

文章编号: 1005-5630(2013)01-0030-04

SPR 生化分析仪及其在样品检测中的应用*

符运良, 林 红

(海南师范大学 物理与电子工程学院, 海南 海口 571158)

摘要: 表面等离子共振(SPR)是一种入射光照射到金属表面,导致金属表面产生等离子共振,反射光强出现衰减的现象,反射光强衰减程度与入射光波长、入射角及金属表面被测物质的折射率有关。根据这原理研制的 SPR 生化分析仪,在检测、分析分子间的相互作用等方面有着广泛的应用。针对 HPSPR-6000 生化分析仪的工作原理、技术参数、检测方法进行了详细的介绍,在芯片表面生长磺胺二甲嘧啶-BSA,并检测生长过程的响应信号,同时还对磺胺二甲嘧啶抗原与抗体在芯片表面的结合响应信号进行了检测。

关键词: 表面等离子共振; SPR 生化分析仪; 检测

中图分类号: TS 207.53 **文献标识码:** A **doi:** 10.3969/j.issn.1005-5630.2013.01.006

Surface plasmon resonance biochemical analysis instrument and its application in the samples concentration detection

FU Yunliang, LIN Hong

(College of Physics and Electronic Engineering, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: Surface plasmon resonance (SPR) is a phenomenon which occurs when light is reflected off thin metal films, and the intensity of reflected light is correlated with the optical wavelength of incidence, angle of incidence, and refractive index of the material on the surface of Au film. Biochemical analysis instruments based on surface plasmon resonance have been developed for characterizing and quantifying biomolecular interaction. The working principle, technical parameters and testing method of the HPSPR-6000 were discussed here. The SPR response of immobilizing sulfamethazine antigen on the surface of chip was tested and the binding value between antigen and antibody on the surface chip was measured.

Key words: surface plasmon resonance; SPR biochemical analysis instrument; detection

引 言

基于表面等离子共振(surface plasmon resonance, SPR)原理的生物传感技术是一种先进的光学生物化学检测技术,近几年来,该生物化学传感检测技术在监测生物分子之间的结合反应方面有着广泛的应用^[1],该传感检测技术与传统的生化分析方法(如液相色谱等)相比,具有检测时间少、检测样品无需任何标记、检测结果准确、检测灵敏度高等优点,并且还能够实现在线、实时连续检测。目前,基于表面等离子

* 收稿日期: 2012-05-19

基金项目: 海南省重点科技资助项目(ZDXM20100099)

作者简介: 符运良(1964-),男,海南临高人,教授,博士,主要从事表面等离子共振生化传感器方面的研究。

共振检测技术还在生物科技、药物筛选、环境检测、食品检测等多个领域,成为最具发展潜力的生化检测方法之一^[2-5]。国内已有多家单位设计、研制基于 SPR 的生化传感器,而可靠性能高、便携式 SPR 生化传感器^[6-7],是 SPR 生化分析仪发展的方向。以河南农业大学迅捷公司生产的 HPSPR-6000 生化分析仪为例,对仪器的工作原理、技术参数等方面进行介绍,同时介绍其在磺胺二甲嘧啶抗原与抗体结合反应检测中的应用结果。

1 SPR 原理

SPR 原理如图 1 所示,光源发出的单色光,经过 TM 波偏振器(图中未标)产生的偏振光经过耦合棱镜,照射到金膜表面上,金膜表面另一侧流有被测样品(液体、气体等),反射光信号由线阵列 CCD 检测。由于光照射,在金膜表面将产生表面等离子波,当表面等离子波与入射光波在平行表面分量相等时,发生等离子共振,导致反射光强减少,导致 CCD 检测器接收到的光强度急剧下降,形成一条黑线,则为 SPR 共振峰,被检信号可通过数模转换后由计算机显示输出。

对于生物分子的识别检测或分子之间的动态反应程度检测,首先在芯片表面固定一层生物分子识别膜,如果样品中有能够与芯片表面的生物分子识别膜相互作用的分子,由于结合反应,就会引起表面物质折射率变化,从而导致反射光强变化。通过实时监测 SPR 传感器反射光强变化过程,可获得生物分子动态结合或解离过程,可以获得被分析物的浓度、亲和力、动力学常数和特异性等信息^[8]。HPSPR-6000 生化分析仪采用 Kretschmann 结构构建高精度光学传感系统,光源为 LED 光源,波长为 850 nm,并把上述光源、TM 偏振器、棱镜、信号检测转换等器件集成在一个黑色盒子里(如图 2 所示),以消除外界杂散光对检测信号的影响。

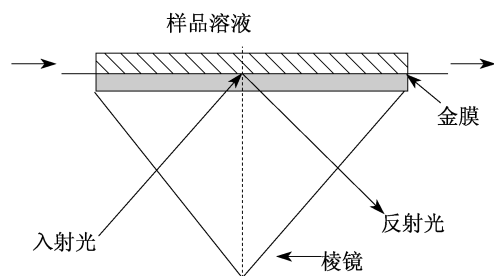


图 1 SPR 传感器原理图

Fig. 1 Schematic of SPR sensor

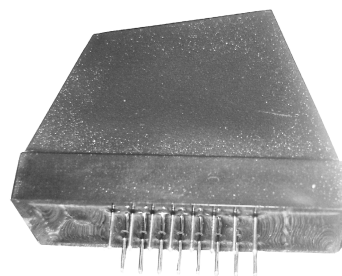


图 2 SPR 传感器集成器件

Fig. 2 Integrated component of SPR sensor

2 技术参数

HPSPR-6000 生化分析仪由液体动力系统、进样系统、模式选择系统和检测系统 4 部分组成,其结构如图 3 所示。

2.1 动力系统

HPSPR-6000 生化分析仪的动力系统的动力源为蠕动泵,蠕动泵的工作控制面板如图 4 所示,通过触摸按键,实现蠕动泵右转和左转的功能选择,以及转速的选择,转速以数字方式显示在控制面板上。另外,还可实现蠕动泵暂停和加速,使用非常方便。它的作用是为三个样品流通通道的样品流动提供

动力,当生物分子样品流经检测芯片表面时,进而研究分子间的相互作用或溶液的浓度。样品流动系统是一种高精密的进样控制系统,样品流速可控制在 0.006~29 mL/min。

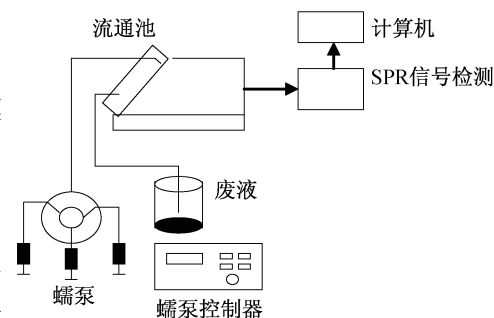


图 3 SPR 传感器结构图

Fig. 3 Schematic illustration of SPR sensor

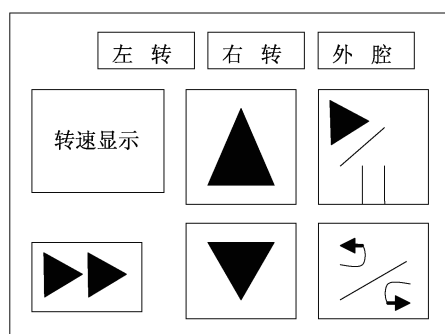


图 4 蠕动泵工作控制面板

Fig. 4 Control panel of peristaltic pump

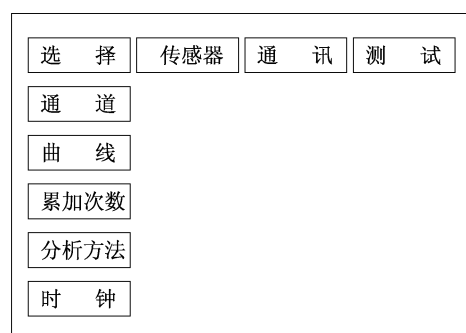


图 5 功能选择菜单

Fig. 5 Menu of function selection

2.2 样品处理系统

样品处理系统的主要功能是将被测液体样品注入到流通池中, HPSPR-6000 生化分析仪采用内置样品架, 连接三条微型软管, 构成三通道进样系统。当蠕动泵工作时, 通过微型软管, 将液体样品注入到流通池中, 采用自动进样工作方式, 仪器具有自动化、智能化。另外, 将分析测试后的液体样品, 也通过微型软管回收到废液瓶中。

2.3 工作通道选择

HPSPR-6000 生化分析仪有三个工作通道, 通过功能菜单选择其中某个通道为工作通道, 使液体样品在该通道中流动及检测。另外, 为了消除背景噪声对检测结果的影响, 也可以选两个通道, 其中一个通道内流通被测液体样品, 作为信息通道, 另外一个通道流通基质样品, 作为参考通道, 信息通道响应扣除参考通道响应, 即可得到精确的液体样品结合反应响应。

2.4 检测系统

检测系统是 HPSPR-6000 生化分析仪的主要核心, 检测芯片是在玻璃基片上镀一层 50 nm 厚的金膜, 形成裸金片, 根据实验要求, 在裸金片表面可固定羧甲基化、氨基端等不同功能分子层。HPSPR-6000 生化分析仪将芯片固定在集成盒子边上, 然后将芯片连接在检测元件上, 检测的样品折射率范围为 1.30~1.36。

2.5 检测和分析软件

HPSPR-6000 生化分析仪配套软件分为在线检测软件和分析软件, 对于在线检测软件, 可通过菜单进行选择实现某个功能, 如图 5 所示。如选择、传感器、通讯和测试菜单, 选择菜单下又有通道、曲线、分析方法、累加次数等子菜单功能, 通道子菜单可以选择检测通道, 等等。另外, 将检测到的样品信号同步呈现在 LCD 界面上, 形成直观的检测 SPR 曲线。分析软件对检测软件生成的数据进行数据传送保存, 并对生物分子之间进行动力学和相关性分析, 计算出不同生物分子之间的结合和解离常数。

3 SPR 生化分析仪在药物残留检测中的应用

免疫特异性结合反应检测是表面等离子共振传感器应用最多的检测手段之一^[9-10], 用 HPSPR-6000 生化分析仪检测了磺胺二甲嘧啶抗体与其衍生物的特异性结合, 方法步骤为: 首先在芯片表面自组装一层单分子膜磺胺二甲嘧啶-BSA, SPR 生化分析仪传感响应曲线如图 6 所示。(1) 传感器初始化后, 点击“标定”, 出现 SPR 曲线, 曲线稳定后, 向芯片表面流动注入 1 mol/L 的 11-巯基十一烷酸, 时间约 2 h, 待信号稳定后, 用 PBS 缓冲液冲洗, 从而使芯片表面羧基化;(2) 将 0.4 mol/L EDC 和 0.1 mol/L NHS(1:1, 体积比) 混合后, 注入芯片表面, 流速为 10 $\mu\text{L}/\text{min}$, 活化芯片表面的羟基, 形成活性酯, SPR 信号上升, 如图 6 中的 1 所示。用 PBS 缓冲液注入冲洗表面, SPR 信号下降;(3) 将磺胺二甲嘧啶-BSA 用醋酸缓冲液 (pH=4.4) 1:50 倍稀释, 以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 流速注入芯片中, 结合信号上升, 如图 6 中的 2 所示, 用 PBS 缓冲液冲洗, 这样抗原便固定在芯片表面上;(4) 将 1 mol/L 乙醇胺 (pH=8.5) 以 10 $\mu\text{L}/\text{min}$ 的流速注入, 灭活

封闭芯片表面上未被蛋白结合的活性位点,如图 6 中的 3 所示,以 PBS 缓冲液冲洗,信号强度回到基线,如图 6 中的 4 所示,这样完成分子识别膜的制备。

抗体浓度以 PBS 缓冲液稀释 100 倍,与磺胺二甲嘧啶样品(浓度 4.5 ng/mL)混合,以 10 μ L/min 流速注入芯片表面,芯片表面抗原与抗体发生抑制免疫结合反应,SPR 信号上升,如图 6 中的 5 所示,放大曲线如图 7 所示,基线响应值为 23 600 IU(intensity unit),样品流入表面,响应值为 24 730 IU,结合响应值为 1 130 IU。从图 7,当被测样品浓度较低时,在反应起始的一段时间内,相对响应值与时间近似呈线性关系。

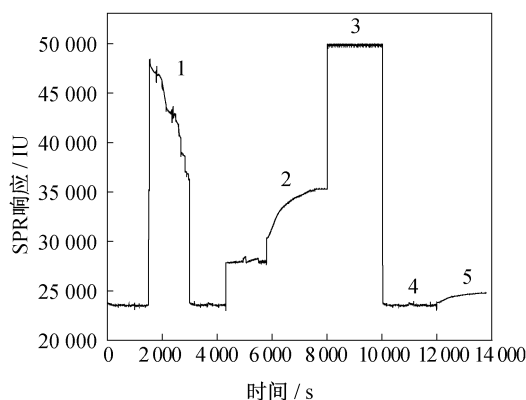


图 6 芯片表面固定磺胺二甲嘧啶-BSA

Fig. 6 Immobilization of SMT-BSA

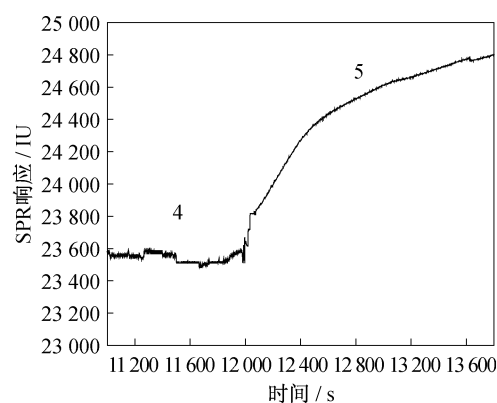


图 7 抗原与抗体的结合反应

Fig. 7 The inhibition response SPR curve

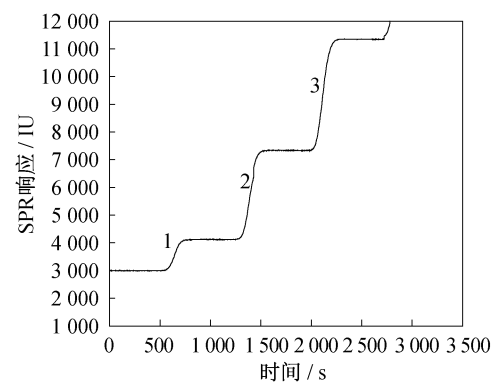
利用连续检测的方法对磺胺二甲嘧啶进行了检测。三个不同浓度磺胺二甲嘧啶与抗体混合后,依次流过芯片表面,两个混合物之间交替注入 PBS 缓冲液,所得到的连续检测曲线如图 8 所示,混合物中磺胺二甲嘧啶样品与抗体结合,剩余的抗体与芯片表面的抗原结合,SPR 响应曲线上升,当注入缓冲液后,抗体从芯片表面解离,但是由于解离的速度缓慢,对应于 SPR 响应曲线平缓区。连续检测是基于一定浓度的抗体与固定在芯片表面的磺胺二甲嘧啶抗原结合所得相对响应值与时间近似呈线性关系,而且样品浓度在较小的一定范围内,样品浓度的连续检测,对于减少芯片的再生过程,减少检测时间具有重要的作用。

当样品中含有磺胺二甲嘧啶时,与磺胺二甲嘧啶抗体结合,则抑制抗体与芯片表面的抗原结合,导致结合值减少,SPR 信号响应下降,磺胺二甲嘧啶样品浓度越大,抑制抗体与芯片表面抗原的结合的能力越强,结合值就越少,检测到的 SPR 信号响应越小。因此,通过竞争抑制反应的结合值与磺胺二甲嘧啶样品浓度之间的关系,便可得到浓度抑制的标准曲线,通过标准曲线,当检测到某浓度的结合响应值时,由标准曲线便可得到某磺胺二甲嘧啶样品的浓度。

4 结 论

以 HPSPR-6000 生化分析仪为例,介绍了其工作原理、技术参数、结构组成和各部分的功能,并用分析仪得到芯片表面生长磺胺二甲嘧啶-BSA 分子识别膜过程的 SPR 响应信号,并用抗原与抗体之间的免疫特异性结合,检测了反应响应曲线。HPSPR-6000 生化分析仪使用方便、操作简单、检测灵敏度高、结果准确,对于生化分子之间的动力反应过程研究是一种较好的仪器。

(下转第 43 页)



1—4 ng/mL SM2; 2—2 ng/mL SM2; 3—1 ng/mL SM2。

图 8 磺胺二甲嘧啶连续检测响应曲线

Fig. 8 Sensorgram of continuous detection for sulfamethazine (SM2)

(4)距离不可过大,因为距离增大,光路变长,使接收器接收的光斑变大,从而导致接收器灵敏度降低。虽然激光的方向性较好,但普通激光器的光束在较长距离上仍然会形成较宽的激光光束,在玻璃上形成弥散斑;

(5)风力的干扰作用会使玻璃产生轻微的振动,这会给监听的声音引入比较大的噪音,从而影响监听效果。

3 结 论

通过理论分析和实验仿真,实现了激光监听并且定位的功能。在室内声源音量为40~90 dB的范围内,可以得到清晰的监听音质和定位效果。利用激光进行监听,要实现好的监听效果,仍然有许多地方需要继续研究和改进。为了保证监听的隐蔽性,可以改用红外光,同时更改相应的光电探测器。因为红外光是不可见光,在调光路的时候,可以带上耳机寻求最好效果点辅助调光路。另外,对其光路要求严格,如不能快而准地接收到反射光,就不能达到监听目的。可利用“猫眼”效应,实现发射机与接收机的组合,从而方便监听的选址,并实现自动判断是否瞄准目标,这样很大程度上缩减准备时间,达到更快更好监听的目的。

参考文献:

- [1] 戴 玮,沈建华. 激光监听实验的开设与研究[J]. 大学物理实验, 2009(4): 44—47.
- [2] MORSE P M. 振动与声[M]. 南京大学翻译组,译. 北京:科学出版社,1974.
- [3] 龚文汀. 时延估计技术[J]. 舰船科学技术, 1990(4): 21—33.
- [4] 林福严,王 力,伟雷冀. 声源定位中声音到达各阵元时延估计的虚拟仪器实现[J]. 信息化纵横, 2009, 28(13): 34—36.
- [5] 严素清,黄 冰. 基于广义互相关的时延估计算法研究[J]. 信息技术, 2005(12): 26—28.
- [6] 赵官华,唐 芳. 激光监听演示实验仪器的制作[J]. 物理与工程, 2010, 20(3): 62—64.
- [7] 潘 岳,王 健. 双马赫—曾德尔型干涉仪定位技术研究[J]. 光学仪器, 2012, 34(3): 54—59.

=====

(上接第 33 页)

参考文献:

- [1] 刘国华,张维,牛文成,等. 多通道 SPR 影像传感器及其对生物分子的检测[J]. 仪器仪表学报, 2005, 26(11): 1144—1148.
- [2] JIN J, WANG C Y, TAO Y, *et al.* Determination of 3-nitrotyrosine in human urine samples by surface plasmon resonance immunoassay[J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2011, 153: 164—169.
- [3] LU X, ZHENG H, LI X Q, *et al.* Detection of ractopamine residues in pork by surface plasmon resonance-based biosensor inhibition immunoassay[J]. *Food Chemistry*, 2012, 130: 1061—1065.
- [4] LI Y, LIU X, LIN Z. Recent developments and applications of surface plasmon resonance biosensors for the detection of mycotoxins in foodstuffs[J]. *Food Chemistry*, 2012, 132: 1549—1554.
- [5] 牟海维,段玉波,张 坤,等. 基于表面等离子体共振技术油水持率传感器的实验研究[J]. 光学仪器, 2012, 34(2): 80—84.
- [6] 崔大付,张璐璐,王于杰,等. 表面等离子共振(SPR)生化分析仪的研制与发展[J]. 现代科学仪器, 2007(2): 3—7.
- [7] 张璐璐,崔大付,蔡浩原,等. 便携式 SPR 生化传感系统的研究[J]. 现代科学仪器, 2007(2): 7—30.
- [8] NIR D, HAGIT Z, MARCELA P, *et al.* A quantitative evaluation of the molecular binding affinity between a monoclonal antibody conjugated to a nanoparticle and an antigen by surface plasmon resonance [J]. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 2010, 74(2): 148—156.
- [9] 周宏敏,欧惠超,姜 浩,等. 利用表面等离子共振技术快速检测牛奶中的磺胺甲噁唑[J]. 食品科学, 2010, 31(6): 168—171.
- [10] 张增福,徐可欣,刘 瑾,等. 利用基于表面等离子共振的生物光学传感器检测牛奶中氨基青霉素残留的方法[J]. 食品科学, 2008, 29(6): 353—356.