;磷酸盐缓冲液(PBS,0.01 mol/L,pH=7.4)购自武汉生物技术有限公司;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,将禽流感病毒液注入 9 日龄的 SPF 鸡胚中,37℃培养约 72 h 后,观察后取出鸡胚,4℃放置 24 h,使血管收缩防止出血,用取液器收取尿囊液,5 000 r/min 离心 5 min 后,取上清液,获得 AIV 尿囊液;新城疫病毒(NDV-AV29)株,购自中国兽医药品监察所,取 9 日龄 SPF 鸡胚,每个鸡胚尿囊腔接种 NDV-AV29 株稀释 0.2 mL,37℃孵育,在接毒后 48 h 内,获得 NDV 尿囊液.

## 1.2 传感原理及实验系统

LPFG 是利用紫外光照射周期性振幅掩模板对载氢掺锗光纤曝光导致光纤纤芯折射率调制而形成.几十到数百微米的折射率调制使得光纤纤芯中前向传输的纤芯导模耦合到同向传输的不同阶次包层模中,包层模的高衰减导致光纤传输谱中出现一系列以离散波长为中心的谐振峰.谐振峰半高全宽通常为 10~20 nm,其谐振波长、纤芯模和包层模的有效折射率的关系的相位匹配条件为<sup>[28]</sup>

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

式中, $\lambda_{\text{res}}$ 为谐振峰中心波长, $n_{\text{eff}}^{\text{co}}$ 、 $n_{\text{eff}}^{\text{cl},m}$ 分别为光纤纤芯基模和  $m$  次包层模的有效折射率, $\Lambda$  为 LPFG 周期.LPFG 的折射率(Refractive Index, RI)灵敏度取决于相位匹配条件,由  $\Lambda$  和纤芯模与包层模有效折射率之差共同决定.包层模有效折射率取决于包层折射率(Cladding Refractive Index, CRI)和周围介质折射率(Surrounding Refractive Index, SRI)的差值.

沉积高折射率薄层材料是提高 LPFG 传感器 SRI 灵敏度的典型方法.当在 LPFG 表面涂覆纳米薄膜时,此时,SRI 对  $\lambda_{\text{res}}$  的影响可表示为<sup>[28]</sup>

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

式中, $n_{\text{sur}}$ 是 SRI, $\gamma$  为波导色散, $\Gamma_{\text{RI}}$ 是波导色散对环境的依赖关系,其关系可表示为<sup>[29]</sup>

$$\Gamma_{\text{RI}} = - \frac{u_m^2 \lambda_{\text{res}}^3 n_{\text{sur}}}{8\pi^3 r_{\text{cl}}^3 n_{\text{cl}} (n_{\text{eff}}^{\text{co}} - n_{\text{eff}}^{\text{cl},m}) (n_{\text{cl}}^2 - n_{\text{sur}}^2)^{3/2}} \quad (3)$$

式中, $u_m$  是零阶贝塞尔方程( $J(0)_u = 0$ )的  $m$  阶根, $r_{\text{cl}}$ 和  $n_{\text{cl}}$ 分别表示光纤包层的半径和折射率.当 SRI 小于 CRI 时, $n_{\text{eff}}^{\text{cl},m}$  将随 SRI 增大而增大,由于纤芯直径远小于包层直径, $n_{\text{eff}}^{\text{co}}$  不受 SRI 影响,根据式(1),SRI 增大 LPFG 谐振波长将发生蓝移现象.当 SRI 值接近 CRI 时,灵敏度达到最大值,同时,高阶模的灵敏度比低阶模更高<sup>[30]</sup>.当 SRI 超过 CRI 时,相位匹配条件不再满足,包层-外部介质界面将失去全内反射条件,因此,在包层中传播的导模将变为辐射模或泄露包层模.在这种情况下,耦合强度变化将被反射回包层-周围介质界面的光能量所影响.同时,根据式(3)可知, $\Gamma_{\text{RI}}$ 与  $r^3$  成反比关系,因此对 LPFG 进行腐蚀减小包层半径  $r$ ,可提高其传感器的 SRI 灵敏度.

图 1 是用于监测 GO-eLPFG 传感器的传输光谱的实验系统示意图.从光纤光栅解调系统(MOI-SM125,波长分辨率 5 pm,波长精度  $\pm 1$  pm)的一个输出端(CH1)发射的扫频激光(1 510 nm~1 590 nm,频率 1 Hz)进入 SMF-28 单模光纤,传输到光纤隔离器,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.GO-eLPFG 传感器的两端固定在两个固定的载玻片上,中间是一个可移动的载玻片,用来携带被测液体.最后通过单模光纤连接到光纤光栅解调系统的另一个通道(CH2),解调后的透射光谱通过串口输出到计算机上实时显示.

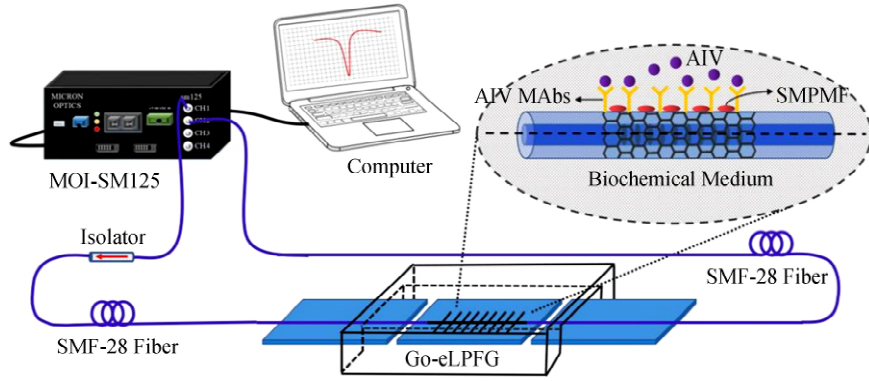


图1 实验系统示意图

Fig.1 Schematic illustration of measurement system

### 1.3 GO-eLPFG 传感器制作及表面功能化

实验所使用的 LPFG 采用逐点法,在负载  $H_2$  的单模光纤中通过紫外曝光法写入。在紫外曝光后,将光栅在  $85^\circ\text{C}$  下退火 24 h 除去残留的氢以稳定其光学性质。所制作的 LPFG 光栅周期为  $\sim 568 \mu\text{m}$ , 长度为 1 cm, 损耗峰强度为  $\sim 30 \text{ dB}$ , 3dB 带宽为  $\sim 7.5 \text{ nm}$ 。在室温 ( $25^\circ\text{C}$ ) 下, 使用 20% 的 HF 溶液对其包层进行腐蚀, 测得在该浓度下光纤光栅的腐蚀速率为  $\sim 0.71 \mu\text{m}/\text{min}$ 。通过控制腐蚀时间得到直径为  $\sim 114 \mu\text{m}$  的 eLPFG, 其折射率灵敏度为  $\sim -21.05 \text{ nm}/\text{RIU}$ , 较未腐蚀的 LPFG 提高了  $\sim 1.09$  倍, 由于光纤本身材质问题, 随着光纤半径的减小, LPFG 再经过羟基化处理后容易发生栅区断裂, 另外, 随着光纤半径的减小, 光纤本身表面积减小, 这将会导致对 AIV 抗原的检测范围缩小, 因此,  $\sim 114 \mu\text{m}$  的 eLPFG 是综合考虑折射率灵敏度、光纤材料以及后续实验操作较为合理的选择。接着, 使用浓度为 5% 的  $\text{HNO}_3$  溶液对浸泡光栅 2 h, 再用超纯水和无水乙醇彻底清洗。然后, 在  $40^\circ\text{C}$  的恒温箱内, 将该 eLPFG 浸入 0.2 mol/L 的 NaOH 溶液  $\sim 3.5 \text{ h}$ , 再于室温下继续浸泡 0.5 h, 以激活 eLPFG 表面的  $-\text{OH}$  基团, 用超纯水反复冲洗光栅表面, 去除多余杂质, 再置于  $50^\circ\text{C}$  的对流烘干机中干燥 10 min。最后, 用浓度为 2 mg/mL 的 GO 溶液在室温下浸泡 eLPFG 传感器 12 h 后, 用超纯水和无水乙醇反复冲洗其表面, 冲去未结合的 GO, 最终得到 GO-eLPFG 传感器。

将 EDC(0.004 g) 和 NHS(0.002 g) 以 2 : 1 的质量比溶于 200  $\mu\text{L}$  超纯水中, 然后取 MES 缓冲液 300  $\mu\text{L}$  混合均匀, 得到 EDC/NHS 活化剂; 然后, 在室温下将 GO-eLPFG 传感器浸入 300  $\mu\text{L}$  的 EDC/NHS 活化剂中 1 h, 以活化 GO-eLPFG 表面的  $-\text{COOH}$  基团; 接着在室温下将 GO-eLPFG 传感器置于 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的 AIV-MAbs 溶液(300  $\mu\text{L}$ ) 中 1 h, 然后用 PBS 反复冲洗传感器以去除其表面未结合的 AIV-MAbs; 最后, 用配置好的 SMPSF 封闭液浸泡 GO-eLPFG 传感器 1 h, 以封闭光栅表面未被 AIV-MAbs 封闭的羧基位点。整个表面修饰过程如图 2 所示。

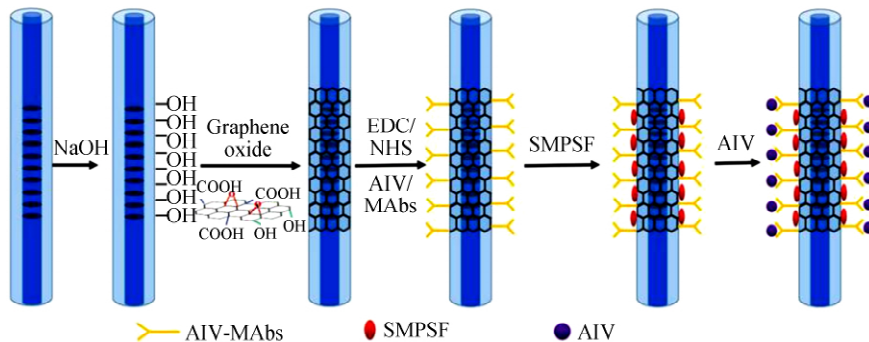


图2 GO-eLPFG 免疫传感器制作过程

Fig.2 Fabrication process of GO-eLPFG Immunosensors

## 2 结果与讨论

### 2.1 eLPFG 表面的表征及修饰过程的光谱监测

用场发射扫描电子显微镜(FESEM, ZEISS SIGMA HD)对沉积 GO 后的 eLPFG 的表面形貌进行表征,

如图 3(a) 所示,可见,GO 能够比较均匀地沉积在光栅表面.此外,还使用和原子力显微镜 (AFM, Park NX10) 对该传感器的表面形貌进行了检测,如 3(b) 所示.该传感器的平均表面粗糙度  $R_a = 12.152 \text{ nm}$ .

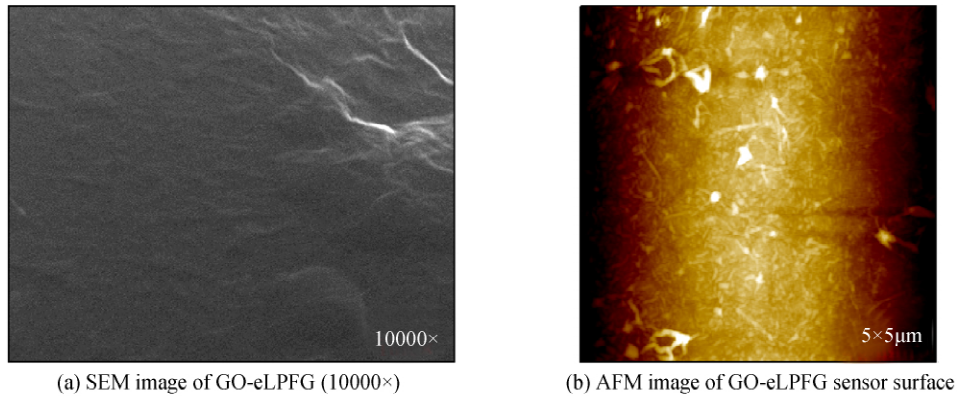


图 3 GO-eLPFG 的表面形貌特征

Fig.3 Characterization of surface morphology of GO-eLPFG

实验中对 eLPFG 的每个表面修饰进行了光谱监测,每个步骤的光谱测试都在 PBS 中进行,实验检测中,使用的是 eLPFG 的  $LP_{07}$  包层模.图 4(a) 和 (b) 为从裸光栅开始到 SMPSF 封闭 GO 表面多余位点的光谱演变和相应的谐振波长漂移量大小.由图可知,从裸 LPFG 到羟基化再到 GO 沉积于 eLPFG 表面的过程中,  $LP_{07}$  包层模谐振波长红移量和耦合强度变化量分别为  $\sim 895 \text{ pm}$  和  $\sim 4.2376 \text{ dB}$ .GO 薄膜复折射率的实部影响 eLPFG 包层模色散方程,由式(1)可知,GO 涂覆层会引起 eLPFG 包层模有效折射率  $n_{\text{eff}}^{\text{cl}}$  减小,从而导致 LPFG 的谐振波长红移;而 GO 复折射率的虚部则表示 GO 材料的吸收特性,在光栅表面涂覆 GO 后,增加了传播过程中的光损失,导致 LPFG 传输损耗增加,谐振峰强度增强.

从对 GO 表面-COOH 基团进行活化处理,到固定 AIV-MABs 再到用 SMPSF 封闭 GO 表面多余位点的过程中,eLPFG 的  $LP_{07}$  包层模谐振波长变化量和耦合强度变化量分别为  $\sim 163 \text{ pm}$  和  $\sim 0.3691 \text{ dB}$ .此过程中,谐振波长发生蓝移,这是由于 EDC/NHS 活化剂、AIV 抗体及 SMPSF 封闭液相对于 GO(单层 GO 的厚度为  $\sim 1.1 \pm 0.2 \text{ nm}^{[31]}$ ) 均为较厚的涂层,随着涂层厚度的增加,eLPFG 包层模的有效折射率增加,根据式(1),其谐振波长发生蓝移.

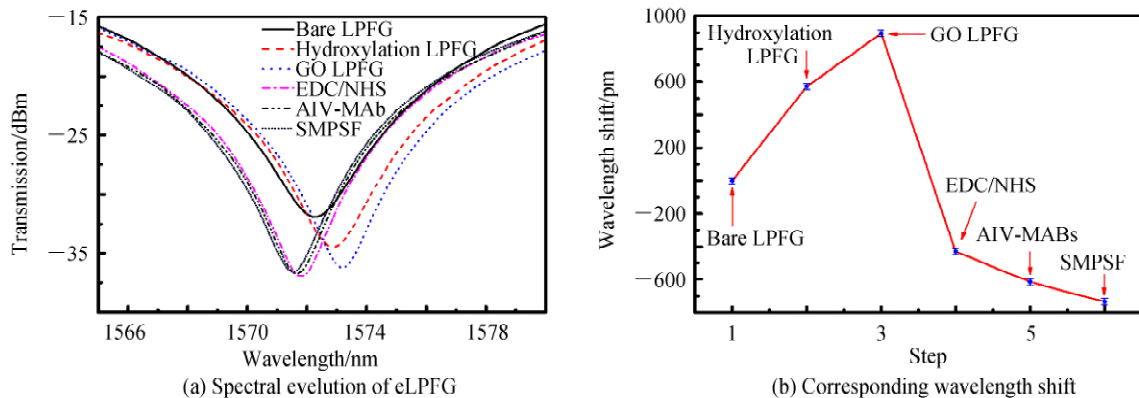


图 4 GO-eLPFG 传感器表面修饰过程的光谱和波长变化

Fig.4 Spectrum and wavelength changes in the surface modification of GO-eLPFG sensor

## 2.2 GO-eLPFG 免疫传感器检测 AIV 溶液

利用图 1 所示的实验系统,将所制作 GO-eLPFG 的 AIV 免疫传感器对不同浓度等级的 AIV 抗原溶液进行检测.首先,加入 PBS 溶液以覆盖光栅区域,并记录对应的谐振波长作为参考波长.接着,依次使用  $300 \mu\text{L}$  不同浓度等级的 AIV 抗原溶液 (PBS 配置,  $10 \text{ ng/mL}$ 、 $20 \text{ ng/mL}$ 、 $50 \text{ ng/mL}$ 、 $100 \text{ ng/mL}$ 、 $200 \text{ ng/mL}$ 、 $500 \text{ ng/mL}$ 、 $1 \mu\text{g/mL}$ 、 $5 \mu\text{g/mL}$ 、 $10 \mu\text{g/mL}$ 、 $25 \mu\text{g/mL}$ 、 $50 \mu\text{g/mL}$ 、 $100 \mu\text{g/mL}$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$ 、 $500 \mu\text{g/mL}$ ) 进行免疫检测,通过光纤光栅解调仪监测每个浓度等级的免疫反应过程.在每个浓度等级的 AIV 抗原溶液的

监测过程中,待光谱仪的光谱趋于稳定之后,记录 5 次光谱数据,取它们谐振波长的均值为该浓度下对应的传感器响应波长;然后,撤下 AIV 抗原溶液并用 PBS 冲洗光栅以去除其表面未结合的抗原,便可以开始下一个更高浓度等级的 AIV 抗原溶液的免疫检测。

图 5(a)和(b)分别为 GO-eLPFG 光谱随 AIV 抗原溶液浓度增大的演化及谐振波长在整个检测过程中随时间变化的蓝移过程.结果表明,当 AIV 抗原溶液的浓度从 10 ng/mL 增大至 500  $\mu\text{g/mL}$  时,谐振波长的总蓝移量为 $\sim 425$  pm,当浓度为 200  $\mu\text{g/mL}$  时,谐振波长总变化量为 $\sim 420$  pm;当浓度大于 200  $\mu\text{g/mL}$  时,谐振波长变化量趋于饱和,这表明固定在 GO-eLPFG 表面的 AIV-MAbs 位点被 AIV 抗原完全结合.同时,在上述免疫测试中,发现光谱在每个测试浓度水平仅需 10~20 min 就能达到稳定状态,这表明所提出的免疫传感器对 AIV 抗原具有快速检测的能力。

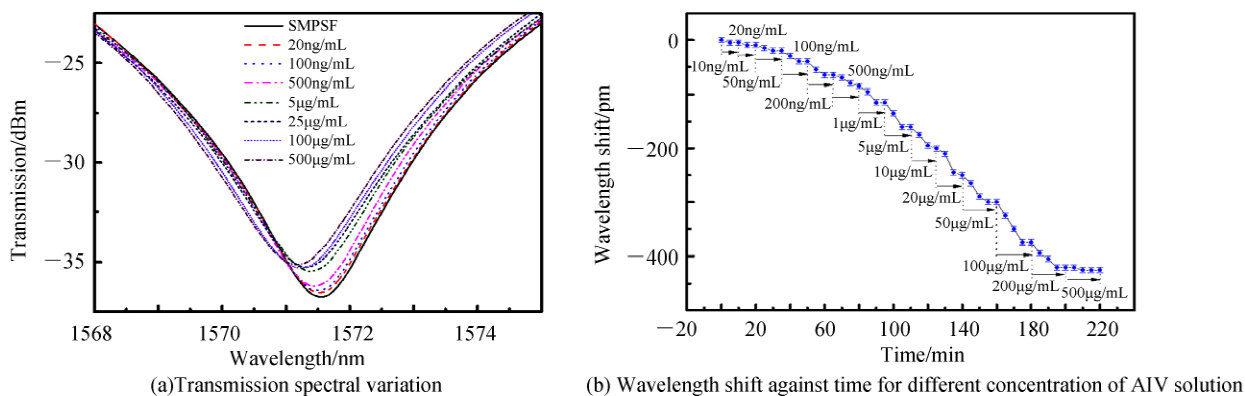


图 5 AIV 免疫检测过程中传感器的光谱及谐振波长漂移量随时间的变化

Fig.5 Spectral evolution and wavelength shift against time of the immunosensor for AIV detection

图 6 给出对应与图 5(a)中传感器波长漂移量的绝对值与 AIV 抗原溶液浓度之间的关系.由图 6 可知,在 10 ng/mL、20 ng/mL 和 50 ng/mL 的浓度范围内,波长漂移量分别为 $\sim 5$  pm、 $\sim 10$  pm 和 $\sim 20$  pm.由于所使用光纤解调仪的波长分辨率为 $\pm 5$  pm,因此推断该免疫传感器检测 AIV 抗原的检测极限大约在 20~50 ng/mL 之间,根据使用生物传感器的校准曲线和国际纯粹与应用化学联合会(International Union of Pure and Applied Chemistry, IUPAC)建议,检测极限为<sup>[32]</sup>

$$x_{\text{LOD}} = f^{-1}(\bar{y}_{\text{blank}} + 3\sigma_{\text{max}}) \quad (4)$$

式中, $\bar{y}_{\text{blank}}$ 为空白测量的平均值, $\sigma_{\text{max}}$ 为空白测量的标准偏差.通过图 6 和式(4),该传感器的检测极限为 $\sim 40$  ng/mL,该值与其他文献中报道的未修饰 GO 的 LPFG 生物传感器对人 IgG 和羊抗鼠 IgG 的检测极限 $\sim 2$   $\mu\text{g/mL}$ <sup>[33]</sup>和 $\sim 500$  ng/mL<sup>[34]</sup>相比,分别提高了 $\sim 50$  和 $\sim 12.5$  倍;该值与目前临床广泛应用的禽流感胶体金诊断试纸检测限 $\sim 1.7$   $\mu\text{g/mL}$ <sup>[35]</sup>相比提高了 $\sim 42.5$  倍,证明该检测极限满足禽流感病毒检测的临床需求。

为了进一步了解 GO-eLPFG 免疫传感器的检测结果,根据图 6 给出的该生物传感器波长漂移量的绝对值与 AIV 抗原溶液浓度之间的拟合结果,传感器对 AIV 分子的特异性吸附遵循 Langmuir 模型<sup>[36, 37]</sup>

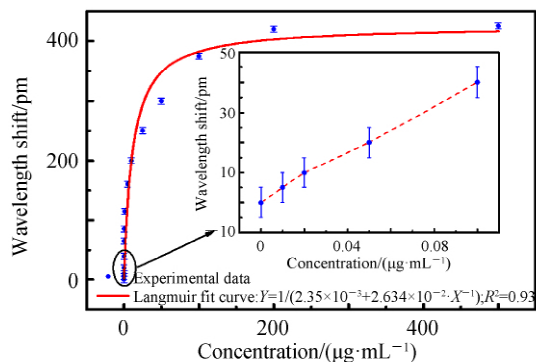


图 6 GO-eLPFG 免疫传感器的波长漂移与 AIV 抗原溶液浓度的关系

Fig.6 Wavelength shift of the GO-eLPFG immunosensor for different AIV concentration levels

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

式中,  $C$  为 AIV 抗原的浓度,  $\Delta\lambda_{\max}$  为 AIV 抗原检测过程中的最大谐振波长漂移量; 解离系数  $K_d$  是描述两个相互作用分子之间结合能力的一个重要参数. 通过图 6 和式(5), 求得该 GO-eLPFG 生物传感器对 AIV 的解离系数为  $\sim 1.6 \times 10^{-7}$  mol/L. 这些结果表明, 基于 GO 修饰的 eLPFG 禽流感病毒传感器对 AIV 分子具有较好的亲和力.

### 2.3 GO-eLPFG 免疫传感器的特异性及临床性试验

对于免疫传感器而言, 重用性、特异性及临床性是衡量其是否合格的重要标准. 为进行特异性测试和免疫测定的实验, 使用 HF 溶液轻微腐蚀该 GO-eLPFG 免疫传感器, 以清除其表面所有的吸附层, 然后使用以上表面修饰步骤, 重新将 AIV-MAbs 分子固定于传感器表面. 首先将该重新功能化的 AIV 免疫传感器用于检测不含 AIV 的病毒原液(即, AIV 空白尿囊液, Blank-AIV Allantoic Fluid, 300  $\mu$ L), 然后检测新城疫病毒原液(即, NDV 尿囊液, NDV Allantoic Fluid, 300  $\mu$ L), 每次检测反应 20 min 之后使用 PBS 和去离子水多次冲洗传感器表面, 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、细胞等), 但不含 AIV 抗原分子, 因此, 这两个检测步骤能够鉴定该 AIV 免疫传感器对 AIV 抗原结合的特异性. 结果表明, 该 GO-eLPFG 免疫传感器谐振峰较参考光谱基本保持不变, 表明该 AIV 免疫传感器对 AIV 空白尿囊液和 NDV 尿囊液没有任何特异性结合的能力. 然后, 使用该 GO-eLPFG 免疫传感器依次检测浓度分别为 10 ng/mL、20 ng/mL、5  $\mu$ g/mL、200  $\mu$ g/mL 和 500  $\mu$ g/mL 的通过病毒扩增的 AIV 病毒原液(即, AIV 尿囊液, AIV Allantoic Fluid), 测试方法同上. 以上整个检测过程中 GO-eLPFG 免疫传感器谐振波长变化如图 7 所示, 可见, 当 AIV 病毒原液的浓度从 10 ng/mL 变化至 500  $\mu$ g/mL 时, 谐振波长的蓝移量为  $\sim 315$  pm, 与第一次检测的高纯度 AIV 抗原溶液的蓝移量( $\sim 425$  pm, 见图 5)相当. 但是后者的蓝移较前者的略有降低, 这是由于 AIV 尿囊液里含有的是整个 AIV 病毒, 属于临床检测, 而之前检测用的 AIV 是经纯化后的高浓度抗原蛋白, 从而导致两者检测数据的差异.

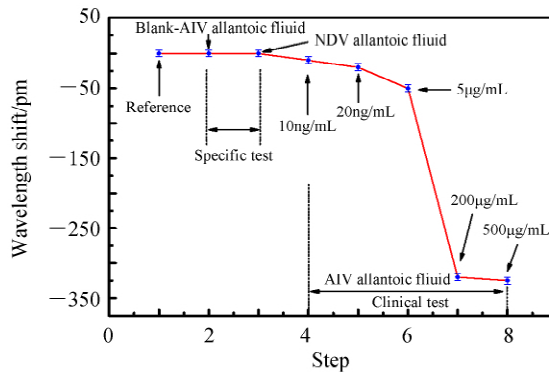


图 7 GO-eLPFG 免疫传感器的重用性、特异性和临床性测试过程谐振波长变化

Fig.7 Wavelength shift for reusability and specificity assessment, and clinical assay of the GO-eLPFG immunosensor

## 3 结论

提出一种基于 GO-eLPFG 的禽流感病毒免疫传感器, 具有免标记、操作简便、快速检测等优点. 首先对光栅表面进行生物传感功能化处理, 经过光纤表面羟基化、包被 GO、修饰 AIV-MAbs 及封闭剩余 GO 位点四个步骤. 通过检测不同浓度等级的高纯度 AIV 抗原溶液, 得到该免疫传感器对 AIV 抗原的检测极限为  $\sim 40$  ng/mL, 检测饱和点为  $\sim 200$   $\mu$ g/mL, 检测范围为 40 ng/mL  $\sim$  200  $\mu$ g/mL. 传感器的解离系数为  $\sim 1.6 \times 10^{-7}$  mol/L. 通过 HF 酸轻微腐蚀 GO-eLPFG 免疫传感器进行重复表面修饰, 再通过对 AIV 空白尿囊液、NDV 尿囊液和 AIV 尿囊液等不同的禽类病毒原液进行对比检测实验, 结果表明该传感器对 AIV 抗原具有良好的特异性, 具有临床应用的潜力. 然而, 该免疫传感器的灵敏度还较低, 后续将会采用高 RI 灵敏度的色散拐点位于 C-L 波段的 LPFG 作为传感平台, 并结合 GO 材料, 以提升该免疫传感器的传感性能.

### 参考文献

- [1] SAKURAI A, SHIBASAKI F. Updated values for molecular diagnosis for highly pathogenic avian influenza virus[J].

- Viruses*, 2012, **4**(8): 1235-1257.
- [2] SHIRAISHI R, NISHIGUCHI A, TSUKAMOTO K, *et al.* Comparison of commercial enzyme-linked immunosorbent assay kits with agar gel precipitation and hemagglutination-inhibition tests for detecting antibodies to avian influenza viruses[J]. *Journal of Veterinary Medical Science*, 2012; 12-0086.
- [3] ALEXANDER D J. Avian influenza-diagnosis[J]. *Zoonoses and Public Health*, 2008, **55**(1): 16-23.
- [4] LI Xi-han, QI Xian, MIAO Lv, *et al.* Detection and subtyping of influenza A virus based on a short oligonucleotide microarray[J]. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 2009, **65**(3): 261-270.
- [5] SHENDURE J, JI H. Next-generation DNA sequencing[J]. *Nature Biotechnology*, 2008, **26**(10): 1135.
- [6] CHEN H, ZHANG J, SUN D, *et al.* Development of reverse transcription loop-mediated isothermal amplification for rapid detection of H9 avian influenza virus[J]. *Journal of Virological Methods*, 2008, **151**(2): 200-203.
- [7] 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.
- [8] WATSON D S, REDDY S M, BRAHMAKSHATRIYA V, *et al.* A multiplexed immunoassay for detection of antibodies against avian influenza virus[J]. *Journal of Immunological Methods*, 2009, **340**(2): 123-131.
- [9] CHARLTON B, CROSSLEY B, HIETALA S. Conventional and future diagnostics for avian influenza[J]. *Comparat Infect Dis*, 2009, **32**:341-350.
- [10] WANG Yong-wei, ZHANG Li-feng, ZHANG He-xiao. Common avian influenza detection technology and its application in the field of inspection and quarantine[J]. *Inspection and Quarantine Science*, 2003, **13**(5): 51-53.  
王永卫, 张利峰, 张鹤晓. 常用禽流感检测技术及其在检验检疫领域中的应用[J]. *检验检疫科学*, 2003, **13**(5): 51-53.
- [11] WOLFBEIS O S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors[J]. *Analytical Chemistry*, 2008, **80**(12): 4269-4283.
- [12] JUSTINO C I L, GOMES A R, FREITAS A C, *et al.* Graphene based sensors and biosensors[J]. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 2017, **91**: 53-66.
- [13] WANG L, ZHANG Y, WU A, *et al.* Designed graphene-peptide nanocomposites for biosensor applications; A review [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2017, 985: 24-40.
- [14] 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.
- [15] CHIAVAIOLI F, BALDINI F, TOMBELLI S, *et al.* Biosensing with optical fiber gratings[J]. *Nanophotonics*, 2017, **6**(4): 663-679.
- [16] 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.
- [17] TAN Y C, JI W B, MAMIDALA V, *et al.* Carbon-nanotube-deposited long period fiber grating for continuous refractive index sensor applications[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, **196**: 260-264.
- [18] COELHO L, VIEGAS D, SANTOS J L, *et al.* Characterization of zinc oxide coated optical fiber long period gratings with improved refractive index sensing properties[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2016, **223**: 45-51.
- [19] COELHO L, VIEGAS D, SANTOS J L, *et al.* Enhanced refractive index sensing characteristics of optical fibre long period grating coated with titanium dioxide thin films[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2014, **202**: 929-934.
- [20] NOVOSELOV K S, GEIM A K, MOROZOV S V, *et al.* Electric field effect in atomically thin carbon films[J]. *Science*, 2004, **306**(5696): 666-669.
- [21] RADISAVLJEVIC B, RADENOVIC A, BRIVIO J, *et al.* Single-layer MoS<sub>2</sub> transistors[J]. *Nature Nanotechnology*, 2011, **6**(3): 147.
- [22] LI L, YU Y, YE G, *et al.* Black phosphorus field-effect transistors[J]. *Nature Nanotechnology*, 2014, **9**(5): 372.
- [23] ZHU Cheng-zhou, DU Dan, LIN Yue-he. Graphene-like 2D nanomaterial-based biointerfaces for biosensing applications [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2017, **89**: 43-55.
- [24] 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.
- [25] WANG Y, SHEN C, LOU W, *et al.* Fiber optic relative humidity sensor based on the tilted fiber Bragg grating coated with graphene oxide[J]. *Applied Physics Letters*, 2016, **109**(3): 031107-1-031107-5.
- [26] JIANG B, ZHOU K, WANG C, *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.
- [27] LUO B, LU H, SHI S, *et al.* Immunosensing platform with large detection range using an excessively tilted fiber grating coated with graphene oxide[J]. *Applied Optics*, 2018, **57**(30): 8805-8810.
- [28] 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.
- [29] SHU Xu-wen, ZHANG Lin, BENNION I. Sensitivity characteristics of long-period fiber gratings[J]. *Journal of Lightwave Technology*, 2002, **20**(2): 255-266.



- [30] JAMES S W, TATAM R P. Optical fibre long-period grating sensors: characteristics and application[J]. *Measurement Science and Technology*, 2003, **14**(5): R49.
- [31] GÓMEZ-NAVARRO C, WEITZ R T, BITTNER A M, *et al.* Electronic transport properties of individual chemically reduced graphene oxide sheets[J]. *Nano Letters*, 2007, **7**(11): 3499-3503.
- [32] CHIAVAIOLI F, GOUVEIA C, JORGE P, *et al.* Towards a uniform metrological assessment of grating-based optical fiber sensors: From refractometers to biosensors[J]. *Biosensors*, 2017, **7**(2): 23.
- [33] 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.
- [34] CHIAVAIOLI F, TRONO C, GIANNETTI A, *et al.* Characterisation of a label-free biosensor based on long period grating[J]. *Journal of Biophotonics*, 2014, **7**(5): 312-322.
- [35] LI Bei-bei, XUE Qiang, LI Jin-feng, *et al.* Development of a complex gold-immunochromatography test strips 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.
- [36] CHANG K S, SUN C J, CHIANG P L, *et al.* Monitoring extracellular K<sup>+</sup> flux with a valinomycin-coated silicon nanowire field-effect transistor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, **31**(1): 137-143.
- [37] 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.

---

**Foundation item:** National Natural Science Foundation of China (Nos.61875026, 61505017), the Foundation and Cutting-edge Research Projects of Chongqing Science and Technology Commission (Nos.cstc 2019jcyj-msxmX0093, cstc2018jcyjAX0122), the Youth Project of Science and Technology Research Program of Chongqing Education Commission of China (No.KJQN201801121), Graduate Student Innovation Program of Chongqing University of Technology (Nos.ycx2018235, ycx2018231)