



Your order details

Our Order Ref: 02662653-001

Your Ref: PAYG0007/2

Despatched on: 9/6/2022

Your shipping address:

British Library Business Use
Customer Services - PAYG
Thorp Arch
WETHERBY
LS23 7BQ
United Kingdom

Your item details

UIN: ETOCRN116256629
Title: Guang zi xue bao = Acta photonica
sinica / Zhongguo guang xue xue hui zhu
ban.
Publisher: SCIENCE PRESS
ISSN: 1004-4213
Year: 2002 **Volume:** 31
Issue: 6
Pages: 657-661
Author name(s): Yan, S. Feng, S. Yuxiao, Y.
Article title words: Fiber optic biosensor applied in detecting
biolayer thickness of nanometer grade

Comments

British Library Business Use
Customer Services - PAYG
Thorp Arch
WETHERBY
LS23 7BQ
United Kingdom



Copyright Statement

Unless out of copyright, the contents of the document(s) attached to or accompanying this page are protected by copyright. They are supplied to you under our Copyright Fee Paid Service. You are therefore agreeing to the terms of supply for our Copyright Fee Paid Service, available at: <https://www.bl.uk/help/on-demand-terms-and-conditions>, or to any terms agreed with you in a separate agreement for the supply of documents.

用于纳米生物膜层厚度测试的光纤生物传感器

孙 艳^{1,2} 孙 锋² 杨玉孝¹ 谭玉山¹

(1 西安交通大学激光红外研究所, 西安 710049)

(2 空军工程大学航空电子工程系, 西安 710038)

摘 要 研制出光纤感应生物传感器,用以测试 nm 级的生物膜层的厚度. 给出了测试的实现过程、实验结果和提高信噪比的方法,并与表面等离子体共振 (SPR) 技术进行了比较.

关键词 抗原;抗体;光纤;干涉;直接感应生物传感器

0 引言

检测样本中是否存在某种特殊的生物物质,是研究和医学诊断中经常用到的方法. 检查血浆中是否存在某种特殊的抗体时,可以利用与之互补的特殊抗原. 基于该原理的检测方法,常用的有免疫扩散法、免疫电泳法、免疫荧光法等. 常用的生物传感器方法有夹层光纤传感器、位移光纤生物传感器、SPR 传感器、光栅生物传感器等. 这些生物传感器要么体积很大需要大量的测试样本,要么需要有毒的(荧光)指示剂,而且一次只能做一种测试,不能做体内检测.

我们研制的应用相位跟踪逼近方法的光纤直接感应生物传感器,用光纤探针作为生物传感器,利用干涉原理,根据光谱相位的改变,判断探针端面生物膜层厚度是否发生变化,从而判断样本溶液中待测的物质是否存在. 其特点是:体积小、无毒、可同时达到多种化验目的. 并可进一步达到体内测试的目的.

1 测试原理

光纤传感器探针部分如图 1 所示.

在进行生物膜厚度测试之前,光纤探针端部首先被覆盖上一层硅化膜,膜的厚度大约为 $1 \sim 2 \mu\text{m}$. 如果想测试的是一种抗原,那么就要使用与之相对应的特异性抗体. 这样要在光纤端部的

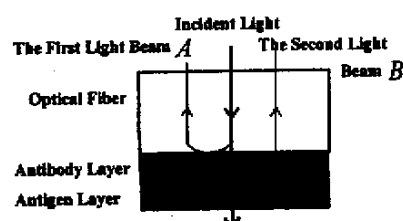


图 1 光纤探针端面的反射

Fig. 1 Light reflection at bottom of bioprobe

硅化膜之上再粘附一层特异性抗体,用这层特异性的抗体和抗原之间的特异性结合来检测特定抗原是否存在. 硅化膜的折射率和抗原、抗体物质的折射率非常接近,整个膜层(包括硅化层、抗体和抗原)从光学的角度可以被认为是一层物质.

入射光沿光纤射入探针末端. 当只有抗体层时,入射光首先在光纤和膜层之间的界面(界面 1)发生反射,一小部分光(第一束光)被反射回“Y”型光纤另一端;大部分的光会继续进入膜层,并在膜层和空气的界面(界面 2)上发生第二次反射,第二次反射回来的光,在界面 1 处发生透射,反射光的大部分进入光纤(第二束光),被反射回“Y”型光纤的另一端.

当膜的折射率较低时,光在薄膜内的反射很弱,多次反射的情况基本上不用考虑,不会出现多束相干光的情况,所以只需要考虑单次反射光发

生相干的情况. 由于膜有一定的厚度, 第一束光与第二束光之间存在光程差 Δ , $\Delta = 2d \cos i$, i 为光的入射角, 在近垂直入射的条件下, i 近似为零度, 所以 $\Delta = 2d \cos i = 2d \cos(0) = 2d$. 在白光的相干长度内, 光程差的存在使两束反射光之间可能会发生光的干涉. 设第一束光的光强为 I_1 , 第二束光的光强为 I_2 , 根据 Fresnel 定律, 干涉光的光强为

$$I = I_1 + I_2 + 2 \sqrt{I_1 I_2} \cos(2\pi \Delta / \lambda) \quad (1)$$

式中, Δ 即光程, λ 为入射光的波长. 由于 I_1 和 I_2 强度接近, 可近似认为两者相等. 设 $I_1 = I_2 = I_R$, 上式可简化为

$$I = 2I_R(1 + \cos(2\pi \Delta / \lambda)) \quad (2)$$

对于一个给定的 Δ , Δ / λ 与 I 之间存在余弦关系. 在 $\Delta / \lambda = 0.5, 1, 1.5, \dots$ 时可得到反射光强的极值. 如果当 Δ 的初始值为 μm 级, 式(2)中 I 和 λ 之间的关系是一种类似余弦的关系, 即形状很象余弦, 只是随着 λ 的增加信号的周期会变展宽. 如图 2 所示.

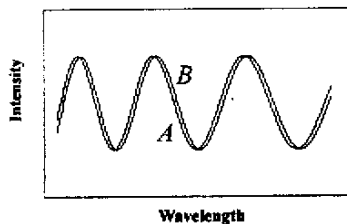


图 2 波长 λ 和光强 I 之间的类余弦关系

(A 为初始膜厚 Δ 的情况, B 为 Δ 有所增加的情况)

Fig. 2 The relationship between wavelength (λ) and reflected intensity (I) curve A indicates initial value of Δ , curve B indicates that Δ has increased)

用两个或两个以上的极值可以计算出每个极值的阶数以及光程 Δ 的值. 先计算得到极值点处的波长值 $a, b, c, \dots$, 设 $k = 0.5$, 当 $\Delta / \lambda = k, 2k, 3k, \dots$ 时对应反射光强的极值点. 由于我们不知道我们取的极值点到底是在哪一阶, 所以不妨依次设定 a, b, c 处的阶数为 $mk, mk-1, mk-2, \dots$ 阶数递减是因为随着 λ 增大, $1/\lambda$ 在减小, 所以阶数应该是递减的. 列方程组

$$\Delta / a = mk \quad (3)$$

$$\Delta / b = mk - 1 \quad (4)$$

$$\Delta / c = mk - 2 \quad (5)$$

对于给定的 a, b, c 值, 联立求解上面的三个方程就可以得到光程 Δ 、阶数 m 的值.

在近垂直入射下, 对于给定的折射系数 n 和光程 Δ , 膜的实际厚度 d 为

$$d = \Delta / 2n \quad (6)$$

在 $I_1 \gg I_2$ 或者 $I_1 \ll I_2$ 的情况下, 虽然还是可以得到结果, 但图象的衬比(度)会降低, 确定极值点的准确程度将有所降低, 使得测试误差增加.

抗原和抗体发生反应后, 膜厚 Δ 会增加, 反应在频谱图线上是相位的移动. 因此, 如果测到的干涉图发生了相位的移动, 就可以推知抗体和抗原发生了反应, 也就是说, 可以测出血液里的确存在抗原, 达到测试的目的.

2 检测系统结构

该检测系统由白光光源、“Y”型光纤、光纤连接器、光纤探针、分光光度计、计算机组成. 光纤探针和“Y”型光纤之间由透镜耦合, 使用标准 SMA 接头.

钨卤素灯发出的宽带白光经过耦合进入“Y”型光纤, 向前直通到光纤耦合器, 然后进入光纤探针. 在探针末端发生反射, 有一部分光被光纤截面反射回来, 进入分光光度计.

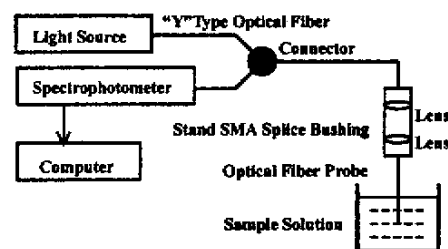


图 3 检测系统组成

Fig. 3 Detecting system structure

分光光度计使用的是美国 oceanoptics 公司的 S2000 光谱仪, 包括分光光路和 A/D 转换电路两部分. 直接和计算机的串口相连. 其中分光的光路采用的是交叉对称水平成像系统, 如图 4 所示.

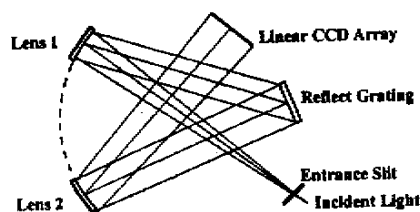


图 4 分光系统光路图

Fig. 4 Spectrometer structure

分光光度计的狭缝为 $25\mu\text{m}$ 宽(高度 $1000\mu\text{m}$), 反射光栅密度为 1200lp/mm , 线阵 CCD 为 Sony ILX511 型 2048-单元 CCD. A/D 电路的采样频率是 500kHz , 分辨率是 12 位.

3 测试过程

3.1 准备

使用硅化方法处理光纤端面, 使光纤端面上面制备一层聚合体的膜(主要成份是聚苯乙烯). 硅化层主要是为了增加膜层的厚度, 并增加光纤对抗体的粘附能力. 膜厚为 μm 级, 折射系数约为 1.509.

3.2 固定抗体层

将硅化后的光纤探针浸入浓度为 $100\mu\text{g/mL}$ 纯化羊抗原 IgG 抗体里, 1h 后用三蒸水清洗光纤端面, 去掉多抗抗体. 这样在光纤端面上, 就有一层聚合体的膜和一层抗体层. 此时采集一组数据并保存.

3.3 固定抗原层

将光纤探针再次侵入人 IgG(即抗原)里, 1h 后用三蒸水清洗光纤端面, 洗去多余抗原. 由于抗体和抗原发生生物反应, 所以在光纤的端面就有了三层物质: 聚合体层、抗体层、抗原层. 抗体和抗原的集合非常牢固, 结合好的抗原基本不会被清洗掉. 同样的原理, 我们可以将抗原层的增加, 单纯看作是膜厚的增加. 此时再采集一组数据并保存.

3.4 讨论

用椭圆偏振法测得单分子抗体层的厚度约为 $5\sim 7.5\text{nm}$, 抗原层和抗体层有近乎相近的大小和化学生物特性. 被测试的蛋白质分子层厚度远小于照射光的波长, 当抗原抗体发生反应导致蛋白质层厚度增加的时候, 由于蛋白质层和硅化层物质的折射率很接近, 我们可以将增加的蛋白质层仅作为聚合体膜在厚度上有所增加. 蛋白质分子层的折射系数约为 $1.44\sim 1.51$.

4 测试结果

测试结果如图 5 所示. 图 5(a)给出的是未经处理过的数据, 包括抗原和抗体反应前后的两条谱线. 图 5(b)给出的是信号处理后的数据, 也包括抗原和抗体反应前后的两条谱线. 图 5(b)可以看出有明显的相位移动.

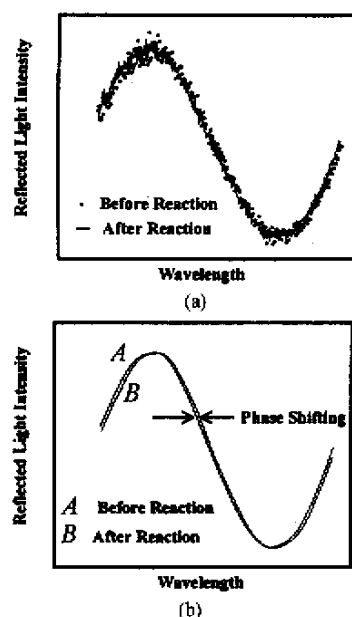


图 5 测试结果

Fig. 5 Testing results

根据采样数据计算出硅化膜的厚度约为 $0.987\mu\text{m}$ (含抗体和抗原层在内), 增加的膜厚(即为抗原层)的厚度约为 7nm . 测试误差小于 1nm .

在后面的系列实验中, 我们还做了不同浓度抗体和抗原的梯度实验, 实验证明, 即便是抗原或抗体的浓度很小(如 $1\mu\text{g/mL}$), 增加粘附的时间, 仍然可以达到检测的目的.

5 信号处理

A/D 采样后的信号通过串口被送入计算机进行数据处理. 数据处理主要包括去噪、光学信号处理、计算极值点、计算膜厚和计算折射率.

由于系统误差主要来自外界杂散光噪音和分光光度计里线阵 CCD 的高频噪音. 为了提高信噪比, 改善图形质量, 必须去噪. 首先采用了频域平均法, 也就是对同一片膜在实验条件不变的情况下采集 n 组数据, 进行频域平均, 可以使 S/N 比提高 $\sqrt{n}$ 倍. 实验中 $n=4$. 然后使用二次向量相减法, 即在光源打开的情况下, 遮盖住裸光纤的端面, 测量反射回来的光谱, 也就是背景噪音数据, 然后用实际测量的数据减去背景噪音, 可以去掉大部分杂散光噪音. 再使用 9 阶巴特沃斯低通滤波器, 去掉 CCD 的高频噪音. 此时得到的图象消除了绝大部分的系统噪音, 图象比较平滑, 可以进行数据分析了.

计算极值点的方法如前所述。

6 与表面等离子体共振 (SPR) 技术的对比

近年来,生物传感器发展很快。SPR 传感器、光栅生物传感器、法布里-珀罗脱生物传感器都可以用来测定生物膜层的厚度。其中 SPR 传感器测量生物膜的厚度是目前较为常用的技术。该传感器包括一个镀有薄金属镀层的棱镜,其中金属层成为棱镜和绝缘体之间的界面。如图 6 所示。

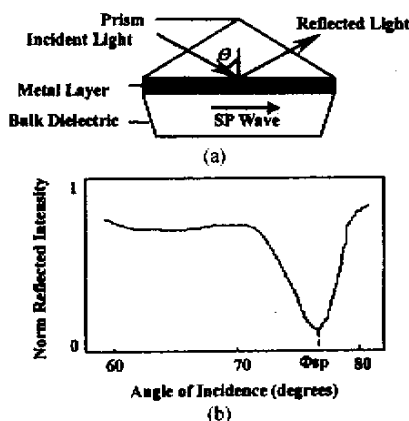


图 6 表面等离子体共振 (SPR) 传感器

Fig. 6 Surface plasmon resonance (SPR) sensors

一束横向的磁化单向偏振光入射到棱镜的一个面上,被金属层反射,到达棱镜的另一面。反射光束的强度可以测量出来,用来计算入射光束的入射角 θ 的大小。反射光的强度在某一个特殊的入射角度 Φ_{SP} 突然下降,就在这个角度,入射光的能量与由金属-绝缘体交接面激励产生的表面等离子共振 (或“SPR”) 相匹配。将一层薄膜 (如生

参考文献

- 1 Brecht A, Ingenhoff J, Gauglitz G. Direct monitoring of antigen-antibody interactions by spectral interferometry. *Sensors and Actuators*, 1992, B6(1):96~100
- 2 Zhou Chonghua, Pivarnik P, Auger S, et al. A compact fiber optic immunosensor for Salmonella based on evanescent wave excitation. *Sensors and Actuators*, 1997, B42(1):169~175
- 3 Fabricius N, Gauglitz G, Ingenhoff J. A gas sensor based on an integrated optical Mach-Zehnder interferometer. *Sensors and Actuators*, 1992, B7(3):672~676
- 4 Rudraraju S, Anbo W, Murphy K A, et al. Acoustic wave propagation in composite materials: an experimental study. *SPIE*, Jul 1994, 2191:487~483
- 5 李全臣, 庞月娟. 光谱仪器原理. 北京: 北京理工大学出版社, 1999
- 6 王东升, 阳运平. 红外反射法测量薄膜构件的膜厚. *仪器仪表学报*, 1996, 17(3):255~259

物膜) 沉淀在金属层上, 绝缘物质的折射系数会发生改变。折射系数依赖于绝缘物质和沉淀膜的厚度和密度的大小。测试陷波角的值, 沉淀膜的厚度和密度就可以推导出来。测试灵敏度可以达到 nm 级。

SPR 传感器是先进的, 它不需要生物测试中常常要用到的有毒的指示剂 (如荧光指示剂), 也可以进行实时测量。而我们的仪器与之对比, 其优点在于: 1) 采用的是宽带白光光源; SPR 传感器需要偏振光作为光源, 多采用固定光源入射波长。2) 使用一次性光纤探针使测试更简单方便; SPR 传感器的清洗则复杂得多, 而且必须将很薄的金属膜 (50nm 左右) 镀在棱镜上。这些都将增加测试成本。

另外, 通常医学检测中的生物样本数量是很少的, SPR 传感器有相对大的圆柱型表面, 意味着需要较大容量的测试样本, 我们的光纤探针需要测试样本的量则非常少。由于需要调整入射光的角度, 所以 SPR 传感器不适合做体内检测, 而我们的仪器则有望进行体内测试。

7 小结

本文给出了利用白光干涉原理, 通过光纤生物探针测试抗原 (或抗体) 是否存在的一种新型生物传感器方法。这种光纤生物传感器在国内和国外还没有被开发, 它具有体积小、无毒、可同时达到多种化验目的特点, 同样的方法还可以用于其他很多类似的情况, 很有使用价值和市场前景。

本文的主要思路已在美国申请专利。专利号: 5,804,453. Sep. 8, 1998.

FIBER OPTIC DIRECT-SENSING BIOSENSOR APPLIED IN DETECTING BIOLAYER THICKNESS OF NANOMETER GRADE

Sun Yan^{1,2}, Sun Feng², Yang Yuxiao¹, Tan Yushan¹

1 Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710049

2 Engineering University Of Air Force, Xi'an 710038

Received date: 2001-11-13

Abstract The fiber direct-sensing biosensor is developed. Thickness of nanometer level biolayer can be detected. It gives the testing process and testing result, also gives the method of improving S/N . The article compares the surface plasmon resonance (SPR) technology with this sensors at last.

Keywords Antigen; Antibody; Optics fiber; Interference; Fiber direct sensing biosensor



Sun Yan was born in 1971, candidate for Ph. D. She obtained B. S degree from Detecting Technology and Instrument Department of Electronic Science and Technology University of Xi'an in 1992, and received M. S. degree from Electronic Engineering Department of Engineering University of Air Force in 1995. Since 1992, She is major in research of iatrical detecting instrument, precision optronic measurement. Now, she is studying at the Institute of Laser & Infrared Applications of Xi'an Jiaotong University.