

表面等离子体耦合荧光装置小型化改进与性能分析

谢堂堂¹ 刘晓庆¹ 蔡伟鹏¹ 曹烁晖¹ 刘倩¹ 林国春² 李耀群^{1*}

(1. 厦门大学化学化工学院化学系与现代分析科学重点实验室, 厦门 361005

2. 厦门大学物理机电学院电子科学系, 厦门 361005)

摘要 搭建了结构紧凑简单、性能稳定、成本低廉的表面等离子体耦合荧光(SPCE)小型装置。通过对罗丹明 S101 样品荧光信号角度分布和偏振性的测试,分析了该小型装置的仪器性能,结果令人满意。该装置完全能够满足 SPCE 一般的测试要求,可望推广使用。

关键词 表面等离子体耦合发射 小型装置 激光笔 罗丹明 S101 定向 P 偏振

Miniaturization of surface plasmon coupled emission spectrofluorimeter and its performance analysis Xie Tangtang¹, Liu Xiaoqing¹, Cai Weipeng¹, Cao Shuohui¹, Liu Qian¹, Lin Guochun², Li Yaoqun^{1*} (1. Department of Chemistry and Key Laboratory of Analytical Sciences, College of Chemistry and Chemical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Department of Electronic Science, College of Physics and Mechanical & Electrical Engineering Xiamen 361005, China.)

Abstract: A miniature spectrofluorimeter for surface plasmon coupled emission (SPCE) technique has been developed using a laser pointer as the light source. Here we investigate its performance by measuring SPCE from sulforhodamine 101 doped PVA. The fluorescence signal on the prism side emitted at a sharply directional angle of 47° and was definitely p-polarized with different wavelengths appearing at different angles. It is demonstrated that this laboratory-constructed spectrofluorimeter is able to meet the general test requirements of SPCE technique. Compared with the previously reported devices, our spectrofluorimeter has many advantages such as simple, stable performance and low cost.

Keywords: SPCE; miniaturization; laser pointer; sulforhodamine S101; directional; P-polarization

1 引言

表面等离子体耦合定向荧光法(Surface Plasmon Coupled Emission, SPCE)^[1-3]是利用在纳米金属表面 200 nm 内的激发态荧光团与纳米金属薄膜近场相互作用提高荧光信号收集效率的一种新型的荧光技术,具有高度的角度定向发射、唯一的荧光发射偏振、波长可分辨、有效的背景信号抑制等独特优点^[4,5],在生物传感、界面分析等研究领域

具有广阔的应用前景。

目前世界上还没有 SPCE 荧光系统的生产厂家,所用的仪器系统均为实验室自行组装。根据以往报道^[6,7],SPCE 光源多用各类价格昂贵的激光器,其操作要求严格,工作时发热量大,需要强制冷却,使用寿命较短且体积大,不利于仪器的小型化。近来^[8,9]有些研究采用新型发光二极管(Light Emitting Diodes, LEDs)作为 SPCE 的光源。虽然 LED 具有体积小、能耗低、价格便宜等优点,但由于

基金项目:国家自然科学基金(21127005,20975084)和教育部博士点基金(20110121110011)资助

作者简介:谢堂堂,男,1982 年出生,博士,主要从事分子发光分析研究。E-mail: tangtangxie@139.com

通讯作者:李耀群,女,1964 年出生,教授,博导,主要从事分子发光分析研究。E-mail: yqlig@xmu.edu.cn.

LED 为非相干光源,其亮度低、单色性差、响应速度低,并且其光束的发散角大,易造成较大的背景噪音。本实验将市售激光笔进行改装作为光源,自行研制了一种小型 SPCE 荧光系统,避免了以往 SPCE 系统体积大、功耗高、操作繁琐、不利于推广等缺点。测试结果表明,该系统结构紧凑简单、操作方便、性能稳定,完全能够满足 SPCE 一般测试要求。

2 实验部分

2.1 仪器装置

图 1 为本实验室自组装的小型 SPCE 装置光学结构示意图,计算机控制软件采用 C 语言编写,可控制光谱仪扫描,并读取信号绘制光谱图。整个光学系统可以分成四部分:激发光路、耦合器件部分、发射光路和检测器。

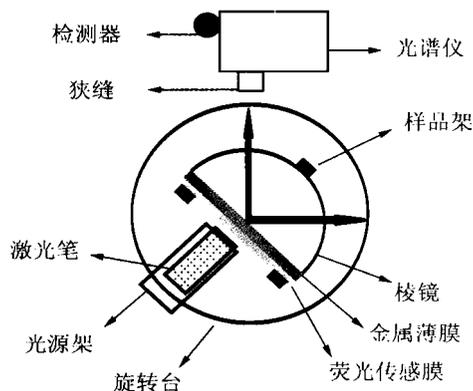


图 1 RK 模式下的 SPCE 小型装置示意图

实验中将市售激光笔的笔套锯开,外接直流稳压电源改装成小型激光二极管模块作为 SPCE 光源,通过自制小型光源架将其固定在可 360° 旋转的小负载的旋转台上,构成激发光路。光源作为荧光检测系统的关键部件,常常是该系统最昂贵的耗件之一,常规实验室不可能配置齐全各种昂贵的激光器。然而,市售激光笔的输出波长几乎覆盖了可见光至红外光的各个波段,近紫外的激光笔也已投入市场,且价格相对便宜很多,故可以方便地选择合适的激光笔以适应不同波段的荧光探针,更好地满足荧光检测的不同要求。

依附于纳米级光滑金属薄膜的荧光传感膜通过光学常数匹配的溶液(如甘油)粘附在半圆柱形棱镜上,通过自制样品架固定在旋转台上,由于激发光路

可以随旋转台实现 360° 旋转,荧光传感膜不同角度定向发射的荧光信号就可以以一定角度选择性地通过单色仪进入检测器,实现 SPCE 信号的收集,通过旋转台读数可测知定向发射角。与现有 SPCE 仪器装置相比,该装置具有结构紧凑,便于微型化的特点。

2.2 实验方法

采用磁控溅射法,在 20 mm×20 mm 的石英载波片上依次溅射上 2 nm Cr 和 45 nm Ag,制得银纳米薄膜。实验采用 PVA 溶液旋转涂布成膜方式控制样品膜厚度在金属近场作用范围内。用 1% (质量分数) PVA 水溶液配制 1 mmol/L 罗丹明 S101 染料溶液,并取 50 μL 匀胶,匀胶机参数设置为 3000 r/min 及 30 s。在 Reverse Kretschmann (RK) 模式下,使用本 SPCE 小型装置考察了样品的 SPCE 信号。

3 结果与讨论

3.1 光源性能的考察

实验选择 532 nm 的绿色激光笔作为罗丹明 S101 的激发光源,其光谱特征如图 2 所示。激光笔的 FWHM 约为 6 nm,单色性程度相当于宽谱带连

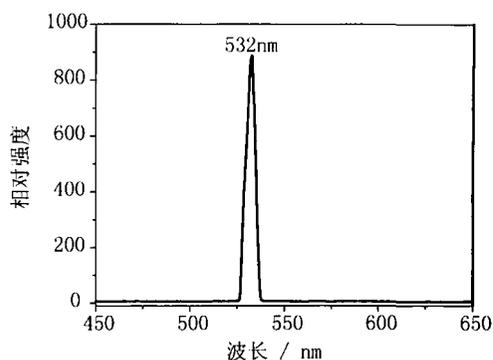


图 2 激光笔光源的光谱图

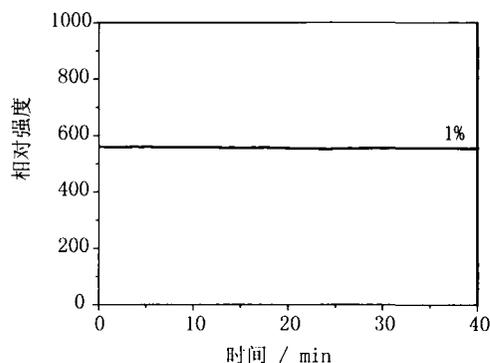


图 3 激光笔随时间变化输出功率的稳定性

光源通过干涉滤光片所达到的效果。作为荧光激发光源,其光源输出功率的稳定性至关重要,故我们预热光源 1 h 后,考察了输入电压为 2.5 V 时,激光笔输出功率的稳定性。如图 3 所示,光源持续照射时间 40 min,峰值变化量不超过 1%,表明激光笔的输出功率稳定。

市售激光笔结构简单、体积小(仅为 50 mm × Φ13 mm),具有输出功率稳定、单色性强、聚光效率高(光斑的直径约为 1 mm)及平行性好等诸多优点,便宜易购,非常适于微型化的荧光检测系统,可以作为 SPCE 的理想光源。

3.2 小型 SPCE 装置的检测性能分析

为考察搭建的 SPCE 装置用于荧光检测的实用性,将 1 mmol/L 罗丹明 S101 的 PVA 溶液采用旋涂法涂布在 45 nm 的银膜上,其厚度为 30 nm,以该样品膜为标样考察了其在银膜上的荧光信号角度分布和偏振性。

图 4 为 S101-PVA 样品膜的荧光强度随检测角度变化的极坐标示意图。在金属膜后端(Back side, B)得到的荧光发射信号,即为表面等离子体耦合定向荧光;而在金属膜前端(Front side, F)得到的荧光信号,即自由空间发射荧光(Free Space, FS)。由图 4 可知,SPCE 信号显著分布在检测角度为 ±47° 处,即在检测角度等于一固定值(47°)时所发射的荧光信号最强。Winspill 3.01 软件广泛应用于模拟计算 SPR 反射率曲线^[10,11]。因此我们采用 Winspill 软件来预测 S101-PVA 膜的 SPCE 角度分布情况,理论计算得到 SPR 反射率曲线。如图 5 所示,当入射波长为 610nm,入射角度为 47° 时,出现反射率最小值,对应 SPCE 发射角,与实验结果完

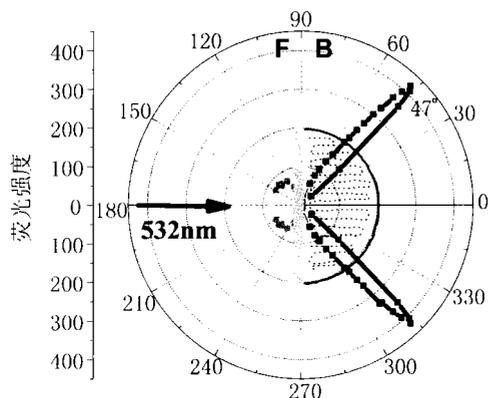


图 4 在 45 nm 银表面 S101-PVA 样品膜荧光信号随着角度变化分布极坐标图

全吻合。就信号强度而言,SPCE 信号较 FS 信号强,约为 FS 的 6 倍。结果表明我们自行设计的装置获得的 SPCE 信号具有高度的定向发射性,且信号强度较 FS 方向信号有明显增强。

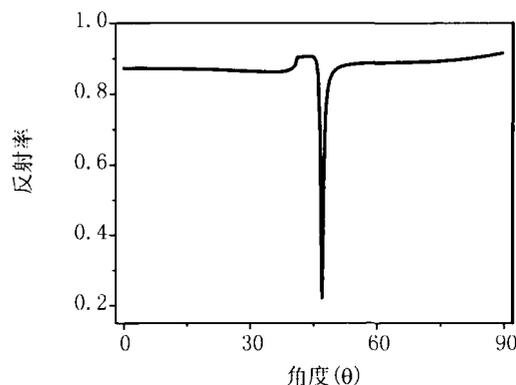


图 5 在波长 610 nm 下银膜表面理论计算得到的反射率曲线

将偏振片放在激发光路和发射光路之间,测量荧光信号的偏振性。如图 6 所示,不管入射光线是垂直偏振方向(V)还是水平偏振方向(H),得到的 SPCE 荧光信号始终都是 p-偏振特性。另外,实验发现,在 SPCE 方向所有检测角度下得到的信号均具有独特的高 p-偏振性,是经过耦合发射。这个特殊的 p-偏振属性是 SPCE 的独特性质。

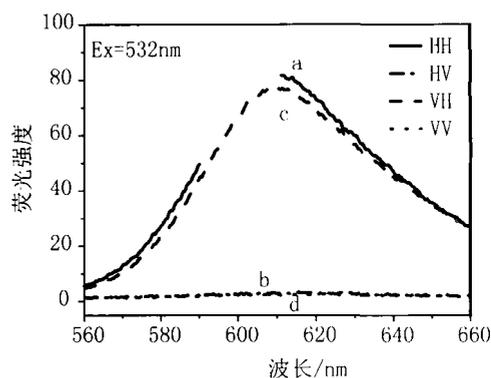


图 6 在检测角度为 47° 时随不同偏振激发和偏振发射的 SPCE 光谱图

V 或 H 表示垂直或水平方向线偏振; (a) HH; (b) HV; (c) VH; (d) VV

SPCE 的另外一个特性是耦合角度与波长具有相关性,即在不同检测角度下得到不同部分的发射光谱。由图 7 A 可知,随着检测角度的变化 SPCE 荧光光谱发生位移,检测角度越大,最大发射波长越小;而 FS 荧光光谱就不会随检测角度发生位移,如图

7B所示。这个光谱位移不是因为荧光团的微环境改变,而是由于SPCE自身的角度色散特性引起的。

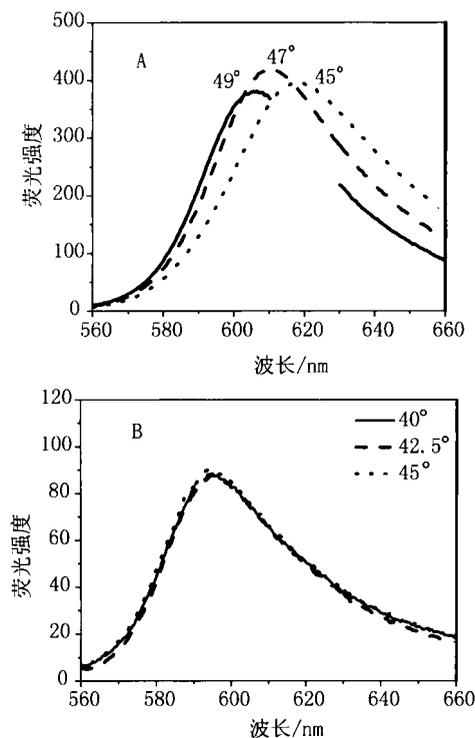


图7 在不同检测角度下S101-PVA样品的SPCE(A)和FS(B)荧光光谱图

4 结论

本实验利用自行设计组装的以激光笔为光源的小型SPCE检测装置检测了含有罗丹明S101的PVA样品,在检测角度为47°测得角度高度定向、唯一的p偏振SPCE稳定信号,实现了SPCE的波长分辨,在不同检测角度下得到不同部分的发射光谱。实验证明,利用改装过的激光笔作为光源,自行组装的小型化SPCE装置,结构紧凑简单、性能稳定,可以实现SPCE检测,完全能够满足一般的测试要求,成本低廉,便于推广使用。

参考文献

[1] Lakowicz J R. Radiative decay engineering 3. Surface plasmon-coupled directional emission. *Analytical Biochemistry*, 2004, 324:153.
 [2] Gryczynski I, Malicka J, Gryczynski Z, Lakowicz J R. Radiative decay engineering 4. Experimental studies of

surface plasmon-coupled directional emission. *Analytical Biochemistry*, 2004, 324:170.

[3] Cao S H, Xie T T, Cai W P, Liu Q, Li Y Q. Electric Field Assisted Surface Plasmon-Coupled Directional Emission: An Active Strategy on Enhancing Sensitivity for DNA Sensing and Efficient Discrimination of Single Base Mutation. *Journal of the American Chemical Society*, 2011, 133: 1787.
 [4] Matveeva E G, Gryczynski Z, Malicka J, Lukomska J, Makowicz S, Berndt K W, Lakowicz J R, Gryczynski I. Directional surface plasmon-coupled emission: Application for an immunoassay in whole blood. *Analytical Biochemistry*, 2005, 344: 161.
 [5] Xie T T, Liu Q, Cai W P, Chen Z, Li Y Q. Surface plasmon-coupled directional emission based on a conformational-switching signaling aptamer. *Chemical Communications*, 2009, 3190.
 [6] Smith D S, Kostov Y, Rao G. SPCE-based sensors: Ultrafast oxygen sensing using surface plasmon-coupled emission from ruthenium probes. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2007, 127: 432.
 [7] Ray K, Szmecinski H, Enderlein J, Lakowicz J R. Distance dependence of surface plasmon-coupled emission observed using Langmuir-Blodgett films. *Applied Physics Letters*, 2007, 90: 251116.
 [8] Smith D, Kostov Y, Rao G, Gryczynski I, Malicka J, Gryczynski Z, Lakowicz J. First Observation of Surface Plasmon-Coupled Emission Due to LED Excitation. *Journal of Fluorescence*, 2005, 15: 895.
 [9] Yuk J S, Trnavsky M, McDonagh C, MacCraith B D. Surface plasmon-coupled emission (SPCE)-based immunoassay using a novel paraboloid array biochip. *Biosensors and Bioelectronics*, 2010, 25: 1344.
 [10] Zhang L, Vidu R, Waring A J, Lehrer R I, Longo M L, Stroeve P. Electrochemical and Surface Properties of Solid-Supported, Mobile Phospholipid Bilayers on a Polyion/Alkylthiol Layer Pair Used for Detection of Antimicrobial Peptide Insertion. *Langmuir*, 2002, 18: 1318.
 [11] Wiltschi B, Knoll W, Sinner E K. Binding assays with artificial tethered membranes using surface plasmon resonance. *Methods*, 2006, 39: 134.

收稿日期:2012-03-15