

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学 号: 20720091150038

UDC\_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

基于荧光猝灭原理的光纤生物传感器的  
研制与应用

Development and Application of Optical Biosensors  
Based on Fluorescence Quenching Mechanism

陈淑娴

指导教师姓名: 熊兆贤教授

专业名称: 材 料 学

论文提交日期: 2012年6月

论文答辩日期: 2012年6月

学位授予日期: 2012年 月

答辩委员会主席: \_\_\_\_\_

评 阅 人: \_\_\_\_\_

2012年6月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果,均在文中以适当方式明确标明,并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外,该学位论文为(熊兆贤 教授)课题(组)的研究成果,获得(熊兆贤 教授)课题(组)经费或实验室的资助,在(熊兆贤 教授 课题组)实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称,未有此项声明内容的,可以不作特别声明。)

声明人(签名):

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（      ） 1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，  
于      年    月    日解密，解密后适用上述授权。

（      ） 2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年    月    日

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 摘要

光纤生物传感器是生物传感器的一个重要分支，在生物医学、食品工程和环境监控等方面有重要的应用。本论文研制基于酶化学-荧光猝灭联用原理的葡萄糖光纤生物传感器和尿酸光纤生物传感器，应用于葡萄糖和尿酸的检测。本论文主要包括以下内容：

首先，以正硅酸乙酯 TEOS 为前驱体，采用溶胶凝胶法包埋联吡啶钉和尿酸酶制备光学尿酸传感材料，考察溶胶凝胶反应参数对生物传感材料性能的影响。通过荧光分析和酶活性测试讨论不同联吡啶钉和尿酸酶含量对荧光响应性能的影响并提出采用初始荧光强度变化速率表征浓度的计算模型。在优化条件下，尿酸传感器测试的线性范围为 0-2.89mM，线性相关度  $R^2=0.987$ 。该传感器 pH 适用范围为中性到碱性区域，对果糖、脲有较好的抗干扰能力，时间稳定性好，在 30 天后能保持 66%的荧光响应。

其次，制备丙酮-醋酸纤维素包埋联吡啶钉的氧敏感膜，并在其上通过戊二醛交联葡萄糖氧化酶得到复合葡萄糖传感膜。讨论不同基底及不同成膜方法对葡萄糖传感膜性能的影响。在优化条件下，该传感器对葡萄糖浓度响应的线性范围为 0-6mM，线性相关度  $R^2=0.978$ 。

同时，采用聚乙烯醇 PVA 改性的溶胶-凝胶法制备光学葡萄糖传感材料。通过形貌分析和酶活性测试讨论不同 PVA 掺杂量和葡萄糖氧化酶含量对葡萄糖传感材料性能的影响。在优化条件下，该传感器对葡萄糖浓度响应的线性范围为 0-6mM，线性相关度  $R^2=0.989$ 。该传感器 pH 适用范围宽；对果糖、脲和维生素 C 有较好的抗干扰能力；时间稳定性好，在 100 天后保持 70%的荧光响应。

**关键词：**荧光猝灭、光纤生物传感器、葡萄糖、尿酸、传感系统

## Abstract

Much attention has been paid to optical biosensor, one of the important branch of biosensors, for its important applications in biological medicine, food engineering, environmental monitoring, etc. Hence, optical biosensors based on fluorescence quenching mechanism and enzyme catalysis were developed for the detection of glucose and uric acid, which involved contents in this thesis as followings.

Optical uric acid sensing materials were fabricated via sol-gel route with TEOS as precursor, in which  $\text{Ru}(\text{bpy})_3\text{Cl}_2$  was encapsulated together with uricase. The effect of the reaction factors on the performance of sensing materials was investigated. A calculation model for the detection of concentration was defined according to the changing rate of the initial fluorescence intensity. The response linear range of uric acid sensor was 0~2.89mM,  $R^2= 0.987$ . The resulting sensor showed a certain anti-interference ability and long-term stability.

Optical glucose sensing composite films were produced by immobilizing glucose oxidase onto acetone-acetic acid cellulose oxygen-sensitive films. The effects of different substrates and films-forming methods were discussed. The resulting sensor achieved a response linear range of 0~6mM, while the value of linear coefficient was 0.978 .

Optical glucose sensing materials were prepared in PVA modified sol-gel process. The influences of the doping amount of PVA and the content of glucose oxidase were discussed. The response linear range of glucose sensor was 0~6mM,  $R^2= 0.989$ . The resulting sensing material showed a wide pH range for application, a certain selectivity and good long-term stability.

**Keywords:** fluorescence quenching; optical biosensor; glucose; uric acid; sensing system

## 目 录

摘 要 .....	I
Abstract .....	II
目 录 .....	III
Table of Contents .....	VI
<b>第一章 绪论 .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1 生物传感器概述 .....</b>	<b>1</b>
1.1.1 生物传感器的定义和分类.....	1
1.1.2 生物传感器的特性因子.....	2
1.1.3 生物传感器的发展和展望.....	3
<b>1.2 光纤生物传感器研究进展 .....</b>	<b>4</b>
1.2.1 光纤生物传感器的原理和结构.....	4
1.2.2 光纤生物传感器的特点.....	5
1.2.3 光纤生物传感器的应用进展.....	6
<b>1.3 生物活性物质的固定方法 .....</b>	<b>8</b>
<b>1.4 酶促反应动力学原理 .....</b>	<b>10</b>
<b>1.5 荧光猝灭型生物传感器 .....</b>	<b>12</b>
1.5.1 荧光猝灭原理.....	12
1.5.2 荧光猝灭型生物传感器检测的表征手段 .....	14
<b>1.6 本论文的研究意义和主要内容 .....</b>	<b>15</b>
1.6.1 本论文的研究意义.....	15
1.6.2 本论文的主要内容.....	15
<b>第二章 实验器材与表征手段 .....</b>	<b>17</b>
<b>2.1 实验试剂 .....</b>	<b>17</b>
<b>2.2 实验仪器 .....</b>	<b>18</b>

2.3 实验样品的表征测试方法 .....	19
<b>第三章 光学尿酸传感材料的制备和性能研究 .....</b>	<b>21</b>
3.1 引言 .....	21
3.2 光学尿酸传感材料基本原理 .....	21
3.3 实验过程 .....	22
3.3.1 光学尿酸传感材料的制备 .....	22
3.3.2 光学尿酸传感材料的表征测试 .....	23
3.4 实验结果与讨论 .....	24
3.4.1 溶胶凝胶法制备尿酸传感材料的反应参数 .....	24
3.4.2 尿酸传感材料形貌分析 .....	26
3.4.3 尿酸传感材料红外光谱分析 .....	27
3.4.4 不同联吡啶钉含量的影响 .....	28
3.4.5 不同尿酸酶含量的影响 .....	29
3.4.6 溶胶凝胶尿酸传感材料的响应特性 .....	30
3.4.7 解吸附测试 .....	32
3.4.8 pH 值对尿酸传感材料响应性能的影响 .....	32
3.4.9 尿酸传感材料的选择性 .....	33
3.4.10 尿酸传感材料的时间稳定性 .....	33
3.5 小结 .....	34
<b>第四章 光学葡萄糖传感材料的制备与性能研究 .....</b>	<b>35</b>
4.1 引言 .....	35
4.2 光学葡萄糖传感材料的基本原理 .....	35
4.3 包埋-交联法制备光学葡萄糖传感膜 .....	36
4.3.1 实验部分 .....	36
4.3.2 实验结果与讨论 .....	39
4.4 溶胶凝胶法制备光学葡萄糖传感材料 .....	45
4.4.1 实验部分 .....	45



4.4.2 实验结果与讨论.....	46
<b>4.5 本章小结.....</b>	<b>54</b>
<b>第五章 结论与展望.....</b>	<b>55</b>
5.1 结论.....	55
5.2 展望.....	56
参考文献.....	57
攻读硕士学位期间科研成果.....	63
致谢.....	65

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## Table of Contents

<b>Abstract in chinese</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract in english</b> .....	<b>II</b>
<b>Chapter 1 Preface</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Introduction to biosensor</b> .....	<b>1</b>
1.1.1 Definition and types of biosensors.....	1
1.1.2 Characteristic factors of biosensors .....	2
1.1.3 Progress and prospect of biosensors .....	3
<b>1.2 Progress research of optical biosensor</b> .....	<b>4</b>
1.2.1 Configuration and principle of optical biosensors .....	4
1.2.2 Advantages and disadvantages of optical biosensors.....	5
1.2.3 Application progress of optical biosensors .....	6
<b>1.3 Immobilization of bioactive substances</b> .....	<b>8</b>
<b>1.4 Kinetics of enzyme-catalyzed reactions</b> .....	<b>10</b>
<b>1.5 Optical biosensor based on fluorescence quenching</b> .....	<b>12</b>
1.5.1 Mechanism of fluorescence quenching.....	12
1.5.2 Characterization of detection method .....	14
<b>1.6 Purpose and significance of the thesis</b> .....	<b>15</b>
1.6.1 Significance of the thesis .....	15
1.6.2 Contents of the thesis .....	15
<b>Chapter 2 Experimental instruments and characterization</b> .....	<b>17</b>
<b>2.1 Reagents</b> .....	<b>17</b>
<b>2.2 Instruments</b> .....	<b>18</b>
<b>2.3 Characterization and measurement</b> .....	<b>19</b>
<b>Chapter 3 Preparation and characteriazation of optical uric acid sensing materials</b>	

.....	21
<b>3.1 Introudction</b> .....	<b>21</b>
<b>3.2 Principle of the uric acid biosensor</b> .....	<b>21</b>
<b>3.3 Experimentals</b> .....	<b>22</b>
3.3.1 Fabrication of the samples .....	22
3.3.2 Characterization of the specimens .....	23
<b>3.4 Results and discussions</b> .....	<b>24</b>
3.4.1 Factors of sol-gel process.....	24
3.4.2 Morphology of sensors .....	26
3.4.3 FTIR spectra.....	27
3.4.4 Effect of the concentration of Ru(bpy) <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> .....	28
3.4.5 Effect of the concentration of uricase .....	29
3.4.6 Fluorescence response of uric acid biosensors.....	30
3.4.7 Desorption of the biosensors.....	32
3.4.8 Effect of pH value .....	32
3.4.9 Selectivity of the biosensors .....	33
3.4.10 Long-term stability of the biosensors .....	33
<b>3.5 Summary</b> .....	<b>34</b>
<b>Chapter 4 Preparation and characteriazation of optical glucose sensing materials</b> .....	<b>35</b>
<b>4.1 Introudction</b> .....	<b>35</b>
<b>4.2 Principle of the glucose biosensor</b> .....	<b>35</b>
<b>4.3 Optical glucose biosensors by embedding-crosslinking method</b> .....	<b>36</b>
4.3.1 Experimentals .....	36
4.3.2 Results and discussions.....	39
<b>4.4 Optical glucose biosensors on sol-gel process</b> .....	<b>45</b>
4.4.1 Experimentals .....	45

4.4.2 Results and discussions.....	46
<b>4.5 Summary.....</b>	<b>54</b>
<b>Chapter 5 Conclusion and prosepct .....</b>	<b>55</b>
<b>5.1 Conclusion .....</b>	<b>55</b>
<b>5.2 Prosepct.....</b>	<b>56</b>
<b>Reference .....</b>	<b>57</b>
<b>Publications .....</b>	<b>63</b>
<b>Acknowledgements .....</b>	<b>65</b>

# 第一章 绪论

## 1.1 生物传感器概述

### 1.1.1 生物传感器的定义和分类

传感器技术与通信技术、计算机技术并称为现代信息产业的三大支柱<sup>[1]</sup>。生物传感器<sup>[2-4]</sup>作为生物、化学、物理、医学、材料学和电子技术等多种学科交叉而成长起来的高新技术产物（图 1.1），是当代科学技术发展的一个重要标志。它具有选择性好、灵敏度高、分析速度快、成本低、能在复杂体系中进行在线连续监测等特点，实现了高度自动化、微型化与集成化，成为生物、临床医学、环境监测、食品工程和军事医学等应用领域不可缺少的功能器件，在近几十年内获得蓬勃迅速的发展。

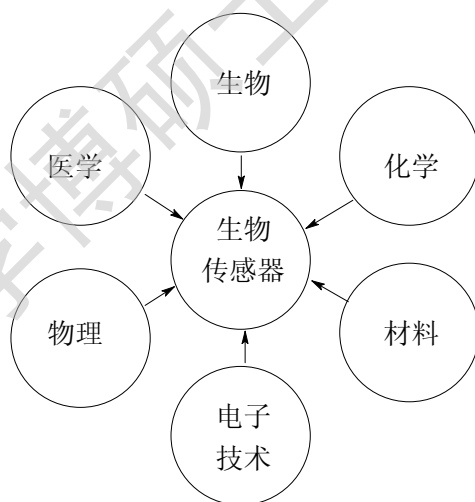


图1.1 生物传感器的交叉学科示意图

Turner教授<sup>[5]</sup>将生物传感器定义为：生物传感器是一种精密的分析器件,它结合了生物或生物衍生敏感元件和理化换能器,能够产生间断或连续的数字信号,信号强度与被分析物成正比。生物传感器主要由两个部份构成：一是分子识别元件（感受器）,即具有分子识别能力的生物活性物质，作为信号产生部分。另一部分为信号转换器（换能器），是信号接收处理部分。生物传感器多种多样，一般

可以从三个角度进行分类<sup>[6-7]</sup>：

(1) 按照信号获取的方式分类, 可分为电化学生物传感器、光化学生物传感器、半导体和压电生物传感器、热导生物传感器和声学生物传感器等。

(2) 按照分子识别元件所用的生物敏感物质属性的不同, 可分为酶传感器、细胞传感器、组织传感器、免疫传感器、微生物传感器和DNA传感器等。其中酶传感器是应用固定化酶作为分子识别元件的生物传感器, 利用酶高效的催化性和高度的专一性, 是发展较早也较为成熟的一类传感器。

(3) 按照生物敏感物质相互作用而输出信号产生的方式分类, 可分为亲和型和代谢或催化型两种。生物亲和型传感器是以分子之间特异识别并结合为基础的生物传感器, 以免疫传感器、酶PZ生物传感器和SPR生物传感器为代表。

按照生物传感器的其他特性还可有其他的分类和命名。如尺寸在微纳米级或者采用纳米材料的生物传感器称为微型生物传感器和纳米生物传感器。能同时测量2种或多种底物的称为多功能传感器, 如嗅觉传感器、味觉传感器和血液成分分析传感器等。此外, 由两种以上不同分子识别元件构成的生物传感器或采用2种或多种反应原理构成的生物传感器称为杂合生物传感器, 如多酶传感器、酶联免疫传感器和酶-微生物杂合传感器等。

### 1.1.2 生物传感器的特性因子

评判生物传感器的性能目前还没有统一的标准来规范, 不同的工作者往往采用不同的要素来表达, 常用的特性因子包括<sup>[8]</sup>：

#### (1) 测试范围(detection range)

测试范围是传感器的应用区间, 一般多采用线性拟合或多项式拟合数据来确定其值。

#### (2) 灵敏度 (sensitivity)

传感器的灵敏度是指传感器达到稳定后输出变化量对输入变化量的比值, 描述了传感器对输入量变化的响应能力。传感器的灵敏度和测量范围有关, 通常传感器灵敏度越高则测试范围越窄。

#### (3) 响应时间 (response time)

分析装置需要一定的“稳定”时间, 即允许本体系达到平衡所需的时间, 即响

应时间。对于不同体系的生物传感器，响应时间可以由几十秒到几分钟，如酶电极的响应时间在几十秒至几分钟之间；免疫传感器需要15min左右；微生物传感器则在20-30min内。

#### (4) 选择性 (selectivity, anti-interference ability)

选择性是传感器实质性的因素，是传感器存在的目的。要开发一种传感器只对一种分析物质有应答是十分少见的。更常见的传感器主要对一种分析物有响应，而对其他类似的分析物质也有一定的响应。因此传感器的选择性、专一性以及抗干扰性是传感器的重要特性因子之一。

#### (5) 检测极限 (detection limit)

检测极限是在校正曲线的外延线性部分与极限相交处的分析质浓度。也有采用 $S$  (监测信号) /  $N$  (噪音) = 3作为标准，计算出相应的最低浓度。

#### (6) 时间稳定性 (time-stability)

所有生物活性物质都会随着时间而变质，当其被固定在某种结构中时也会由于固定效果的强弱而有所流失。这意味着生物传感器具有较短的使用寿命，其性能随着时间也会有所改变。

#### (7) 重复性 (reproducibility)

对于生物传感器，在重复测定时期望的再现性其误差应该小于 $\pm 10\%$ 。

### 1.1.3 生物传感器的发展和展望

自从1967年 Updike 和 Hicks<sup>[9]</sup>采用酶固化技术研制成了世界上第一只酶电极以来，生物传感器已经经历了40多年的历程，其发展大致经历了三个发展阶段<sup>[5]</sup>。第一阶段为20世纪60-70年代的起步阶段，以基于固定化生物膜和经典酶电极的电化学传感器为代表。其中葡萄糖酶电极的研制作为先驱，在日本和美国已有成熟产品走向市场。第二阶段在70年代末期到90年代，基于不同原理和技术的生物传感器在电化学传感器的基础上迅速发展，热生物传感器、光纤传感器、声学生物传感器及半导体和压电生物传感器等问世。80年代中期，介体酶电极的出现迎来了生物传感器发展的第一个发展高潮。第三阶段为90年代末期至今，随着光纤技术的突破和成熟化，光化学式生物传感器占据了主导地位，其独特的优异性逐渐得到了重视和应用。此外，以生物芯片技术和表面等离子体

的研制迎来了生物传感器发展的第二个高潮,而且生物传感器的市场开发获得显著成绩,并逐渐成为人们日常生活中的重要组成部分。

作为多学科交叉高技术领域的产物,生物传感器随着生物科学、信息科学和材料科学等相关学科的高速发展将会有以下新特点<sup>[1]</sup>:

功能多样化:新材料的发展为新功能传感器的研发提供了坚实的基础,随着科学的发展,未来的生物传感器将更多的应用于医疗保健、疾病诊断、农业种植、环境监测、食品检测、发酵技术及军事等多个领域,遍及人们的生产工作和日常生活。能代替人类的各种感觉器官,如嗅觉、听觉及味觉和感知能力的多功能仿生生物传感器也逐渐兴起并进入应用阶段。

集成化与智能化:芯片技术的引入,可将传感器及其后级的放大电路、运算电路和补偿电路等集成在一起实现一体化,或将多种生物传感器集成在一起构成二维阵列式生物传感器生物传感器。生物传感器的发展与计算机为基础的微电子技术和微处理技术等紧密结合,使之不仅具有检测功能,同时有信息处理、逻辑判断和自动控制等功能,形成智能化的生物传感系统,不仅拓展了功能,同时提高了灵敏度,且在对信息的识别和环境的适应等方面大大优于传统的生物传感器。

微型化:随着微机械加工工艺和微纳米技术的进步,生物传感器将向微型化发展,利于实现微环境的检测。同时,各种便携式及家用生物传感器的出现很大程度上提高了其普及程度,使人们在家中健康预警及诊断,在市场上检测食品等等成为可能。

## 1.2 光纤生物传感器研究进展

### 1.2.1 光纤生物传感器的原理和结构

光纤生物传感器(fiber optic biosensor, FOBS)<sup>[10]</sup>是生物传感器的一个重要分支,以光纤传导和收集光信号进行生物检测。其原理如图 1.2 所示,可以分为两个部分,第一部分为生物功能分子的识别,即被测物质经扩散作用进入固定化生物活性材料,经特异性结合后发生物理或化学反应产生响应信号;第二部分为信号转换,就是光换能器,简称“光极”,将上述响应信号转化为可定量可处理的光



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库