

多通道 SPR 影像传感器及其对 DNA 的特异性检测

刘国华, 张福海, 俞 梅, 贾芸芳, 张 维, 岳 钊, 常 露, 牛文成

(南开大学信息技术科学学院, 天津 300071)

摘 要: SPR 传感器的响应包括多种成份,除了待测分子与探针分子相互结合引起的响应(特异性响应)外,还有样液中其它成份及其浓度的变化、温度变化以及非待测分子与敏感膜的相互作用引起的响应(非特异性响应). 后者的存在会严重影响 SPR 传感器的测量精度. 本文提供了一种提高检测精度的方法,即采用多通道 SPR 影像传感器结构,通过不同通道之间的比较,提取出待测分子与探针分子之间相互作用所引起的响应,在真正意义上实现了对生物分子相互作用的实时、动态检测. 通过对 DNA 的检测,证明这种方法对生物分子相互作用的特异性检测是行之有效的.

关键词: 表面等离子共振; 多通道影像传感器; 特异性响应; DNA

中图分类号: TP212.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0372-2112(2006)11-1990-04

Multi-Channel SPR Imaging Sensor and Specific Detection of DNA

LIU Guo hua, ZHANG Fu hai, YU Mei, JIA Yun fang, ZHANG Wei, YUE Zhao, CHANG Lu, NIU Wen cheng

(College of Information Technology, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: The response of SPR sensor includes two components: specific response and non specific response. The former is due to the capture of analyte molecules by target molecules immobilized on the sensor surface, and the latter is due to the adsorption of non target molecules to sensor surface and temperature fluctuations or sample variations of composition and concentration. The existence of non specific response reduces the precision of SPR sensors. In this paper we provide a kind of multi channel SPR imaging sensor structure to improve the accuracy of SPR sensors. It can discriminate between the specific response and the non specific response by comparison of different channels, and realize the real time detection of the biomolecular interactions. This method is demonstrated effective on specific detection by testing for DNA.

Key words: surface plasmon resonance; multi channel imaging sensor; specific response; DNA (deoxyribonucleic acid)

1 引言

自从 1983 年表面等离子共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)现象第一次被用于生物检测领域以来^[1],作为检测生物分子相互作用的一种方法,SPR 传感技术逐渐引起了越来越多国内外科研工作者的广泛关注,目前已经成为生物传感技术领域的研究热点^[2]. SPR 传感器因其适合于表面分析,且不需要标记,可动态、实时、定量检测生物分子及其相互作用,已经显示出其在生物传感技术领域所具有的潜力^[3].

SPR 传感器的结构可分为多种耦合方式,其基本原理大致相同,其中棱镜耦合方式因其最为简单易行而被广泛采用. 在这种结构中,入射光通过入射棱镜在棱镜和金属膜的界面发生反射,用检测器检测反射光强,在金属膜上制备有一层含有探针分子的敏感膜,与含有待测分子的样液充分接触. 一般情况下,入射光在入射棱镜与金属的分界面上会发生全反射,在金属内产生的消逝波传播深度非常有限,全部光能均反射

回第一介质即棱镜. 然而当入射光的波长与入射角满足一定条件时,检测器检测到的反射光强会大幅度地减弱,表明此时发生了表面等离子共振,即一部分能量通过消逝波在金属与敏感膜的界面上激发产生了表面等离子波(Surface Plasmon Wave, SPW),或者说消逝波与 SPW 发生了共振. 共振波长和共振角与敏感膜及被测样液(主要是敏感膜)的介电常数有关,而敏感膜的介电常数在与被测物质的相互作用过程中会发生变化,从而引起共振角或共振波长的变化. 因此通过检测共振波长或者共振角的变化可以了解被测物及其与敏感膜作用的信息. 选择恰当的测量方法与数学处理手段,可以计算待测分子在单位面积的结合量^[4]以及分子反应的动力学过程^[5].

SPR 传感器的基本原理决定了这种传感器所测得的响应是由多种因素引起的. 除了待测分子与敏感膜上的探针分子相互作用可以改变敏感膜的介电常数,从而改变共振角或共振波长(特异性响应)外,样液中其它成份及其浓度的变化、温

度变化会引起样液介电常数的变化,而且样液中非待测分子与敏感膜的相互作用会直接改变敏感膜介电常数;这些变化最终都将引起共振角或共振波长的变化(非特异性响应)^[6].因此要提高特异性响应的检测精度,就必须从实际测得的响应中剔除非特异性响应.针对这一问题,已经有人采用引入参考通道,通过对多通道反射的复色光进行光谱分析的方法进行了研究,并取得了良好的效果^[7,8].

本文采用多通道 SPR 影像传感器,通过影像分析的方法,检测得到单色光在不同通道产生的共振角并进行比较分析,很好地克服了非特异性响应对检测精度的影响.将这种方法用于 DNA 的检测分析,并与单通道检测结果进行比较,证明了这种方法可以真正实现 DNA 分子的实时、动态和特异性检测,而且具有简单、易实现的特点.

2 DNA 的单通道检测结果及分析

被检测的 DNA 分子为“与细胞质雄性不育有关的基因片段”(为方便,以下称作“YM-DNA”),样液由南开大学生命科学院提供.采用适当的方法可以将探针分子固定在金膜表面^[9].在检测过程中,先后通入磷酸盐缓冲液 PBS、变性后的 YM-DNA 溶液、磷酸盐缓冲液 PBS,测量结果如图 1 所示.

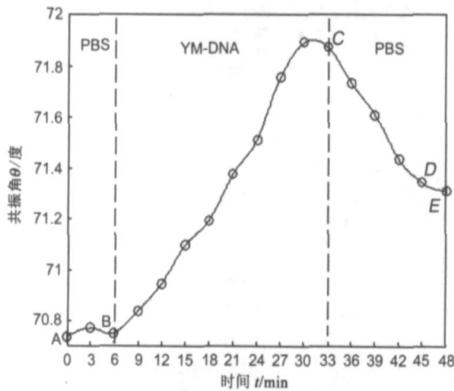


图 1 DNA 的单通道测试结果

从图中可以看出,整个曲线可以分为四个部分. AB 部分对应的样液为 PBS 缓冲液,在这一过程中,共振角没有明显变化,说明 PBS 缓冲液与敏感膜之间没有明显的相互作用.

BC 部分对应的样液为含有 DNA 的样品,在此阶段,共振角随时间明显变大,说明 DNA 分子与敏感膜之间发生了相互作用.由于 DNA 分子在敏感膜表面的吸附,使得敏感膜的折射率升高,从而引起共振角变大.然后共振角趋于稳定,说明此时 DNA 分子的吸附达到了动态平衡.

CD 及 DE 部分对应的样液为 PBS 缓冲液.其中在 CD 部分对应的时段内,共振角逐渐变小,说明存在 DNA 分子从敏感膜表面脱附的现象.这是因为敏感膜上非特异性结合的分子被 PBS 缓冲液溶解而脱附.在 DE 部分对应的过程中,共振角变化趋于稳定,说明非特异性结合的分子的脱附过程逐渐停止.此时只有与探针分子发生特异性结合的 DNA 分子吸附于敏感膜的表面.

事实上,除了 DNA 分子在敏感膜表面的非特异性结合会引起共振角变化外,样液体内 DNA 分子的杂交作用也会引起

共振角变化(即体响应).以上两方面因素引起的共振角变化都属于非特异性响应.但值得注意的是, AB 段与 DE 段对应的样液相同,都是 PBS 缓冲液,然而两者对应的共振角存在明显的差异.造成这种差异的根本原因是待测 DNA 分子与探针分子发生了杂交作用,所引起的共振角变化属于特异性响应.

尽管单通道检测可以通过检测结果的前后比较得到特异性响应的数值,但却无法得到整个反应过程中不同时刻的特异性响应;而多通道检测可以很好地解决这一问题.

3 生物芯片结构与动态响应过程分析

本研究采用方法是:单色光入射,利用单色面阵 CCD 采集 SPR 影像,通过 SPR 影像分析,可以同时检测各通道的共振角.各通道共振角的变化即为各通道的响应.

3.1 生物芯片结构

生物芯片的结构如图

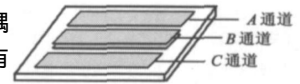


图 2 生物芯片结构示意图

2 所示.在玻璃基片(与耦合棱镜的材料相同)上共有 A、B、C 三个通道.各通道

首先同时生成一层厚度为 50nm 的均匀金膜,然后在 B 通道的金膜上制备厚度约为 15nm 的高折射率电介质层(Ta₂O₅ 或 TiO₂ 等).测试前,在 A、B 和 C 通道制备一层作为交联剂的生物分子膜.然后在 C 通道还要固定探针分子.这样,三个通道的膜结构是各不相同的.

3.2 动态响应过程分析

SPR 传感器的总响应由体响应和表面响应两部分组成.体响应即是指待测样液成份、浓度、温度等体内变化所引起的共振角的变化;表面响应是指当薄膜表面与样液中的分子发生相互作用时所引起的共振角的变化.由于 B 通道的金膜表面存在一层电介质膜,使得 A、B 两个敏感通道上表面等离子体场的分布不同.电磁场渗入到样液内越深,则体内折射率的变化对总响应的影响越大.因此两个敏感通道有不同的体灵敏度 and 表面灵敏度.

表面响应包括特异性响应和非特异性响应.其中,非特异性响应是指样液中非待测分子与敏感膜相互作用所引起的共振角变化;而特异性响应是指样液中待测分子与通道膜表面探针分子的结合引起的共振角变化.因为只有 C 通道固定有探针分子,因此 C 通道的表面响应既包括特异性响应,也包括非特异性响应,而 A、B 两个通道的表面响应只有非特异性响应.

通过对三个通道的比较分析,可得各通道参数之间的一系列重要关系^[10]. C 通道的特异性响应可表示为:

$$\Delta\theta_{SC} = \Delta\theta_C(t) - \frac{B_C}{B_A} b_A - \frac{S_C}{S_A} K_{CA} \quad (1)$$

上式中, $\Delta\theta_C(t)$ 为 t 时刻 C 通道的总响应, B_A 、 S_A 、 B_C 、 S_C 分别表示 A、C 通道的体灵敏度(样液折射率变化一个单位引起的共振角变化)和表面灵敏度(表面折射率变化一个单位引起的共振角变化).其中 $0 \leq K_C \leq 1$, 表示与没有固定探针分子时相比,当表面固定有探针分子时,表面非特异性作用减弱的因子.当 $K_C = 1$ 时,非特异性作用与不固定探针分子时一致;

当 $K_C = 0$ 时, 传感器表面不存在非特异性吸收. K_C 可由实验测定, 但是在一般情况下, 探针分子对非特异性作用的影响很小, 所以一般取 $K_C = 1$. $b_A(t)$ 、 $s_A(t)$ 分别表示 t 时刻 A 通道的体响应和表面响应, 可由以下二式确定:

$$b_A(t) = \frac{(S_A/S_B)\Delta\theta_B(t) - \Delta\theta_A(t)}{(S_A/S_B)(B_B/B_A) - 1} \quad (2)$$

$$s_A(t) = \frac{(B_A/B_B)\Delta\theta_B(t) - \Delta\theta_A(t)}{(S_B/S_A)(B_A/B_B) - 1} \quad (3)$$

其中, $\Delta\theta_A(t)$ 、 $\Delta\theta_B(t)$ 分别表示时刻 A 、 B 通道的总响应, B_B 、 S_B 分别表示 B 通道的体灵敏度和表面灵敏度.

两通道灵敏度的比可以用实验方法来测定. 体灵敏度的比可以用两种不同折射率的样液(应为纯液态物质)进行测量, 并分别记录两通道的共振角. 并通过下式计算:

$$B_B/B_A = \Delta\theta_{B0}/\Delta\theta_{A0} \quad (4)$$

$$B_C/B_A = \Delta\theta_{C0}/\Delta\theta_{A0} \quad (5)$$

其中, $\Delta\theta_{A0}$ 、 $\Delta\theta_{B0}$ 、 $\Delta\theta_{C0}$ 分别为 A 、 B 、 C 通道对两种样液的共振角差.

测定表面灵敏度的比, 需要在两个通道上覆盖一层薄膜, 并分别记录在覆盖前后两通道的共振角, 最后由下式计算:

$$S_B/S_A = \Delta\theta_{B1}/\Delta\theta_{A1} \quad (6)$$

其中, $\Delta\theta_{A1}$ 和 $\Delta\theta_{B1}$ 分别表示 A 、 B 两通道在覆盖薄膜前后的共振角差. 由于 A 、 C 两个通道的不同之处仅在于 C 通道固定有探针分子, 而 A 通道不固定探针分子, 所以 A 、 C 两通道的表面灵敏度 S_A 、 S_C 是相等的, 即 $S_C/S_A = 1$.

4 实验

4.1 多通道影像传感系统

多通道影像传感器系统的总体结构如图 3 所示. 入射光路由发光二极管、透镜、P 偏振片、中心波长为 632.8nm 的滤光片及角向会聚柱面透镜组成. 进样系统由多通道样液池和温控系统(采用 MEMS 技术在硅片上制备)及多通道蠕动泵

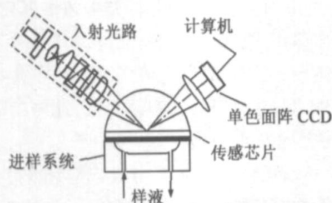


图 3 多通道影像传感系统结构示意图

传感芯片的玻璃衬底

面通过光学耦合液与半柱面棱镜的底面结合. 传感芯片上各种膜的制备采用光刻、溅射工艺. 入射光路产生的角向会聚单色 P 偏振光束正好在传感芯片金表面会聚为一条与三个通道正交的直线. 单色面阵 CCD 与计算机共同完成反射光形成的 SPR 影像的实时采集. SPR 影像中

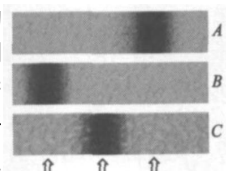


图 4 SPR 影像中各通道共振角的对应位置

不同象素行对应不同的入射角, 其象素值为对应入射角光线的反射光强. 各通道的共振角由 SPR 影像中各对应区域平均象素值最小的象素行的位置确定, 如图 4 中箭头所指位置. 这样对连续采集到的每一帧 SPR 影像进行分析, 就可得到与各帧影像对应时刻各通道的共振角. 进样系统由多通道样液池和温控系统(采用 MEMS 技术在硅片上制备)及多通道蠕动泵

组成.

4.2 实验与结果分析

4.2.1 灵敏度比标定

C 通道的特异性响应可由(1)、(2)、(3)三个等式确定, 其中 $S_C/S_A = 1$, $K_C = 1$, B_A/B_B 、 S_A/S_B 、 B_C/B_A 等灵敏度比需要根据(4)、(5)、(6)三式通过实验进行标定.

表面灵敏度比的标定:

采用以下实验步骤可以确定 A 、 B 通道的表面灵敏度比, 同时完成敏感膜的制备. 在 A 、 B 、 C 三个通道同时通入摩尔比为 1:9 的生物素化硫醇衍生物和 OH 根硫醇稀释液的混合物(PBS 缓冲液环境), 反应足够长时间(16 小时以上), 在各通道表面生成紧密覆盖的自组装单分子膜, 再用 PBS 缓冲液清洗. 然后在各通道顺序通入 PBS 缓冲液、浓度足够高的链酶抗生物素(Streptavidin)(反应约 10 分钟)、PBS 缓冲液, 同时实时检测 A 、 B 通道的共振角, 检测结果如图 5 所示. 由(6)式可求得 $S_B/S_A = 1.20$.

体灵敏度比的标定:

通过下面的实验完成 C 通道探针分子的固定, 并可以测定体灵敏度的比值.

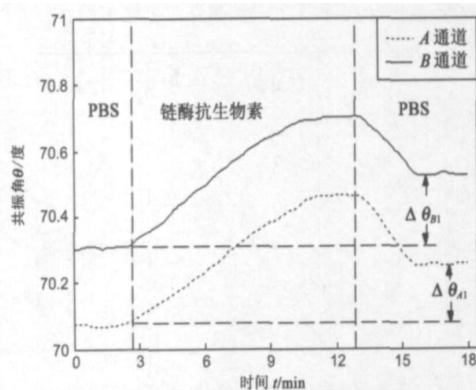


图 5 A、B 通道表面灵敏度比标定

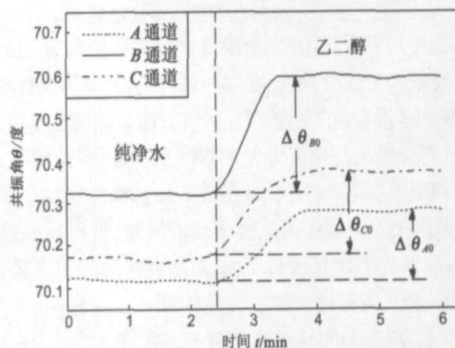


图 6 A、B、C 通道体灵敏度比标定

在图 5 所示实验的基础上, 用 PBS 缓冲液清洗三个通道, 再将含有变性后的 YM-DNA 探针溶液通入 C 通道, 完成探针分子的固定. 通入 PBS 缓冲液清洗 C 通道, 再用纯净水对三个通道进行清洗, 然后三个通道同时依次通入纯净水、乙二醇, 同时实时检测各通道的共振角, 结果如图 6 所示. 因为纯净水和乙二醇都是单分子液体, 所以整个过程的响应都可看作体相应. 按照式(4)、(5)即可求得: $B_B/B_A = 1.75$, B_C/B_A

= 1.18.

4.2.2 检测与分析

在通入待测样液进行检测前,应先通入 PBS 对各通道进行清洗,之后再通入变性后的 YM-DNA 杂交液,并控制杂交温度,实时检测各通道共振角,结果如图 7 所示.从图中可以求得任意时刻各通道的响应(以 PBS 的共振角为基准): $\Delta\theta_A(t)$ 、 $\Delta\theta_B(t)$ 、 $\Delta\theta_C(t)$,结合标定结果,利用(1)、(2)、(3)三个关系式就可以求出 C 通道任意时刻的特异性响应,即 YM-DNA 检测的特异性动态响应曲线,如图 8 所示.

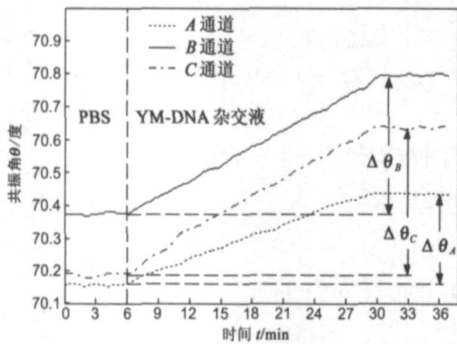


图 7 YM-DNA 样液多通道检测结果

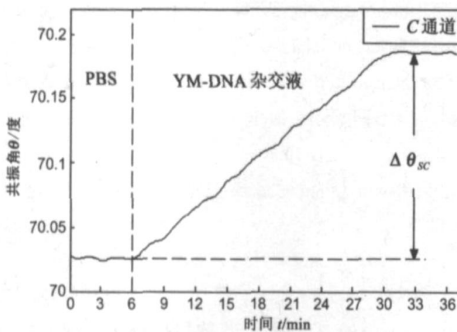


图 8 YM-DNA 检测的特异性动态响应曲线

5 结论

本文研制的多通道表面等离子共振影像传感器克服了待测样液的非特异性响应,提高了检测精度,实现了实时、动态检测 DNA 分子的相互作用所引起的特异性响应.同时该传感系统采用角向会聚入射光、SPR 影像检测等手段,避免了机械调节可能带来的误差,而且便于多通道的实时动态检测.

参考文献:

- [1] B Liedberg, C Nylander, I Lundström. Surface plasmons resonance for gas detection and biosensing [J]. Sensors and Actuators, 1983, 4(2): 299-304.
- [2] Jiří Homola. Present and future of surface plasmon resonance biosensors [J]. Anal Bioanal Chem, 2003, 377(3): 528-539.
- [3] J Homola, S Y Yee, G Gauglitz. Surface plasmon resonance sensors: review [J]. Sensors and Actuators, 1999, B54(1-2): 3-15.
- [4] Zdzislaw Salamon, Yin Wang, Gordon Tollin, H Angus Macleod. Assembly and molecular organization of self-assembly

bled lipid bilayers on solid substrates monitored by surface plasmon resonance spectroscopy [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1994, 1195(2): 267-275.

- [5] Kaija Alfthan. Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering [J]. Biosensors & Bioelectronics, 1998, 13(6): 653-663.
- [6] G G Nenninger, J B Clendenning, C E Furlong, S S Yee. Reference compensated biosensing using a dual channel SPR sensor system based on planar lightpipe configuration [J]. Sensors and Actuators, 1998, B51(1-3): 38-45.
- [7] J Homola, H B Lu, S S Yee. Dual channel surface plasmon resonance sensor with spectral discrimination of sensing channels using a dielectric overlayer [J]. Electron Lett, 1999, 35(13): 1105-1106.
- [8] Jiří Homola, Hongbo B Lu, Gareth G. Nenninger, Jakub Došálek, Sinclair S Yee. A novel multichannel surface plasmon resonance biosensor [J]. Sensors and Actuators, 2001, B76(1-3): 403-410.
- [9] 刘国华, 张维, 常露, 等. SPR 生物传感系统及其对 DNA 的检测分析 [J]. 传感技术学报, 2005, 18(4): 700-704. Liu Guo hua, Zhang Wei, Chang Lu, et al. SPR Biosensor based system and its use in the detection analysis of DNA [J]. Chinese Journal of Sensors and Actuators, 2005, 18(4): 700-704. (in Chinese)
- [10] 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. Liu Guo hua, Zhang Wei, Niu Wencheng, et al. Multi channel SPR imaging sensor and detection of biomolecules [J]. Chinese Journal of Scientific Instrument, 2005, 26(11): 1144-1148. (in Chinese)

作者简介:



刘国华 男,南开大学信息技术科学学院教授,微电子与固体电子学专业博士,主要从事传感器与智能系统的研究.

E-mail: liugh@nankai.edu.cn



张福海 男,南开大学信息技术科学学院副教授,微电子与固体电子学专业博士,主要从事传感器与智能系统的研究.