

- lureas or insulin compared with conventional treatment and risk of complications in patients with type 2 diabetes (UKPDS 33). UK Prospective Diabetes Study (UKPDS) Group [J]. Lancet, 1998, 352(9131): 837-853.
- [16] 陈浩, 田恒力, 戎伯英, 等. 脑外伤急性期空腹血糖、血清糖化清蛋白和乳酸脱氢酶联合检测的意义[J]. 上海交通大学学报: 医学版, 2007, 27(12): 1478-1480.
- [17] 中华医学会糖尿病学分会. 中国血糖监测临床应用指南(2011年版)[J]. 中国医学前沿杂志: 电子版, 2011, 3(4): 62-72.
- [18] Ma XJ, Pan JM, Bao YQ, et al. Combined assessment of glycosylated albumin and fasting plasma glucose improves the detection of diabetes in Chinese subjects[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(10): 974-979.
- [19] Kim C, Bullard KM, Herman WH, et al. Association between Iron deficiency and A1C Levels among adults without diabetes in the National Health and Nutrition Examination Survey, 1999-2006 [J]. Diabetes Care, 2010, 33(4): 780-785.
- [20] Koga M, Saito H, Mukai M, et al. Influence of Iron metabolism indices on glycosylated haemoglobin but not glycosylated albumin levels in premenopausal women[J]. Acta Diabetol, 2010, 47(Suppl 1): 65-69.
- [21] Gram-Hansen P, Eriksen J, Mourits-Andersen T, et al. Glycosylated haemoglobin (HbA1c) in iron- and vitamin B12 deficiency [J]. J Intern Med, 1990, 227(2): 133-136.
- [22] Koga M, Hashimoto K, Murai J, et al. Usefulness of glycosylated albumin as an indicator of glycemic control status in patients with hemolytic anemia[J]. Clin Chim Acta, 2011, 412(3-4): 253-257.
- [23] Saudek CD, Herman WH, Sacks DB, et al. A new look at screening and diagnosing diabetes mellitus[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2008, 93(7): 2447-2453.
- [24] 梁国威, 贾玫, 徐旭, 等. 糖化清蛋白在甲状腺功能紊乱患者中的水平变化及其影响因素[J]. 中国实验诊断学, 2010, 14(1): 95-98.
- [25] 黄田海, 毛雁飞, 马兰花. 糖化清蛋白检测临床意义研究进展[J]. 国际检验医学杂志, 2012, 33(18): 2226-2229.
- [26] Koga M, Matsumoto S, Saito H, et al. Body mass index negatively influences glycosylated albumin, but not glycosylated hemoglobin, in diabetic patients[J]. Endocr J, 2006, 53: 387-391.
- [27] 李青, 吴松华, 潘洁敏, 等. 住院糖尿病患者的糖化血清清蛋白水平及其影响因素[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(42): 2994-2996.

(收稿日期: 2012-10-09)

• 综 述 •

## 表面等离子共振生物传感技术及其在临床实验诊断中的应用

林钟劝 综述, 张 波 审校

(第三军医大学西南医院全军检验医学专科中心, 重庆 400038)

**关键词:** 生物传感技术; 表面等离子共振; 实验室技术和方法; 综述**DOI:** 10.3969/j.issn.1673-4130.2013.05.031**文献标识码:** A**文章编号:** 1673-4130(2013)05-0585-03

表面等离子体共振 (Surface Plasmon Resonance, SPR) 是指由电磁波在金属和电介质交界面上激励而形成的影响电磁波传播的谐振波的现象。即光以大于全反射角角度入射到交界面时, 一部分光被反射, 另一部分光被耦合进表面等离子体内, 在表面等离子体中存在光的消失场。当入射光的波矢量沿平行界面的分量和表面等离子体的波矢量相等时, 表面等离子体在光的消失场中发生谐振, 光波在传输过程中发生能量损失, 宏观上表现为某些光谱被强烈吸收, 该现象被称为等离子体共振<sup>[1]</sup>。1900年, Wood发现了光波通过光栅后光频谱发生了小区域损失, 并首次对表面等离子体波进行了描述。1968年, Kretschmann建立了用可见光激发表面等离子体的方法, 并发表了具有里程碑性质的文章。激发了人们将 SPR 应用于传感机制的热情, 同时 Kretschmann 结构也为 SPR 型传感器奠定了硬件基础。

表面等离子体波对介质折射率的微小变化非常敏感, 如果被测样品与发生表面等离子体共振的金属薄膜接触, 由于出现吸附或化学反应, 导致薄膜的介电常数发生变化。因此, 该特性适合应用于生物传感。1983年, Liedberg等<sup>[2]</sup>把 SPR 技术应用于抗原抗体相互反应的测定。1990年, 瑞典 Pharmacia 公司开发出世界上首台商业化 SPR 传感器——BIAcore<sup>[3]</sup>。由于 SPR 传感器具有不需标记, 检测准确性高, 响应速度快, 体积小, 抗干扰能力强以及实时在线检测等优点, 近 20 年来发展迅速, 具有代表性的 SPR 传感器产品有瑞典 BIAcore 公司的 BI-

Acore 系列、美国 Texas Instrument 公司的 SPREETA 系列和荷兰 Windsor Scientific Limited 公司的 IBIS 系列以及国内北京赛德创公司的 UMPHOTM 系列<sup>[4]</sup>。SPR 生物传感器现已广泛应用于生命科学研究、化学、食品安全与环境监测等诸多领域。

### 1 表面等离子共振生物传感器的工作原理

SPR 生物传感器是基于在某些金属 (特别是金、银) 界面上, 光能够激发产生表面等离子体波这一原理而研制的应用技术。当入射光以大于临界角的角度入射到金属界面上, 发生全反射。如在合适的角度下, 入射光的平行矢量与表面等离子体波的频率相匹配时, 发生等离子共振, 能量从入射光转移到表面等离子体波中, 反射光的反射率会表现出急剧衰减, 当反射光强度衰减到最低时, 此时入射光的入射角称为“谐振角”。发生谐振时的入射角高度依赖于金属界面的折射率, 而金属界面上生物分子的结合或生物反应会改变此处金属界面的折射率, 从而引起谐振角的相应改变。通过监测谐振角的变化, 可以实现对金属表面生物分子的结合与分离状态的监测, 实时检测生物分子之间相互作用的特异性信号<sup>[5]</sup>。基于这一原理, SPR 生物传感技术能够对分子间的相互作用实现无标记、实时动态和快速检测。

### 2 表面等离子共振生物传感器的分类

根据光耦合方式的不同, SPR 传感器在结构上可分为: (1) 棱镜耦合式 SPR 传感器。棱镜耦合具有结构简单、易于实

现且灵敏度高等特点,使用较为广泛。大多数采用 Kretschmann 结构。制作棱镜耦合 SPR 传感器时,首先在棱镜底部制备一层厚度约为 50 nm 的金属膜(一般采用 Au 或 Ag)和具有选择性的敏感膜(膜上固定有与待测分子相对应的探针分子)。并将其置于样品池的上方。入射光在棱镜底部发生衰减全反射,激发表面等离子体波。通过对反射光的检测,便可得到共振角或共振波长,从而实现对待测样品的检测;(2)集成光波导耦合式 SPR 传感器,工作原理与棱镜耦合方式的 Kretschmann 结构很相似。波导中传播的光波经过表面覆盖着金属膜层的区域时,在金属层界面发生全反射。如果表面等离子体波的相位与光波导模式的相位一致,则会激发表面等离子体波。此时在波导的输出端可以检测到 SPR 峰值曲线。该模式具有光路人为可控、易于小型化及良好的稳定性等突出优点。因此,具有一定的研究价值;(3)光纤式 SPR 传感器,采用光纤作为光的传输媒质。由于光纤的特殊性,因此这种传感器具有其他结构传感器所没有的特点:它可以很方便地探测一些人类难以进入或者有害的地方;可以通过光纤对敏感信号的传输,实现远程检测和分布式检测,而且也可以达到较高的灵敏度;(4)光栅耦合式 SPR 传感器,在这种结构中,金属层与介质层构成周期性变化的光栅曲面。当入射光照射到光栅表面时便会发生衍射。不同的衍射角对应不同的衍射阶。当某一阶衍射光的波矢在界面方向的分量与表面等离子体波的波矢相等时,二者发生共振,产生 SPR 现象。

### 3 表面等离子共振生物传感器的构造

表面等离子共振生物传感器一般由动力系统、进样系统、检测系统和软件分析系统等 4 部分组成。动力系统为流动相在流路中流动提供动力,使样品流经金属检测芯片表面。动力源一般有蠕动泵、恒压注射器等。进样系统的主要功能是将样品注入到检测池中。进样时,在动力源的动力推动下,样品首先经过管路进入进样阀,然后由进样阀注入到检测池中。检测系统主要由一些光学检测部件组成。一般包括光源、横磁波偏振器、棱镜、检测芯片和信号检测转换器 5 部分。光源发出的光,经横磁波偏振器后产生的偏振光照射到金膜上产生反射,反射光信号由面阵电荷耦合器件接收并进行电信号转换(图 1)<sup>[4]</sup>。软件分析系统是将检测系统收集到的电信号进行整理,形成直观的检测曲线图。最后通过配套的分析软件对曲线图进行自动分析,从而计算出不同样品的结合和解离常数及样品质量等参数。

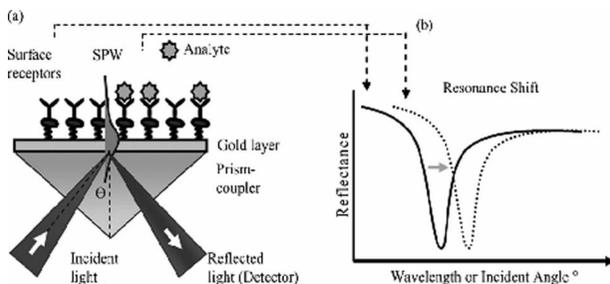


图 1 SPR 生物传感器检测光路示意图

### 4 表面等离子共振生物传感器的主要特点

表面等离子共振生物传感器在检测生物分子间相互作用方面与传统检测方法相比主要有以下几方面的优势:(1)实时检测,生物分子相互作用的全过程都能以曲线图的形式被记录下来,所以能动态地监测生物分子间相互作用的全过程。(2)待测物无需标记荧光染色剂、放射性同位素等标记物,至始至

终保持着结构的完整性以及生物天然活性。(3)应用范围广泛。不仅可用于抗原抗体之间的相互特异性反应检测,而且各种脂类、多糖、生物膜上的信号分子以及许多生物大分子之间的相互作用都能用此方法进行检测。(4)检测过程避免了对分析物进行复杂的预处理,检测方便快捷。检测灵敏度高,检测限达皮克级,可以同放射性元素标记技术相媲美。

### 5 表面等离子共振生物传感器在实验诊断方面的应用

#### 5.1 微生物检测

目前,大多数微生物检测仍然采用生物学或生物化学手段。但根据近年的文献报道,SPR 技术在这一领域的应用已获得较大进展。Zhang 等<sup>[6]</sup>使用 BIAcore AB 检测沙门氏菌。他们先采用 PCR 法扩增沙门氏菌的 *invA* 基因,针对该基因设计探针并将其巯基化到金膜表面,最后以杂交的方式检测 *invA* 基因。这种方法的灵敏度极高,能检测到沙门氏菌的最低浓度为  $1 \times 10^2$  CFU/mL。王珏等<sup>[7]</sup>则利用相似的方法使用四通道的 UMPHOTMA450 同时检测金黄色葡萄球菌、铜绿假单胞菌和痢疾志贺菌。检测限为  $4 \times 10^2$  CFU/mL。Mazumdar 等<sup>[8]</sup>利用 sandwich 抗体夹心法对沙门氏菌进行血清型分型。结果成功地区分出 B、C 和 D 型。与传统的玻片凝聚法相比,该方法不仅能够定量,而且更加方便可靠。Jyoung 等<sup>[9]</sup>报道了霍乱弧菌 O1 的 SPR 检测方法。他们先在传感器芯片表面自组装了巯基烷烃,再将蛋白 G 偶联在巯基烷烃表面,最后注入霍乱弧菌 O1 的单克隆抗体使之与蛋白 G 结合。检测限可达  $4 \times 10$  CFU/mL。Mendes 等<sup>[10]</sup>利用棱镜耦合式 SPR 传感器检测出了大豆锈病菌抗原,检测限为 800 ng/mL。并将 SPR 法与传统的 ELISA 检测法进行了比较,虽然 ELISA 法灵敏度更高,检测限为 63 ng/mL,但 SPR 法更为便捷,高效。Taylor 等<sup>[11]</sup>应用多通道的波长检测型 SPR 传感器,检测了 PH 值为 7.4 的苹果汁中的大肠杆菌 *E. coli* O157:H7,检测限为  $1.4 \times 10^4$  CFU/mL。Park 等<sup>[12]</sup>将 SARS 病毒表面抗原 SCVme、荧光物质 EGEP 和 GBP 结合成复合物,利用 GBP 对金属的高亲和力将该复合物结合到 BIAcore3000 芯片表面。然后检测不同浓度的抗 SCVme 抗体。结果当抗 SCVme 抗体浓度从 0.1~100  $\mu$ g/mL 递增时,SPR 仪的信号强度对应为 11.3~905 RU。该方法有很好的特异性和灵敏度。Kang 等<sup>[13]</sup>利用 BIAcore2000 检测了隐孢子虫卵囊,检测限为 106 卵囊/毫升。

#### 5.2 免疫生化物质检测

Zhang 等<sup>[14]</sup>使用 BIAcore3000 研究黏多糖 GAGs 与白介素 IL-7 之间的结合解离关系。他们将不同类型的 GAGs 以胺基键固定在芯片表面,然后注入 IL-7,从而得出二者的结合曲线。研究结果表明,人类 IL-7 比小鼠 IL-7 更易与 GAGs 结合。同时指出,高浓度的硫酸盐有助于二者的结合。Vachali 等<sup>[15]</sup>采用 FastStep<sup>TM</sup> 研究人类胡萝卜素 Carotenoid 与蛋白质 HSA、LG、StARD1、StARD3 和 GSTP1 等之间的相互作用关系。由于 FastStep<sup>TM</sup> 有连续变换样品浓度的设计优势,与传统的 SPR 仪相比,检测更加省时高效。研究表明,Carotenoid 与 GSTP1 结合最为紧密和特异。Dutra 等<sup>[16]</sup>利用 SPR 技术检测了人血清肌钙蛋白 TnT,检测的下限值为 0.01 ng/mL。Liu 等<sup>[17]</sup>报道了利用 SPR 仪检测人血清清蛋白的方法。他们先将人血清清蛋白特异性结合物 Cibacron Blue F3GA 结合在铬金属芯片上,然后检测不同浓度的人血清清蛋白样品。结果显示,能检测到的人血清清蛋白最低浓度为 4  $\mu$ g/mL。Jin 等<sup>[18]</sup>则采用抑制配位测定法直接从尿液标本中检测 3-硝基酪氨酸。该方法的特异性、重复性和芯片的可再生性都比较好。有望成为临床检测 3-硝基酪氨酸的低成

本工具。Chung 等<sup>[19]</sup>利用 SPR 技术检测肿瘤标记物 CA19-9。他们先在芯片表面结合上抗 CA19-9 抗体,然后对不同浓度的 CA19-9 样品进行检测,检测下限为 410.9 U/mL。为了提高检测的灵敏性,他们继续采用 sandwich 法,注入 CA19-9 的另一种抗体,增大信号强度。结果检测的下限值下降到 66.7 U/mL。这距离 CA19-9 的临床诊断值 37 U/mL 已经相当接近。Fang 等<sup>[20]</sup>报道了利用 SPR 仪检测胃癌肿瘤抗原 MG7-Ag 的方法。他们利用抗原抗体反应法先后对胃癌患者和健康人的血液进行检测,二者的传感器曲线图显示胃癌患者的信号强度明显强于健康人,虽然正常人血中亦有少量 MG7-Ag 表达。Yakes 等<sup>[21]</sup>利用 BIAcoreT100 检测了贝壳毒素。他们先将 0、1、4 和 400 ng/mL 的贝壳毒素 STX 结合在芯片表面,然后注入足够量 anti-STX 并使之充分反应。经扫描得出一张曲线图,以此可检测未知浓度的 STX。极大地方便了对贝壳毒素超标的海产品的检测。Gregory 等<sup>[22]</sup>在 BIAcore3000 的芯片表面镶上类似 HIV 外膜的脂类分子结构,进而研究 4E10、A32、2F5、13H11、1S4、IS1 和 P1 等 7 种抗 HIV-1 抗体与病毒外膜的亲和性。结果 4E10 亲和性最强。这表明 4E10 最有可能用于艾滋病病毒疫苗的制备。

## 6 展 望

SPR 传感技术因其独特的技术优势,在近 20 年来得到了快速发展。目前国际上已经出现了多种仪器化的相关产品。并将其应用于生物医学研究。SPR 传感器还可以和原子力显微镜等<sup>[23]</sup>其他高新仪器联合使用,以应用于更加广泛的研究领域。另外,Huang 等<sup>[24]</sup>另辟蹊径,他们成功实现了在芯片表面进行 DNA 滚环扩增复制从而提高检测灵敏度的新方法。为 SPR 生物传感器的使用提供了新思路。今后,SPR 生物传感器将朝着小型化、低成本、高灵敏性的方向发展<sup>[25]</sup>。在实验诊断方面,SPR 传感技术已成为很受关注的一项光电检测技术。目前国内已有厂家开始生产专门用于 HPV 的检测和分型的 SPR 仪。随着 SPR 技术理论和实践工作的不断深入和发展,相信未来 SPR 技术将在临床实验诊断方面占有一席之地。

## 参考文献

- [1] Arima Y, Toda M, Iwata H. Surface plasmon resonance in monitoring of complement activation on biomaterials[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2011, 63(12): 988-999.
- [2] Liedberg B, Nylander C, Lunström I. Surface plasmon resonance for gas detection and biosensing[J]. *Sens & Actu*, 1983, 4: 299-304.
- [3] Jönsson U, Fägerstam L, Ivarsson B, et al. Real-time biospecific interaction analysis using surface plasmon resonance and a sensor chip technology[J]. *Biotechniques*, 1991, 11(5): 620-627.
- [4] Weng X, Zheng XL, Yang J. Surface plasmon resonance biosensor technology and its application in biomedicine[J]. *Zhongguo Yi Liao Qi Xie Za Zhi*, 2006, 30(5): 383-385.
- [5] Fan X, White IM, Shopova SI, et al. Sensitive optical biosensors for unlabeled targets; a review[J]. *Anal Chim Acta*, 2008, 620(1-2): 8-26.
- [6] Zhang D, Yan Y, Li Q, et al. Label-free and high-sensitive detection of Salmonella using a surface plasmon resonance DNA-based biosensor[J]. *Biotechnology*, 2012, 160(3-4): 123-128.
- [7] 王珏, 夏涵, 罗阳, 等. 表面等离子体共振生物传感器对病原菌快速检测研究[J]. *中华医院感染学杂志*, 2009, 19(14): 1779-1781.
- [8] Mazumdar SD, Barlen B, Kämpfer P, et al. Surface plasmon resonance (SPR) as a rapid tool for serotyping of Salmonella[J]. *Biosens Bioelectron*, 2010, 25(5): 967-971.
- [9] Jyoung JY, Hong S, Lee W, et al. Immunosensor for the detection of Vibrio cholerae O1 using surface plasmon resonance[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 21(12): 2315-2319.
- [10] Mendes RK, Carvalhal RF, Stach-Machado DR, et al. Surface plasmon resonance immunosensor for early diagnosis of Asian rust on soybean leaves[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, 24(8): 2483-2487.
- [11] Taylor AD, Ladd J, Yu Q, et al. Quantitative and simultaneous detection of four foodborne bacterial pathogens with a multi-channel SPR sensor[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, 22(5): 752-758.
- [12] Park TJ, Hyun MS, Lee HJ, et al. A self-assembled fusion protein-based surface plasmon resonance biosensor for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome[J]. *Talanta*, 2009, 79(2): 295-301.
- [13] Kang CD, Lee SW, Park TH, et al. Performance enhancement of real-time detection of protozoan parasite, Cryptosporidium oocyst by a modified surface plasmon resonance (SPR) biosensor[J]. *Enzyme Microb Technol*, 2006, 39(3): 387-390.
- [14] Zhang F, Liang X, Pu D, et al. Biophysical characterization of glycosaminoglycan-IL-7 interactions using SPR[J]. *Biochimie*, 2012, 94(1): 242-249.
- [15] Vachali P, Li B, Nelson K, et al. Surface plasmon resonance (SPR) studies on the interactions of carotenoids and their binding proteins[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2012, 519(1): 32-37.
- [16] Dutra RF, Kubota LT. An SPR immunosensor for human cardiac troponin T using specific binding avidin to biotin at carboxymethyl-dextran-modified Gold chip[J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 376(1-2): 114-120.
- [17] Liu JT, Lin PS, Hsin YM, et al. Surface plasmon resonance biosensor for microalbumin detection[J]. *J Taiwan Inst Chem Eng*, 2011, 42(5): 696-700.
- [18] Jing J, Wang CY, Yi T, et al. Determination of 3-nitrotyrosine in human urine samples by surface plasmon resonance immunoassay[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2011, 153(1): 164-169.
- [19] Chung JW, Bernhardt R, Pyun JC. Additive assay of Cancer marker CA 19-9 by SPR biosensor[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2006, 118(1): 28-32.
- [20] Fang X, Tie J, Xie Y, et al. Detection of gastric carcinoma-associated antigen MG7-Ag in human sera using surface plasmon resonance sensor[J]. *Cancer Epidemiol*, 2010, 34(5): 648-651.
- [21] Yakes BJ, Prezioso S, Haughey SA, et al. An improved immunoassay for detection of saxitoxin by surface plasmon resonance biosensors[J]. *Sens Actuators B Chem*, 2011, 156(2): 805-811.
- [22] Gregory JH, Yee L, Shelley MS, et al. Screening the interactions between HIV-1 neutralizing antibodies and model lipid surfaces[J]. *J Immunol Methods*, 2012, 376(1): 13-19.
- [23] Kumbhat S, Sharma K, Gehlot R, et al. Surface plasmon resonance based immunosensor for serological diagnosis of dengue virus infection[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2010, 52(2): 255-259.
- [24] Huang YY, Hsu HY, Huang CJ. A protein detection technique by using surface plasmon resonance (SPR) with rolling circle amplification (RCA) and nanogold-modified tags[J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 22(6): 980-985.
- [25] Hoa XD, Kirk AG, Tabrizian M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors; a review of recent progress[J]. *Biosens Bioelectron*, 2007, 23(2): 151-160.