

一种新型光谱表面等离子体共振二维探测方法 在 DNA 微阵列中的应用

刘 乐¹, 何永红^{1*}, 马绥华¹, 鲁卫平², 赵 欣³, 张雅鸥³, 郭继华¹

1. 清华大学深圳研究生院光学检测与成像实验室, 广东 深圳 518055
2. 第三军医大学大坪医院检验科, 重庆 400042
3. 清华大学深圳研究生院生命学部, 广东 深圳 518055

摘 要 在此前曾提出过一种新型二维折射率探测方法——并行扫描光谱表面等离子体共振(surface plasmon resonance, SPR)成像方法。在这种方法中,使用线形光照明,CCD得到的图像包含SPR光谱信息和一维空间信息,进而通过计算可得到折射率的一维分布信息。通过一维扫描,就能够得到整个被扫描区域内的折射率二维分布信息。该方法具有高灵敏、高通量的优点,适合微阵列(microarray)的检测,并完善了这种方法的数据处理过程,使用空气折射率作为参考,消除了无法精确控制入射角的难题。使用该方法对手工点制的军团菌 mip DNA 探针微阵列进行了检测,证明了这种方法高灵敏无标记地探测微阵列的可行性。我们得到的军团菌 mip DNA 探针制备浓度与其等效折射率的关系,这对基于SPR的微阵列技术的发展有着重要的参考意义。

关键词 SPR; 光谱; 成像; 微阵列; 生物芯片

中图分类号: O436 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3964/j.issn.1000-0593(2010)01-0154-05

引 言

表面等离子共振技术,是一种高灵敏无需标记的光学表面探测方法。其原理是空间电磁波满足一定共振条件时,能量从空间电磁波转移到表面等离子体波(surface plasma wave, SPW),从而表现为反射光的振幅和相位的急剧变化。而由于SPW的消逝波性质,这种共振条件对被测面的微小变化十分敏感,于是通过反射光的振幅和相位的变化,可以高灵敏地探测被测面的折射率变化。再通过被测面上的各种功能膜,就可以把其他各种参量的变化转为折射率的变化,从而实现对各种参量的高灵敏探测。

微阵列(microarray)技术,也称为生物芯片(biochip)技术,是一种生物医学中使用的高通量的检测技术。在面积不大的基片表面上有序地点阵排列一系列探针分子,结合反应在相同条件下进行,结果用专门的仪器读取。微阵列技术可以大大提高检测效率,减小工作量,增加可比性,在生物学研究领域占有十分重要的位置。目前微阵列的探测方法有同位素法、化学荧光法、化学发光法或酶标法等。但是这些

方法都需要对样品或探针分子进行标记,会影响被测反应,增加样品制备工序和造价。SPR技术则是高灵敏、无标记地检测微阵列的合适方法。

从探测维度上说,SPR传感方法可以分为点探测和二维探测。目前点探测SPR传感方法已经成功应用于物理、生物、化学等领域^[1-6]。而为了探测微阵列,需要基于SPR的二维探测技术。

Rothenhausler等提出了SPM(surface plasmon microscopy)^[7],固定波长和入射角直接用CCD成像。但是这种方法所成图像的灰度值并不与折射率线性对应,因而只能定性而非定量地测量折射率的变化;而且这种方法只能测量不大的折射率变化范围,超过这个范围,2个不同的折射率可能对应相同的灰度值。陈义等使用这种SPM进行了应用^[8],并且还使用了另一种白光照明的彩色SPM^[9],但是同样不能提供定量的测量结果。

O'Brien等^[10]使用线形光源照明,使用CCD得到含有一维空间信息和SPR角度谱的图像。利用这种方法,可以实时地定量测量被测面内的一维折射率变化,还可以通过一维扫描来实现整个被测面的二维折射率测量。但是,角度谱测

收稿日期: 2008-12-06, 修订日期: 2009-03-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(30770592, 60608019)和国家“863”项目(2006AA06Z402)资助

作者简介: 刘 乐, 1980年生, 清华大学深圳研究生院博士 e-mail: liule99@mails.tsinghua.edu.cn

* 通讯联系人 e-mail: heyh@sz.tsinghua.edu.cn

量要求使用波长固定的激光作光源, 而由于激光的强烈相干性, 会产生散斑(speckle)效应, 严重影响成像质量。虽然可以使用旋转散射片等一些方法降低相干性, 但是散斑仍很难去除, 探测灵敏度会受到影响。

Yuk 等^[11]采用二维扫描的方法测量被测面每一点的 SPR 光谱, 找到该点对应 SPR 共振波长(具有最小反射率的波长), 并把这个点的波长变换为该点的颜色来成像。这种方法所成像颜色近似与折射率成线性, 能够定量地分析折射率的分布。但是, 一点点扫描测量的速度慢, 不能适应微阵列技术高通量测量的要求。

基于现有 SPR 二维探测方法的不足, 便提出了一种“并行扫描光谱 SPR 成像方法”^[12], 利用这种方法, 可以高通量地定量探测被测量面的二维折射率分布信息, 并得到灰度值与折射率线性对应的二维图像。本文将完善此方法的数据处理过程, 并使用该方法检测一个手工点制的低密度 DNA 探针微阵列, 以检验该方法检测微阵列的可行性。

1 实验装置与方法

1.1 实验系统

并行扫描光谱 SPR 成像方法的装置示意图如图 1 所示。白光点光源(A)发出的光, 经过一个消色差的成像透镜(B)变成平行光, 通过一个消光比为 1/500 的偏振片(C), 再经过一个柱面凸透镜(D), 使其在水平方向会聚。这样光照到 SPR 装置(E)时, 近似形成了一个线形光斑。SPR 装置(E)采用 Kretschmann 全反射模型^[1]: BK7 玻璃的直角等腰棱镜(E1)的斜面上镀了 40 nm 厚的金膜(E2), 金膜外的被测平面上点有 DNA 探针阵列(E3)。整个 SPR 装置(E)可以沿着如图所示与其斜面平行的方向一维移动。线形光斑会聚在金膜上, 中心光束的入射角约为 44.2° 。反射光进入一台光栅

光谱仪(F)的入射狭缝。入射狭缝宽度 $10 \mu\text{m}$, 距离线形光斑 10 cm, 从 SPR 反射光中挑选出反射角在一个很小范围内 ($44.2^\circ \pm 0.003^\circ$) 的反射光进入光谱仪。光线在光谱仪中分光, 成像在光谱仪出口的 CCD(G)上。计算机(H)控制 CCD 采集得到动态范围 12 bit, 大小 1392×1040 像素的图像。

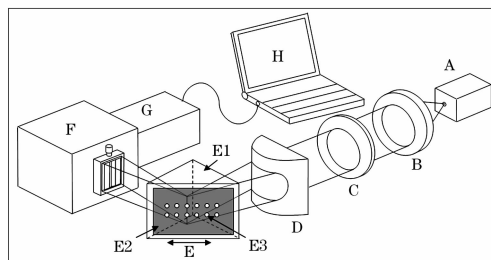


Fig. 1 Schematic of parallel scan spectral SPR imaging system

A: White light point source; B: Achromatic convex lens; C: Polarizer; D: Cylindrical convex lens; E: Kretschmann type SPR module; E1: BK7 prism; E2: Gold film; E3: DNA probes; F: Grating spectrometer, G: CCD, H: PC

1.2 实验方法

为了消除光源、光谱仪、CCD 及装置中的其他元件对光谱造成的影响, 应首先调整偏振片 C, 使其透光方向分别为 p 光(偏振方向平行于反射面)和 s 光(偏振方向垂直于反射面), 使用 CCD 分别拍摄一幅图像, 把 p 光下得到图像的每一像素灰度值与 s 光下得到图像的对应像素灰度值相除, 所得值作为一个新像素的灰度值, 这样的新像素就组成了一幅新的图像。在消除光栅对 s 光和 p 光响应的差别后, 新图像的每一行都是被测量上线形光斑照明的一维区域中一个点的 SPR 光谱 $|R_p^2/R_s^2|$, 其中 R_p 和 R_s 分别是 p 光和 s 光的反射率。图 2(a)就是当线形光斑穿过金膜上的 2 个 DNA 探针时

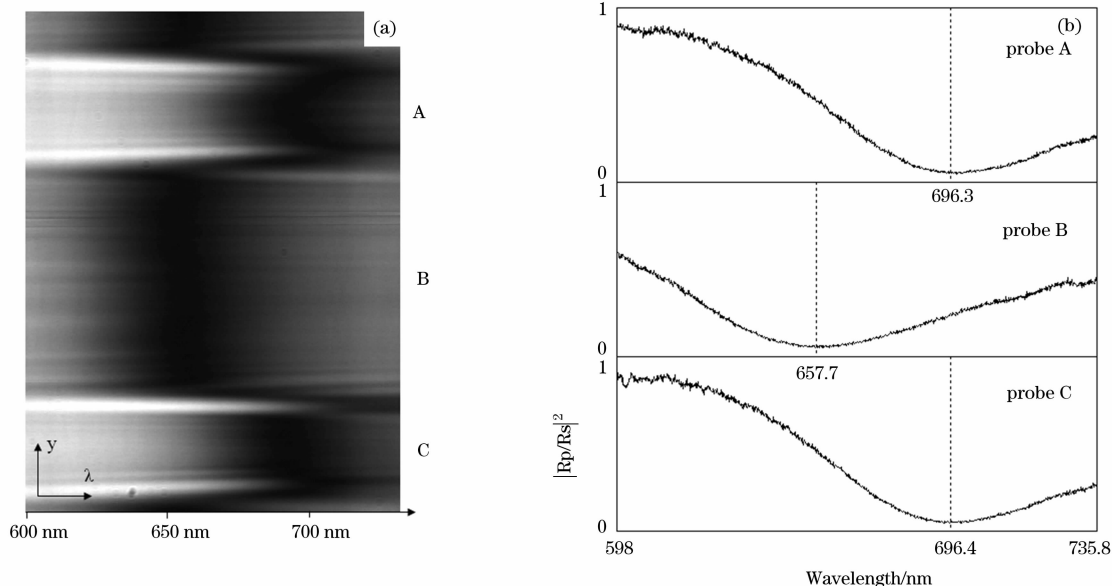


Fig. 2 (a): A typical image after canceling the spectral response of the system. Each row represents the SPR spectrum $|R_p^2/R_s^2|$ of one point in the sensing plane. Area A and C represent the DNA probes on the gold film. Area B represent the bare gold film (air). (b): three rows from area A, B, C in a, respectively

经过上述过程消除系统光谱响应后得到的图像,其中 A 和 C 区域为探针部分, B 区域为空白金膜(空气)部分。图 2(b)是从图 2(a)中的 A, B, C 区域分别取出的一行,可以看出,探针部分和空气部分相比, SPR 共振波长移动了 38.6 和 38.7 nm。通过下一部分将要讨论的数据处理方法,可以从这个 SPR 光谱的移动,得出探针的等效折射率。这样每一行都可以得到线形光斑照明区域的一点的折射率,从整幅图就可以得到整个一维区域的折射率分布。

如上讨论,一幅 CCD 拍摄图像在去除系统光谱响应后包含了被线形光斑照明的一系列点的折射率信息。把 SPR 装置(E)沿着如图 1 所示方向与其斜面平行地一维移动,使线形光斑扫描被测平面,同时使用 CCD 连续拍摄 p 偏振光下的图像。为了提高检测速度,我们没有每幅 p 光图像都拍摄一副 s 光图像,而是在扫描开始前先拍摄一副 s 光图像,然后把扫描拍摄得到的所有 p 光图像与其相除并去掉光栅对偏振的响应差别后,得到了一系列新的图像。这些图像每一幅同图 2(a)一样包含了被测面一系列点的折射率信息,所有图片就包含了整个被测面扫描区域的二维折射率信息。我们计算出每一点的折射率,然后根据平面整体的折射率起伏大小,给该点的折射率赋予一个与之线性对应的灰度值。这样就得到了被测面的定量的折射率分布图。由于使用线形光束,一维扫描实现二维测量,整个测量的速度很快,测量一块 $8\text{ mm} \times 8\text{ mm}$ 大小的样品,过程小于 1 min。

1.3 数据处理

数据处理的目的是由 SPR 共振波长计算出对应的等效折射率。理论公式采用基于多层膜体系的菲涅尔公式^[13]。在角度固定时,反射率最小值所对应的波长随着折射率改变而改变,称之为 SPR 共振波长。SPR 共振波长的不同位置对应着不同折射率,因此可以由实验得到的 SPR 共振波长计算出折射率。

在计算中需要处理两个问题。

(1)系统的入射角并不是完全固定的,由于可使用距离线形光斑 10 cm 处的宽 $10\ \mu\text{m}$ 的入射狭缝来选择光线,因此角度存在一个 $\pm 0.003^\circ$ 的范围。对于这点,可以把这个范围内各个角度的 SPR 曲线进行积分(假设各个角度权重相同),来代替原来的单一角度曲线。事实上,由于这个范围的对称性,积分后的曲线与之前单一曲线几乎是相同的,至少在该系统的光谱分辨极限下是相同的。

(2)完全并不能足够精确地测量入射角。入射角有很小的改变(如 0.01°),反射率对波长的曲线都会有较可观的改变,SPR 共振波长与折射率的关系也会不同,而这一精度是直接测量角度所无法达到的。为解决这一问题,便采取了用空气折射率作标定的方法。首先根据在角度 $\pm 0.003^\circ$ 的范围积分后的理论公式计算出各个角度(中心角度)下折射率和 SPR 共振波长的关系。然后根据文献^[14]使用实验时的温度湿度等参数得到空气的折射率为 1.00026 RIU(refractive index unit)。把空气折射率和实验中得到的空气 SPR 共振波长[如图 2(b)中的 657.7 nm]一同代入计算好的不同角度下 SPR 波长与折射率的关系之中,就能够确定实际的入射角为 44.180° 。入射角确定了,SPR 波长与折射率的关系也就确定

了,由此就可以把图 2(a)中探针的 SPR 波长 696.3 和 696.4 nm 转变为折射率 1.008 63 和 1.008 65 RIU。

这样可使用与角度等参数无关的等效折射率来表征探针在金膜上的结合程度,与 Yuk 等^[11]使用与角度有关的 SPR 共振波长相比,具有更好的客观性,更适合对微阵列的检测。

2 结果与讨论

为了验证本方法的实用性,使用了本方法对一个手工配制的低密度军团菌 mip DNA 特异性探针阵列进行了探测。其制作过程如下:首先用 Piranha 溶液(30% H_2O_2 与浓 H_2SO_4 体积比 1:3 混合)浸泡镀金膜的 BK7 玻璃片 6 h,然后使用去离子水清洗镀膜的玻璃片并吹干。人工把巯基修饰的军团菌 mip DNA 探针点到金膜上,布置出 2×6 、每点 $1\ \mu\text{L}$ 的阵列,每行的 6 个探针浓度从左到右分别是 0.65, 1.25, 2.5, 5, 10, $20\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,上下两行探针浓度排布相同。把点样后的镀金玻璃片放在湿盒中,放置在 $37.5\ ^\circ\text{C}$ 下 24 h 后,取出用去离子水清洗、吹干。

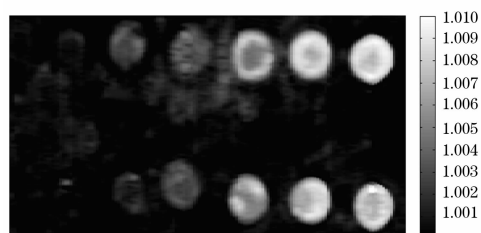


Fig. 3 Refractive index 2-D distribution map of DNA probe arrays

Two rows have the same probe distribution. The probe concentrations in each row are 0.65, 1.25, 2.5, 5, 10, $20\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ from left to right, respectively

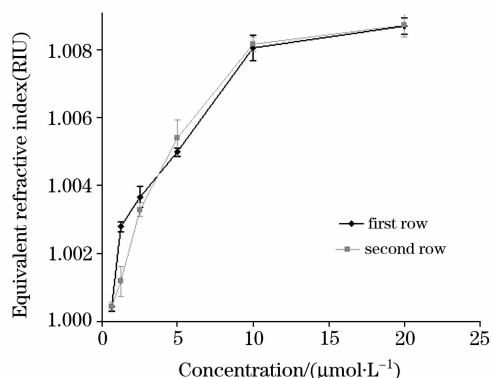


Fig. 4 Equivalent refractive indices of DNA probes versus probe concentrations

Two curves come from two rows of DNA probes, respectively. The mean value and uncertainty are calculated from 5×5 pixels in the centre of a DNA probe

把制备好探针的镀金玻璃片用折射率匹配油粘附在 BK7 棱镜斜面上,放置在图 1 所示系统中,使用线形光斑扫

描点样区域,同时使用 CCD 探测。按照前面所述的方法,最终得到被测面的定量折射率二维分布图如图 3。可以看出,除了浓度最小的两个探针不是很清晰外,浓度较大的 4 个探针均能很清晰地看出轮廓。取每个探针部分中心区域的 5×5 个像素计算出该浓度探针的等效折射率的平均值和不确定度,得到如图 4 的探针等效折射率关于探针浓度的曲线。其中,两行相同浓度排布的探针分别得到两条曲线。由于手工点样清洗不稳定的原因,导致片上相同浓度的 2 个探针的相对折射率并不完全一样。但是,从图 4 可以看出,除了 $1.25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度时折射率差别较大,两条曲线基本吻合。此外还能从图 4 曲线得出探针与金膜结合的一些性质:浓度较小时,结合的探针分子数目(等效折射率所代表)随着浓度迅速增大,浓度较大时这一增加变缓,直至后来趋近饱和。

3 总 结

本文完善了作者之前提出的全新的高通量折射率二维探

测方法——并行扫描光谱 SPR 成像方法——的数据处理方案,与前人的工作相比^[11],本文采用等效折射率这一参数表征生物探针的结合程度,具有更好的客观性和可比性。

本文首次使用并行扫描光谱 SPR 成像方法对手工点制的低密度军团菌 mip DNA 特异性探针阵列进行了探测,证明了这种新方法用于微阵列技术检测的可行性。相信凭借这种新方法的高通量、高灵敏、无标记、定量检测的特点^[12],其在微阵列技术中的应用将有着光明的前景。

此外,实验中得到的同体积探针的浓度和结合后的等效折射率的关系曲线,对今后使用本方法或其他 SPR 方法研究 DNA 探针结合具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- [1] Homola J, Yee S S, Gauglitz G. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1999, 54 (1-2): 3.
- [2] Homola J. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2003, 377(3): 528.
- [3] LÜ Shao-wu, JIN Wei, ZHANG Ying, et al(吕绍武,金伟,张莹,等). *Chinese Journal of Analytical Chemistry(分析化学)*, 2008, 36(2): 211.
- [4] LIU Zhi-gang, HUANG Hai-zhen, YUAN Ping(刘志刚,黄海珍,袁萍). *Spectroscopy and Spectral Analysis(光谱学与光谱分析)*, 2009, 29(2): 293.
- [5] LIU Xia, SUN Ying, SONG Da-qian, et al(刘霞,孙颖,宋大千,等). *Acta Chimica Sinica(化学学报)*, 2007, 65(22): 2544.
- [6] GUO Wen-ting, LI Xiu-li, WEI Tian-xin(郭文婷,李秀丽,韦天新). *Progress in Chemistry(化学进展)*, 2008, 20(1): 155.
- [7] Rothenhausler B, Knoll W. *Nature*, 1988, 332: 615.
- [8] LIU Wei, CHEN Yi(刘巍,陈义). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2008, 29(9): 1744.
- [9] SHEN Gang-yi, HAN Zhi-qiang, LIU Wei, et al(申刚义,韩志强,刘巍,等). *Chemical Journal of Chinese Universities(高等学校化学学报)*, 2007, 28(9): 1651.
- [10] O'Brien M J, II, Perez-Luna V H, Brueck S R J, et al. *Biosensor and Bioelectronics*, 2001, 16: 97.
- [11] Yuk J S, Yi S J, Lee H G, et al. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2003, 94: 161.
- [12] Liu Le, He Yonghong, Zhang Ying, et al. *Applied Optics*, 2008, 47(30): 5616.
- [13] Raether H. *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings*. Springer, 1988.
- [14] Refractive Index of Air Calculator Based on Ciddor Equation on NIST Website. <http://emtoolbox.nist.gov/Wavelength/Ciddor.asp>.

A Novel Spectral Surface Plasmon Resonance 2-D Sensing Technique and Its Applications in DNA Microarrays

LIU Le¹, HE Yong-hong^{1*}, MA Sui-hua¹, LU Wei-ping², ZHAO Xin³, ZHANG Ya-ou³, GUO Ji-hua¹

1. Laboratory of Optical Imaging and Sensing, Graduate School in Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China

2. Diagnostic Division, Daping Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China

3. Life Science Division, Graduate School in Shenzhen, Tsinghua University, Shenzhen 518055, China

Abstract The authors have previously proposed a novel refractive index two-dimensional sensing technique named “parallel scan spectral surface plasmon resonance imaging”. In the technique, with a line-shaped light illumination, an image acquired with CCD detector could provide both SPR wavelength information and one-dimensional spatial distribution, and then provide one-dimensional distribution of refractive index with further calculation. Thus, two-dimensional distribution of refractive index of the entire sensing area can be obtained with one-dimensional optical line parallel scan. The technique offers advantages of both high sensitivity and high throughput, and could have potential applications in microarray analysis. In the present paper, the authors improve the data processing methods of the technique. The authors use the refractive index of air as a reference to get over the problem of precision of the incident angle. The authors also sense a manually dotted *Legionella pneumophila* mip DNA probe array with this technique and prove the feasibility of sensing microarrays by this highly sensitive and label-free technique. The relation between the equivalent refractive indices and the concentrations of the dotted *Legionella pneumophila* mip DNA probes is obtained, which has important reference value for further study.

Keywords SPR; Spectral; Imaging; Microarray; Biochip

(Received Dec. 6, 2008; accepted Mar. 8, 2009)

* Corresponding author