

时间分辨荧光光纤生物传感器的研制及应用

高 术¹, 戴长生², 吴冠英²

(1. 上海大学理学院物理系, 上海 201800; 2. 安徽光学精密机械研究所, 安徽 合肥 230031)

摘要:首次研制了一种完全利用光纤实现光耦合及传输的时间分辨荧光光纤生物传感器。该传感器以镧系离子(铕离子)作为被检测物质的荧光标记物, 根据铕离子的荧光特性, 利用时间分辨检测技术进行生物医学检测。光学部分采用光纤耦合器和石英光纤作生物样品激发光的传导光学元件, 生物样品受激发产生的荧光也同样由光纤耦合器及光纤收集和传导, 实现了该传感器的紧凑性和小型化, 提高了检测灵敏度。经性能测试, 该仪器不稳定性小于2.3%, 重复测量的互相关高达99.9%。测铕离子标准液的检测限为 7.3×10^{-10} g/L, 达到国外有关文献报道的水平。

关键词:时间分辨荧光光纤生物传感器; 光纤耦合器; 免疫分析

中图分类号: TN253, TP212.3 **文献标识码:** A

1 引言

在生物医学领域, 免疫分析技术已相当成熟。其中采用长寿命的镧系离子为荧光示踪物的时间分辨荧光免疫分析法(T_{RFIA}), 不但在灵敏度、专一性、稳定性、操作方便等方面都可与灵敏度最高的放射免疫分析法(RIA)相媲美, 而且可用于测量药物、激素、酶、核酸、肿瘤标志物、NK细胞等多种物质, 已成为目前超微量物质免疫分析中最有发展前途的技术。然而, 检测技术的发展要依赖于检测仪器的开发。目前, 国内外已报道的用时间分辨荧光技术为原理进行免疫分析的仪器^[1]都存在仪器体积大, 测量本底较高, 对测量环境要求(在暗室中测量)苛刻等一些人们一直想解决的大问题。本文这里首次报导的时间分辨荧光光纤生物传感器(T_{RFBS}), 有效地利用了光纤的抗干扰, 尺寸小, 易弯曲等特点, 利用光纤耦合器进行光耦合和传输, 使光学系统小型化, 一体化, 降低了损耗, 提高了仪器的信噪比。特别是用光纤作为测量臂, 使样品在非暗室中即可进行直接测量。

2 装置设计及工作原理

设计并研制成功的传感器工作原理如图1所示。

本仪器利用时间分辨荧光测量技术进行生物样品荧光信号的检测, 根据脉冲取样法, 当一束脉冲激发光过后, 选择合适的延迟时间, 待样品中自然本底的短寿命干扰荧光完全衰变掉后, 再选择

合适的采样门宽来测量生物样品产生的荧光。实现上述过程, 需要有一个与脉冲激发光同步的信号, 来控制采样门的开启。最简单可行的方法就是将一束脉冲激发光分成两束, 让其中一束直接接触发光电管(PT)。首先, 经放大(PA)作为激光参考信号, 与荧光信号做比率处理, 以降低激发光光强波动对测试的影响; 其次, 经脉冲发生及整形电路, 作为同步整形工作的控制信号。另一束激光光作为激发光, 经光纤探头激发生物样品, 产生特有的镧系离子荧光, 荧光信号被光电倍增管(PMT)接收, 将光强变化转换成电信号, 经译码, 最后显示输出。

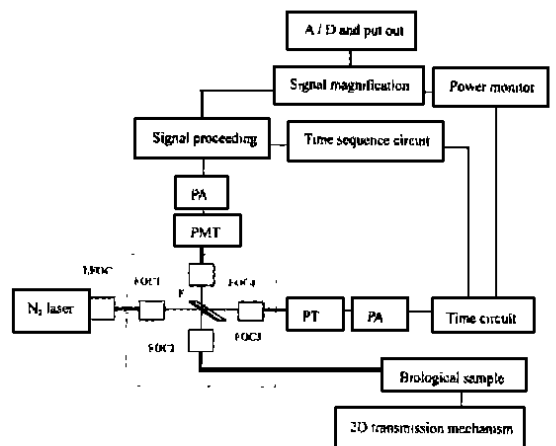


Fig. 1 Principle of time resolved fluorescence fiber-optic biosensor

目前国外报道的时间分辨免疫分析的仪器,对激发光和探测光的传输、收集和检测是采用常规的光学系统(其中包括如反射镜、透镜组、滤光片组、狭缝等光学元件)实现的。上述仪器在光路布置和结构上存在许多缺点:

(1) 为控制光束质量,光路中加入了滤光片、狭缝等元件,而每增加一个元件,就要增加一个支架,支架越多,对平台的平整度及各元件的定位要求越高;

(2) 对光学玻璃来说,光通过每一个面,都要有 4% 的光能量损耗,因此,光学系统中,光学元件越多,能量损耗越大;

(3) 占用空间大,不易实现仪器小型化;

(4) 光路布置灵活度低,调节难度大,一旦光路被破坏,很难恢复。

针对上述已有设备在光路布置方面的不足,本仪器采用体积小巧的光纤耦合器和易于弯曲石英光纤用作激发生物样品的激光束的传导光学元件,生物样品受激发产生的荧光也同样由光纤耦合器及光纤收集和传导,实现了仪器的紧凑性和小型化,降低了损耗,并可提高仪器的信噪比。

本仪器的光学系统主要用四根光纤、两组光纤耦合器(LFOC、FOC1、FOC2、FOC3、FOC4)和一个双色干涉滤光片(F)来实现系统的光传输。其光学系统光路示意图如图 1 中虚框所示。光纤选用数值孔径为 0.22,纤芯直径为 $400\mu\text{m}$ 的阶跃型石英光纤(北京玻璃研究所);两组光纤耦合器为自行设计的透镜式耦合器。其中,耦合器 LFOC 将激光源的输出光耦合到光纤中。该耦合器须具有较大的通光孔径和短焦距,以提高耦合效率并节省空间,因此在该耦合器设计中采用透镜组来实现光耦合;另外一组光纤耦合器由四个结构、大小完全相同的耦合器 FOC1、FOC2、FOC3、FOC4 组成。两组耦合器结构小巧,有效节省了空间。在光路设计中,分光元件的选取是关键,它选择的恰当与否,直接影响光学系统结构的繁简和荧光检测灵敏度的高低。Richard 等^[2]曾重点讨论了荧光光纤传感器分光元件的选择问题。基于仪器测量的要求,选用双色干涉滤光片 F 作为分光元件,使分光镜反射激发光而透过荧光。该双色镜是在 Q30 的平板玻璃上镀膜制成,其工作角度为 45° ;透射波长为 $\lambda = 613\text{nm}$ (生物样品受激后发出的荧光的波长),透射率为 80%;反射波长为 $\lambda = 337.1\text{nm}$ (激发光波长),反射率为 90%。

该仪器的光学系统部分的工作过程为:氮分

子激光器发出的紫外光经光纤耦合器 LFOC、FOC1 后,经双色镜 F 分光,10% 的光透射,为耦合器 FOC3 耦合,经光纤传输触发电极管(PT),并放大后作为控制信号;90% 的光经 F 反射被耦合器 FOC2 耦合进入光纤测量臂,由光纤探头出射以激发生物样品。生物样品受激后所发出的特征荧光,由光纤探头收集,经耦合器 FOC2 并透过双色镜 F 后,经耦合器 FOC4 耦合,到达光电倍增管(PMT),经放大、光电转换,最后译码输出。

光学系统部分制成一体化,光路调节方便,稳定性高。光纤的可弯曲性,尽可能大地节省了空间,使仪器小型化,进而可制成便携式的传感器。利用光纤作光传输介质,使生物样品不必放入暗室中即可直接进行测量。另外,由于光纤的抗干扰能力强,传输效率高等特点,使仪器的信噪比大大提高。

3 最佳激发方向和最佳测试点的确定

3.1 最佳激发方向的确定

实验样品置于聚苯乙烯的微滴定板条中,它由 12 个孔组成。将光纤探头分别从微滴定孔的上方、侧面及底面激发样品并接收样品产生的荧光。比较三个方向接收到的荧光强度值,从而确定最佳激发方向。

3.1.1 方法与结果

取一条干净的微滴定条,用加样器分别取 $10\mu\text{L}$,浓度为 $10^{-12} \sim 10^{-15} \text{mol/hole}$ 浓度的 EuCl_3 溶液分别滴入微滴定条的各孔中,每种浓度制 2 个平行样,测量结果取平均值。在每个小孔中分别滴入 $200\mu\text{L}$ 的增强液制成梯度液。将微滴定板条轻微震荡 10min,使样品混合均匀。将光纤探头分别置于微滴定孔的上方、侧面、底面三个方向激发样品,测量 Eu^{3+} 的荧光强度值,并进行比较。测量结果列表 1 如下。

Table 1 Fluorescence intensity measured from different exciting directions

Eu ³⁺ Concentration (mol/hole)	Average fluorescence intensity from different exciting directions (PMT counts)		
	over	outside	below
10^{-15}	987	981	984
10^{-14}	997	999	999
10^{-13}	1330	1502	1386
10^{-12}	13868	13792	13973

3.1.2 结 论

实验中忽略了样品池壁的光吸收。由于荧光的各向同性,光纤探头可以从上面、侧面、底面激发样品并接受荧光。从表中数据可以看出,从三个方向激发样品所得的荧光强度值相差不大,考虑到光纤探头的固定方便以及为以后发展成本征型光纤生物传感器,使其测试方法与本征型光纤生物传感器相一致,以下实验均选择从微滴定板孔上方激发样品并接受荧光。

3.2 最佳测试点的确定

用光纤探头测定样品的荧光强度时,发现光纤探头相对于液面不同位置直接影响荧光强度值。另外,由于加样误差的存在,即微滴定板的一排孔中加样后,液面不一定完全一致。因此,有必要找到统一的最佳测试点,为此,从最佳测试方向激发样品,进行最佳测试点的确定实验,希望能发现一个对准精度要求不高而且荧光强度值最大的位置进行测量。

3.2.1 方法与结果

取一干净的微滴定条,用加样器取 $10\mu\text{L}$ 浓度为 10^{-13} mol/hole 的 EuCl_3 溶液滴入微滴定孔中。在该孔中注入 $200\mu\text{L}$ 的增强溶液。振荡微滴定板条,使两者充分反应。将光纤探头置于相对液面的不同位置进行荧光强度的测定。

实验测得的结果如图 2 所示。光纤探头在液面上方时,随着与液面的距离的缩短,荧光强度值逐渐增加;接近液面时,荧光强度增加的幅度加大;当光纤端面与液面相齐时,荧光强度有一个突变;当光纤伸入液面 0.25mm 时,荧光强度达到最大值。随着光纤的伸入,在 $0\sim 3\text{mm}$ 之间荧光强度基本恒定。之后荧光强度随着光纤伸入液体的深度加大而减小。

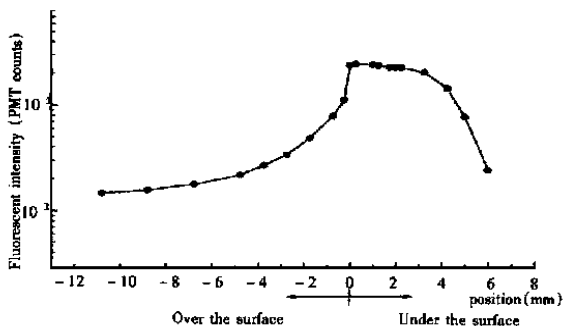


Fig. 2 Dependence of fluorescence intensity on the distance between the end face of fiber and the surface of the liquid

3.2.2 结果分析

(1) 由实验结果可知,光纤探头的端面在与液面接触处,荧光强度有一个突变。分析原因,是由于在同种介质中光到光纤的直接耦合要比在不同介质间光到光纤的直接耦合损耗要小,耦合效率高。

(2) 当光纤探头伸入液体过程中,荧光强度值先保持恒定,然后减小。这可能是由于光纤探头激发样品并能接收到的荧光体积范围是个定值;当测试液体积大于等于该临界体积时,接收到的荧光强度值不变。随光纤探头进一步伸入测试液体,液体的被激发体积小于临界体积,使荧光强度明显减小。由此推论,如果样品池很大,则光纤在液面下很大范围内,测得的荧光强度基本恒定,即测量时不需考虑光纤放置的具体位置。这对于该传感器在环境监测领域的应用提供了良好基础。该实验结果可以建立理论模型来定量说明,具体内容将另行发表。

(3) 实验前,考虑到加样等误差的存在,从孔上方接收会给实验数据带来对准误差。分析实验结果曲线可知,在光纤探头伸入液面下一段距离 ($0\sim 3\text{mm}$) 内,荧光强度值基本恒定。由于加样误差 $< 1\text{mm}$,因此,根据最低液面位置选取最佳测试点进行测量,对准误差即可忽略。而且为我们以后的实验奠定了基础,更重要的是,它为传感器的实用性提供了依据。

4 性能测试

通过实验确定光纤探头相对于微滴定板条上每个孔的最佳激发位置和最佳测试点后,进行该传感器的性能测试实验。

4.1 试剂与方法

增强液、用去离子水(电阻率达 $2 \times 10^4 \Omega \cdot \text{m}$ 以上)配制成的浓度为 $10^{-11} \sim 10^{-16}\text{ mol/hole}$ 的 EuCl_3 标准梯度溶液。将 EuCl_3 标准梯度溶液用加样器分别加入样品条的各孔中, $10\mu\text{L/hole}$, 每种浓度加两孔;将各孔中加入增强液, $200\mu\text{L/hole}$, 取两孔加入 $210\mu\text{L/hole}$ 增强液作为空白参比;将样品条置于振荡器上振荡 5min , 使增强液和 EuCl_3 溶液充分反应,之后,静置 10min 后,进行荧光测量。

4.2 检测限的确定及检测灵敏度曲线的标定

检测限是指仪器所能分辨的最低物质浓度极限。它是衡量、测试仪器性能的重要指标之一。测

量结果如表 2、图 3 所示。

Table 2 Fluorescence intensity of Eu³⁺ standard solution

Eu ³⁺ Concentration (mol/hole)	10 ⁻¹⁶	10 ⁻¹⁵	10 ⁻¹⁴	10 ⁻¹³	10 ⁻¹²	10 ⁻¹¹
Fluorescent intensity (PMT counts)	138	302	741.3	3311	7244	29512
Standard deviation	0.097					
Relativity	99.52%					

根据检测限公式:

$$DL = \bar{X} + ka \tag{1}$$

其中 k 为置信误差 ($k = 3$ 时, 置信度 99.6%), \bar{X} 为平均空白值, a 为空白标准偏差, 算出传感器的检测限为 10⁻¹⁵ mol/hole; 即对 Eu³⁺ 浓度的检测限为

$$\begin{aligned} \text{Eu}^{3+} \text{ 浓度} &= \frac{\text{每孔中 Eu}^{3+} \text{ 的量}}{\text{每孔中溶液体积}} = \frac{10^{-15}}{210 \times 10^{-6}} \\ &= 4.8 \times 10^{-12} \text{ mol/L} \\ &= 7.3 \times 10^{-10} \text{ g/L} \end{aligned} \tag{2}$$

可见该传感器测 Eu³⁺ 的浓度检测限为 10⁻¹² mol/L。达到国外有关文献报道水平^[1]。

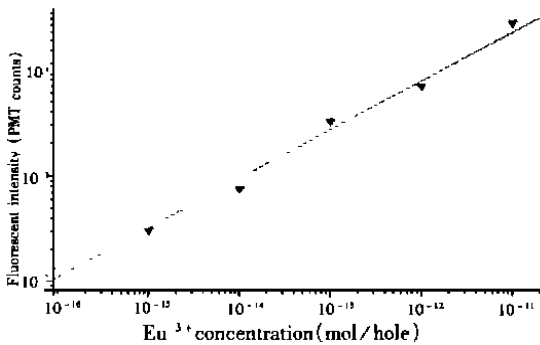


Fig. 3 Characteristic curve of TFFBS measured with Eu³⁺ standard concentration

从上面实验结果得出的检测限及定标曲线, 可得出本传感器测试曲线的定标律。取 P_c 为光电倍增管的计数值, ρ_M (mol/L)、 ρ_g (g/L) 分别为 Eu³⁺ 溶液的浓度和质量密度, 该定标律为

$$P_c = 1.18 \times 10^8 \rho_M^{0.497} \tag{3a}$$

$$P_c = 9.7 \times 10^6 \rho_g^{0.497} \tag{3b}$$

经上述定标后, 在进行检测时, 可以通过测得的荧光强度值来确定被检测液中的 Eu³⁺ 浓度, 从而判断该被测液的优良。

4.3 稳定性测试

稳定性系指仪器在测量中对同一样品所测得的数据的重复率。它也是衡量测试仪器性能的一个重要指标。仪器稳定性的好坏直接关系到测试数据的可靠性及正确性。为此, 我们对同一条样品分两次进行重复测量, 考察该仪器的重复性, 之后进行稳定性判定实验。

4.3.1 重复性测试实验

考虑到增强液在空气中的稳定性, 在进行重复性测试实验中, 时间不宜间隔太久, 我们对同一条样品条梯度液, 间隔 5 小时进行重复测量两次测量数据制成对比曲线图如图 4 所示。

4.3.2 稳定性测试实验

对同一条梯度液进行测量, 对每孔测量 10 次以上, 结果取平均值。测得数据如表 4 所示。

4.4 结论

从重复性测试实验的两次测量所得曲线来看, 不同浓度对应的荧光强度变化趋势相同, 相关性均达到 99.13%, 两次测量的荧光值互相关性高达 99.99%; 从稳定性测试实验可以看出, 该仪器的不稳定性均小于 2.3%。表明该仪器有很好的重复性、稳定性和可靠性。

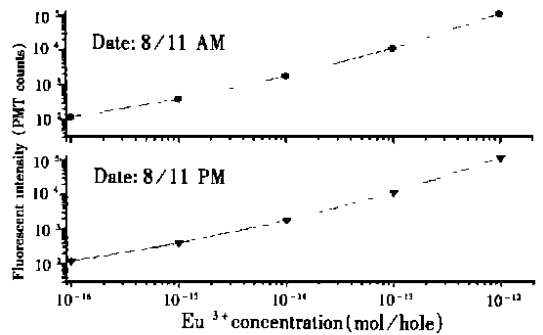


Fig. 4 Contrast curve of Eu³⁺ fluorescence intensity

Table 3 Stability of TFFBS

Eu ³⁺ Concentration (mol/hole)	Times of measurement	$\bar{X} \pm \Delta S$	Uncertainty
10 ⁻¹⁶	10	720.1 ± 7.4	2%
10 ⁻¹⁵	13	769.8 ± 8.8	2.3%
10 ⁻¹⁴	11	844.6 ± 7.4	1.75%
10 ⁻¹³	12	1531 ± 11.4	1.49%

5 应用前景

时间分辨荧光光纤生物传感器的灵敏度高,方法简便、快速、稳定可靠等特点,使它在生物学及环境监测中具有广阔的应用前景。用时间分辨荧光光纤生物传感器可以测定血清,甲状腺激素等半抗原物质,可以进行蛋白质类化合物分析,

核酸探针分析,细胞活性分析等。

特别是目前生物学上的检测技术还处于主要以免疫分析为基础的阶段,而对于一些重要病症,早期诊断—基因诊断已成为人们关注的焦点。时间分辨荧光光纤生物传感器可以用于核酸检测,将待测的复制膜置于传感器的位移台上,用光纤探头进行连续扫描探测。开发成功,会成为有关科研人员攻克基因检测难关的便利工具。

参考文献:

- [1] Petrea R D, Sepaniak M J. Fiber-optic time-resolved fluorometry for immunoassays[J]. *talanta*, 1988, 35(2): 139 - 144.
- [2] Thompson R B, Levine M, Kondracki L. Component selection for fiber-optic fluorometry [J]. *Applied Spectroscopy*, 1990, 44(1): 117- 122.

Development and application of time-resolved fluorescence optical fiber biosensor

GAO Shu¹, DAI Chang-sheng, WU Guan-ying

(1. *Department of Physics, Shanghai University, Shanghai 201800, China;*

2. Anhui Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China)

Abstract: A time-resolved fluorescence optical fiber biosensor (TFFBS) for biomedical detection is developed for the first time. By using lanthanide ions, especially europium ions as the fluorescent labels of samples, TFFBS can perform time-resolved fluorescence detection from spectral characteristics of europium ions. This instrument has a novel optical system, composed mainly with fiber couplers and optical fiber, for the collection and guiding of both exciting light and fluorescence of samples. Owing to its flexibility and convenience in adjusting, TFFBS has small size and high detecting sensibility. The unstable property below 2.3% was demonstrated in experiments. The mutual correlation in duplicate measurement is 99.9%. The detection limit is 7.3×10^{-10} g/L for Eu 2-maphthyltrifluoroacetate, which reaches the levels reported in foreign literature.

Key words: time-resolved fluorescence fiber-optic biosensor; optical fiber coupler; immunoassay

作者简介:高术(1972-),女,吉林省长春市人。1994年毕业于长春光学精密机械学院光电工程系光学精密仪器及电子技术专业,获工学学士学位;1997年于中科院安徽光学精密机械研究所获理学硕士学位;现在上海大学理学院物理系任教。