

文章编号:1007-2780(2022)08-1104-07

基于液晶的高通量蛋白质光电生物传感器

郝希晨, 戴海涛*, 高美妮, 付宜铠, 张 钰, 郭子扬, 张 涵, 邢淳梓, 王雨涵
(天津大学 理学院, 天津 300355)

摘要:蛋白质分析是疾病诊断和医学研究中一类重要的方法。本文提出了一种单基底的液晶生物光电传感器,可用于快速检测蛋白质的浓度。该传感器由制备叉指电极的单基底ITO玻璃和垂直定向的液晶层构成,牛血清白蛋白(BSA)分子对液晶定向具有干扰作用,通过不同外加电场作用下偏光显微镜图像的亮度变化可标定BSA的浓度,实现传感的功能。实验发现,外加电场的设置提升了浓度检测的线性度,还提升了检测的上限,其BSA检测范围为 $10^{-3}\sim 10^{-7}$ g/mL。通过在单ITO玻璃基底上光刻制备液晶池子阵列,实现了基于单基底液晶传感器进行多通道、高通量蛋白质浓度检测的功能。本文提出的单基底液晶光电生物传感的方法具有电调控、效率高等特性,为研究液晶器件的应用提供了新的技术方案。

关键词:液晶生物传感;蛋白质浓度分析;单基底器件;检测阵列

中图分类号:O753⁺.2 文献标识码:A doi:10.37188/CJLCD.2022-0185

High throughput protein photoelectrical biosensor based on liquid crystal

HAO Xi-chen, DAI Hai-tao*, GAO Mei-ni, FU Yi-kai, ZHANG Yu,
GUO Zi-yang, ZHANG Han, XING Chun-zi, WANG Yu-han

(School of Sciences, Tianjin University, Tianjin 300355, China)

Abstract: Protein analysis is an important method in disease diagnosis and medical research. In this paper, a single substrate liquid crystal biophotoelectric sensor is proposed for rapid detection of protein concentration. The sensor is composed of a single substrate ITO glass and a vertically oriented liquid crystal layer. Bovine serum albumin (BSA) can interfere with the orientation of the liquid crystal. The concentration of BSA can be calibrated by the brightness of polarizing microscope images under different applied electric fields to realize the sensor function. It was found that the linearity of concentration detection and the upper limit of detection were improved by setting the applied electric field, and the detection range of BSA was $10^{-3}\sim 10^{-7}$ g/mL. Furthermore, the liquid crystal cell array was prepared by photolithography on a single ITO glass substrate, and the function of multi-channel, high-throughput protein concentration detection based on a single substrate liquid crystal sensor was realized. In this paper, the single substrate liquid crystal photoelectric biosensor method has the characteristics of electric control and high efficiency, which provides a new technical scheme

收稿日期:2022-06-02;修订日期:2022-06-28.

基金项目:国家自然科学基金(No. 61975148)

Supported by National Natural Science Foundation of China(No. 61975148)

*通信联系人, E-mail:htdai@tju.edu.cn

for the study of liquid crystal device applications.

Key words: liquid crystal biosensing; protein concentration analysis; single substrate device; detection array

1 引言

蛋白质是人体中重要的组成部分,也是生物身体中能量的主要来源。蛋白质在医学研究和癌症诊断中有指示疾病的特点,因此蛋白质的高灵敏检测和选择性鉴别是极其重要的。比如,人尿白蛋白对糖尿病肾病、心血管和肾脏疾病的诊断有重要价值。在免疫检测反应中,最常使用的方法是荧光检测。虽然它具有良好的灵敏度,但是此方法需要标记,因此耗时耗力^[1-10]。质谱法、酶联免疫吸附(ELISA)和荧光免疫分析法等其他常规技术在蛋白质分析方面的能力各不相同,但由于成本高和操作复杂,这些方法和仪器仍然存在应用上的局限性。因此,开发一种高性能、低成本、稳定的蛋白质检测器件对于提升疾病早期检出率具有重要的意义。

液晶(LCs)作为一种响应快速、灵敏度高和成本低的材料,在生物传感领域得到了广泛的应用。近几年,基于液晶的生物传感器和传感平台快速发展,尤其在蛋白质分子检测方面得到了研究者的重视。在液晶/液体或者液晶/玻璃界面,生物分子的引入将破坏液晶分子的有序定向。由于液晶自身的各向异性,在偏光显微镜下观察,其光学特性将因为生物分子的引入而改变,因此通过检测液晶器件光学特性的方法可以获得生物分子的浓度等信息^[11-15]。基于液晶的生物传感提供了一种新的检测免疫化合物的技术,为生物医学和临床检测提供了新的方法和平台。

基于液晶的生物传感器件常采用液晶盒制备,将液晶渗入定向好的具有一定厚度的玻璃盒中间^[16],通过观察生物分子所造成的透过率的改变来实现传感。这种结构制备相对复杂,生物分子不容易进入传感区域。由于无标记的生物检测技术,如表面等离子体共振(SPR),以及临床生物检测都是在单个的玻璃、塑料或者膜的基底上形成的,因此,这种组装液晶盒的方法较为复杂和繁琐,不能很好地在临床中应用^[17-21]。最近,Wei Lee等人提出基于液晶聚合物的单基底的生

物传感技术。该技术将液晶与光致聚合物混合制备于单玻璃基底上,通过光固化,实现液晶器件的制备。这种技术操作简单,节省材料,符合临床检测要求,对牛血清白蛋白的检测极限达到了 1.6×10^{-12} g/mL^[15]。这种方法只是利用了液晶的分子定向特性,液晶分子自身的可调控优势没有得到充分利用。并且单个玻璃基底只能测出一种浓度的BSA,效率比较低。因此,进一步探索基于液晶的单基底高通量光电生物传感具有重要的应用价值。

本文提出一种单基底高通量液晶光电测量生物传感方案。在单ITO玻璃上制备叉指电极,通过施加面内电压,控制电极间液晶分子的定向。引入生物分子,扰动液晶分子的定向,改变其光学性能以实现生物传感功能。进一步在叉指电极上制备方格子阵列(液晶池子),实现高通量阵列BSA浓度的传感。本研究结果为单基底高通量光电生物传感器提供了新的思路。

2 实验材料、装置及检测原理

2.1 实验材料

垂直定向剂为二甲酰基[3-三甲氧基硅基丙基]氯化铵(DMOAP),向列相液晶为QYDLC-7(波长为589 nm,温度为20℃下双折射率 $\Delta n = 0.224$)。预聚物采用光致聚合物NOA65(Norland),以牛血清白蛋白(BSA)作为测试用的标准蛋白(Sigma Aldrich)。

2.2 单基底器件的制备

在ITO玻璃(2 cm×2 cm)上制备叉指电极,整个电极区域的长度为2 cm,宽度为1.2 cm。为了保证液晶分子能够在电极之间获得足够大的电压,电极与电极之间的间隔设置为50 μm,如图1(a)所示。基底上首先制备DMOAP层,形成垂直定向层。

使用去离子水将BSA溶液稀释成特定的浓度,将BSA溶液滴在DMOAP修饰的玻璃基底上(BSA液滴覆盖一个叉指电极)。随后将玻璃

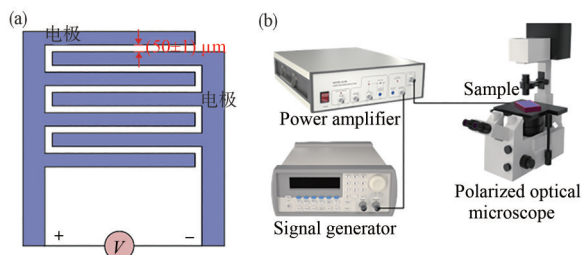


图1 (a) 样品叉指电极示意图;(b)生物传感系统实验装置。

Fig.1 (a) Schematic diagram of interdigital electrode;
(b) Experimental device of biosensor system.

基底放在热台上, 30 °C加热 30 min, 固化 BSA。接着将 LC/NOA65 的混合物滴在玻璃基板上, 旋涂均匀。用强度为 15 mW/cm² 的紫外灯曝光 30 s, 以形成聚合物网络。采用奥林巴斯 IX71 偏光显微镜(POM)观察正交偏振条件下样品的透光率来标定 BSA 的浓度。图 1(b)给出了用于蛋白质浓度分析的实验装置图, 其中 Agilent33210 A 信号发生器和 TREK 623B 高压放大器通过同轴电缆连接, 用于在液晶器件上施加电场。

高通量测试的样品采用如图 2(a)所示的阵列化液晶格(或液晶池子), 每个格子的尺寸为 800 μm × 800 μm, 制备于叉指电极上。制备好液晶定向层后, 在每个液晶池子中利用毛细滴管(直径为 300 μm)滴入不同浓度的 BSA 并固化, 与前述的步骤一致, 在基底上制备液晶/聚合物薄膜, BSA 固化后的液晶池子如图 2(b)所示。

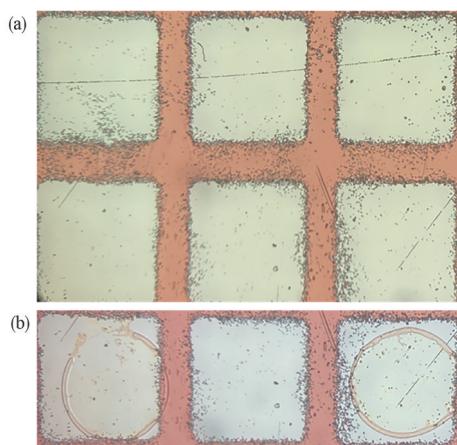


图2 光刻方格图像(LC池)。(a) LC池子;(b)含有 BSA 的 LC池子。

Fig.2 Lithographic grid image (LC cell). (a) LC pool;
(b) LC pool containing BSA.

图 2(b)中的圆环是因为 BSA 在干燥过程中, 从 BSA 液滴边缘蒸发的水被从内部蒸发的水补充, 导致溶液向外流动, 将蛋白质溶质带到液滴边缘, 从而形成环状外形, 即咖啡环效应。咖啡环效应会对实验产生影响, 但也在一定程度上增加了能够检测的最小浓度的极限。本实验将不同浓度的 BSA 根据图像亮度分别进行严格标定, 使灰度值和浓度值相对应, 并且对亮度取平均值来减小咖啡环效应的影响。

2.3 蛋白质浓度测试原理

偏光显微镜(POM)的起偏(P)和检偏(A)方向设定为正交, 如图 3 所示。初始状态, 未加入 BSA 的样品, 液晶垂直定向, 入射光偏振方向和液晶分子定向垂直, 经过样品后偏振态不发生改变, 因此整个视场为黑色, 如图 3(a)所示。当内电场电压超过 Friedericksz 转变电压时, 液晶分子沿电场方向转动^[22], 在偏光显微镜下观察到的电极间的图像由黑色慢慢变亮。这主要是因为液晶分子沿着电场方向排列, 使得出射光的偏振状态发生了改变, 如图 3(b)所示。当加电压足够高时, 电极中心处的液晶分子定向与基底平行, 如图 3(c)所示。此时经过样品后, 在电极中心处入射光的偏振状态不改变, 偏光显微镜下观察到的电极中心区域又变为黑色^[23]。而在电极边缘处, 液晶分子定向具有一定的倾角, 因此入射光经过以后偏振状态也发生改变, 在偏光显微镜下

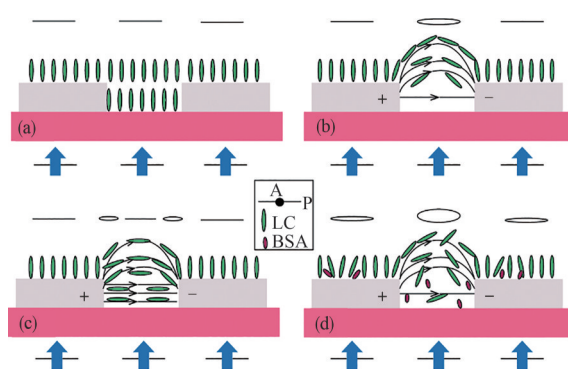


图3 液晶分子定向以及出射光的偏振方向示意图。(a) 未加电压时;(b)加电压后(没有 BSA)时;(c)电压足够高时;(d)有电压,同时加入 BSA 时。

Fig.3 Schematic diagram of liquid crystal molecular orientation and polarization direction of outgoing light. (a) No voltage is applied; (b) Voltage is added (without BSA); (c) Voltage is high enough; (d) Voltage and BSA is added at the same time.

能显示一定的亮度。图3中直线表示线偏振光,而椭圆则表示出射光,为非线偏振光。当加入BSA之后,由于BSA会扰乱液晶分子定向,因此偏光显微镜下观察到的图像呈不同的亮度,如图3(d)所示。结合灰度的变化,即可进行样品浓度的判断。为了使在一定电压下,POM亮度的变化比较好地表现浓度的变化,在进行图像处理时,主要选择电极中心处的一个直线进行灰度的统计和计算。

3 实验结果分析

3.1 单基底浓度检测

按照2.2节中的操作步骤,首先在ITO玻璃基底上制备DMOAP垂直定向层,滴不同浓度的BSA并固定,随后制备LC/NOA65混合液,选取NOA65的含量(质量分数)为3%^[17],旋涂至玻璃基底,并采用紫外线照射固化。在叉指电极的正负极加电,电压范围控制在0~50 V。在偏光显微镜下观察液晶在加电时的明暗变化。

图4给出了BSA浓度为 10^{-3} g/mL时,不同电压下的偏光显微镜图像。图4中的黑色圈为视场中的偏振旋转架的图像,为无效区域。图4(a)显示当不加电时,由于BSA对液晶定向的扰动,电极液晶图像在POM下观察到的图像为亮。图4(b)~(f)显示施加不同电压情况下,电极宽度内的灰度变化。其中,白色箭头指出的位置为电极的区

域。由图可看出电极中间的部分越来越暗,而电极两侧则越来越亮。在外加电压作用下,面内电极间的液晶分子定向随着电压的方向改变,电极中间的液晶分子方向沿着电场的方向,因而呈现黑色。而电极边缘的电场呈现弯曲状态,液晶分子也与平面有一定的夹角,所以POM图像在电极的边缘是亮的。

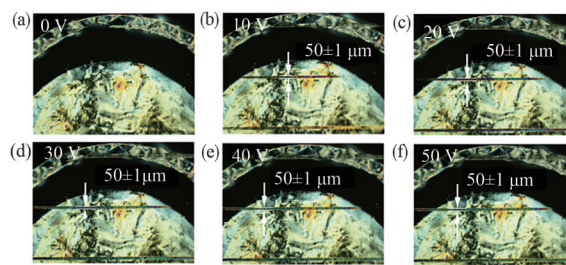


图4 BSA浓度为 10^{-3} g/mL时液晶光致聚合物复合膜在不同电压下的光学图像。(a) 0 V; (b) 10 V; (c) 20 V; (d) 30 V; (e) 40 V; (f) 50 V。

Fig. 4 Optical images of LC photopolymer composite film at different voltage when BSA concentration is 10^{-3} g/mL. (a) 0 V; (b) 10 V; (c) 20 V; (d) 30 V; (e) 40 V; (f) 50 V.

图5(a)~(e)给出浓度为 10^{-3} ~ 10^{-7} g/mL的BSA在0 V(上侧)和15 V(下侧)时的POM图像。由POM的图像可以清楚地看到,随着生物分子浓度的减小,对液晶的扰动越来越小,因此,观察到的图像逐渐变暗。

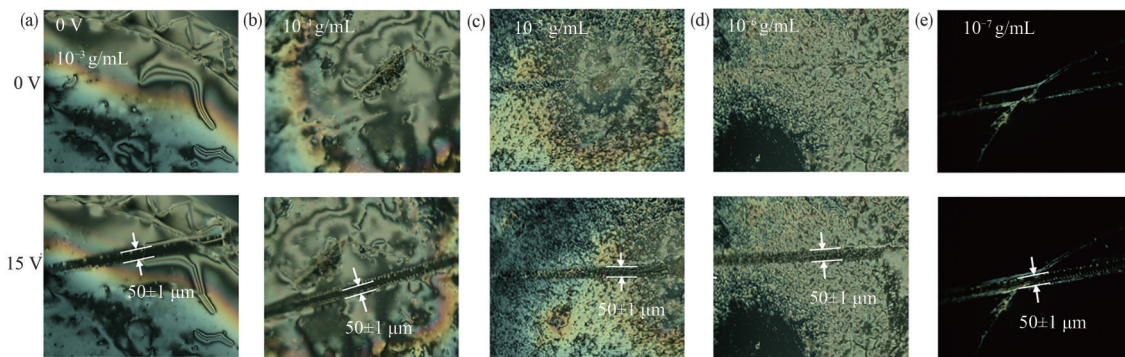


图5 不同施加电压条件下,偏光显微镜效果,(a) 10^{-3} g/mL; (b) 10^{-4} g/mL; (c) 10^{-5} g/mL; (d) 10^{-6} g/mL; (e) 10^{-7} g/mL (上侧为0 V,下侧为15 V)。

Fig. 5 POM images with various applied voltage. (a) 10^{-3} g/mL; (b) 10^{-4} g/mL; (c) 10^{-5} g/mL; (d) 10^{-6} g/mL; (e) 10^{-7} g/mL (top row 0 V, bottom row 15 V).

图6给出了在不同电压条件下,不同浓度的BSA表现出的灰度值。随着施加电压的增加,图

像的灰度平均值减小,当电压加到10 V左右时,各个浓度图像的灰度值逐渐趋于稳定。说明此

时的电场已经足够大,使液晶分子完全垂直于电极。所以在外加电场作用下,能够提升高浓度 BSA 的检测性能。

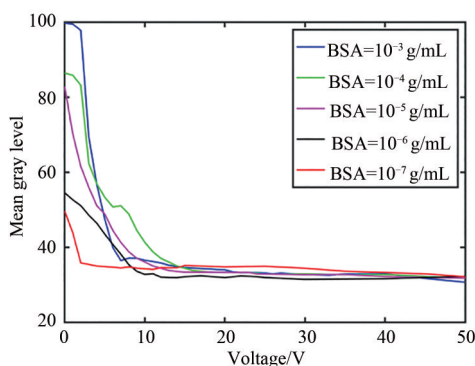


图 6 不同浓度 BSA 对应的灰度平均值随电压的变化
Fig. 6 Mean gray value of BSA with different concentrations changed with voltage.

为定量分析 BSA 浓度与图像的灰度平均值的关系,本文利用图像处理软件分析了电压为 5 V 时不同浓度的图像的灰度值。并且用电压为 0 V 时的图像灰度值作为参照。如图 7 (a) 所示,在有一定的偏置电压时,灰度随浓度变化的曲线的线性度更好。当未施加电压时,液晶分子定向受到 BSA 分子作用和周围液晶分子的弹性作用,因此液晶分子方向的变化随 BSA 分子方向的变化而变化,其具有一定的随机性。但是当外加电场后,液晶分子的定向同时受到 BSA 分子和电场作用,因为电场作用是固定的指向,所以液晶分子变化具有一定的有序性,这也提升了亮度变化的线性度。另外,液晶分子在电场作用下的重定向具有一定的阈值,在本实验中 0~5 V 之间的电压对液晶分子的影响比较小,5 V 以上的电压则逐渐趋于饱和,降低了检测的灵敏度,因此随后的分析均选择在 5 V 外加电压条件下。

定量的标定可以定义标准参数 S :

$$S = \frac{G_0 - G_{BSA}}{G_0}, \quad (1)$$

其中, G_0 和 G_{BSA} 分别为无 BSA 和存在 BSA 时图像的灰度。为确定未知蛋白分析物的浓度,可以将相同体积(5 μ L)的分析物固定在相同 DMOAP 和相同电极间隔玻璃基底上,然后用液晶薄膜进行检测。未知蛋白分析物的浓度可以通过在校准曲线中插值其相对强度来确定,校准曲线如

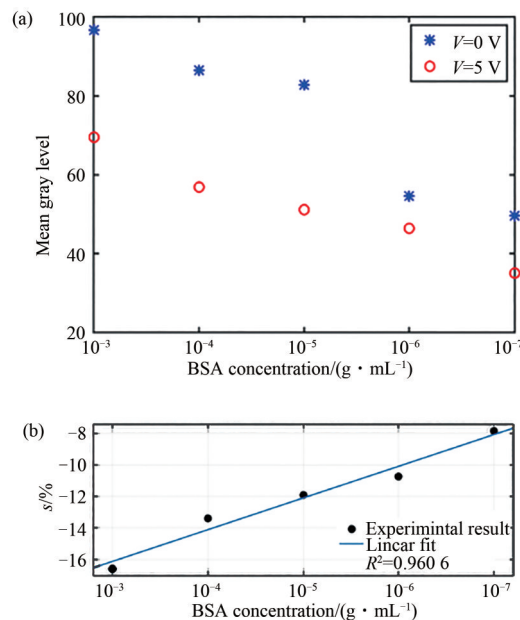


图 7 (a) 电压为 0 V 和 5 V 时 BSA 浓度与图像灰度的关系; (b) 校准曲线。

Fig. 7 (a) Relationship between BSA concentration and image gray level when voltage is 0 V and 5 V; (b) Calibration curve.

图 7 (b) 所示。

3.2 高通量分析方案

在实际应用中,需要快速测量大量不同浓度的样品,因此高通量的蛋白质分析具有重要的意义。3.2 节中采用的方法,在滴入 BSA 时,因为浓度不同会导致 BSA 液滴扩散的面积不同,所以同时检测多个浓度的样品具有一定的困难。为了克服这个困难,本文采用光刻方法在 ITO 表面电极之间制备正方形格子(液晶池子)阵列,其尺寸为 800 μ m $\times$ 800 μ m。每个液晶池子可以滴入不同浓度的 BSA。为了保证滴入的 BSA 能够完全在单个池子里面,不会与其他浓度的 BSA 混合,选择直径为 300 μ m 的毛细管进行点样。随后在其上制备液晶聚合物层,在 POM 下观察得到的图像如图 8 (a) 所示,其中标出了不同浓度 BSA 所对应的液晶池子。图中,所有的电极都没有呈现出来,或者电极区域呈全亮的状态,这是因为 BSA 破坏了液晶定向所导致的。施加面内电场后,不同电压下观察到的 POM 图像如图 8 (b)~(e) 所示。每个液晶池子都保证电极在池内。可以看出随着电压的增加,电极图样逐渐显现,但是其灰度分布依然是电极中间黑两边

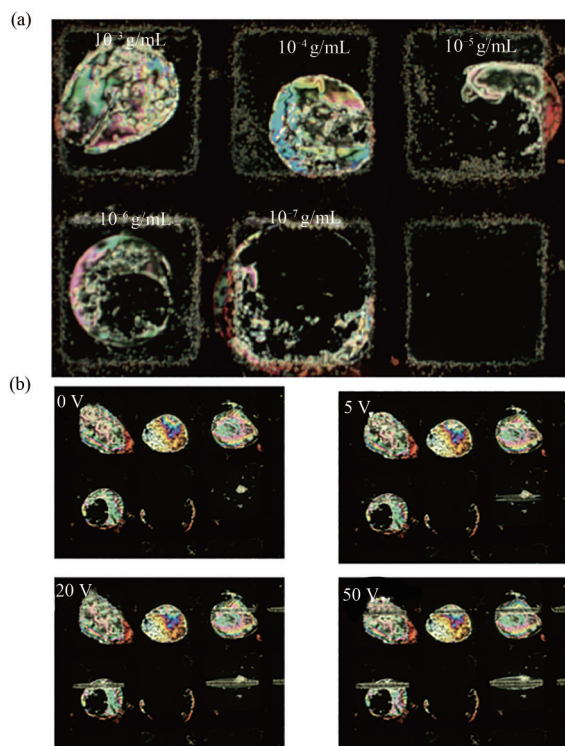


图8 (a)不同浓度BSA和(b)不同电压下(0,5,20,50 V)液晶光致聚合物复合膜的光学图像。

Fig.8 Optical images of liquid crystal photoinduced polymer composite films at (a) different concentrations of BSA and (b) different voltages (0,5,20,50 V).

亮。由于在显微镜下所看到的视场范围有限,在横向上只能看到3~4个液晶池子,因此可同时分析BSA浓度依次为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} g/mL时的POM图像。图9给出了同一个电极内,从左到右不同BSA浓度的图像灰度值(即BSA浓度依次为 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} g/mL),其灰度峰值从左到右依次降低,所以通过一个曲线即可以确定

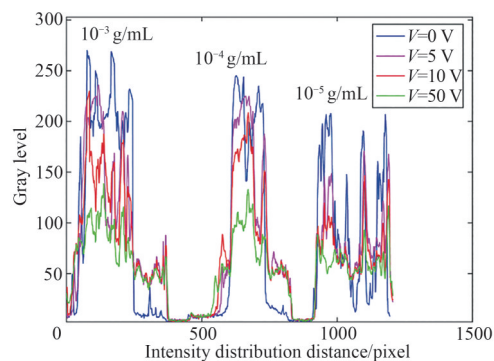


图9 不同电压下液晶池中电极间的图像灰度值

Fig.9 Gray values of images between electrodes in the liquid crystal cell at different voltages

多个BSA浓度的数值,实现了高通量的检测方案,提高了蛋白质检测效率并且降低了检测成本。

4 结 论

本文制备了具有面内电极的单基底液晶生物传感器,对其外加电场能够提升传感特性的线性度。对BSA的检测范围达到 10^{-3} ~ 10^{-7} g/mL,其检测极限可达到 10^{-7} g/mL。利用光刻技术在基底上制备了阵列化的液晶池子,提高了检测蛋白质浓度的效率。由于偏光显微镜视场的限制,同时检测的样品的数目较少,未来可通过提升光刻精度减小液晶池子的方法来提升同时检测的通道数目。本研究设计的液晶传感技术方案,具有操作简单,可电调控检测范围,效率高的特点,为高效率、高性能的液晶传感提供了一种新的思路。

参 考 文 献:

- [1] LUAN C L, LUAN H P, LUO D W. Application and technique of liquid crystal-based biosensors [J]. *Micromachines*, 2020, 11(2): 176.
- [2] LI X, TAN H, LI Y L, *et al.* Aptamer-based liquid crystal biosensor for detection of platelet-derived growth factor BB [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2014, 42(5): 629-635.
- [3] GAO J C, CHIU N F, LIN H Y, *et al.* Liquid crystal sensor for label-free monitoring protein solution [C]// *Proceedings of 2016 IEEE Photonics Conference*. Waikoloa: IEEE, 2016: 362-363.
- [4] VAHEDI A, KOUHI M. Liquid crystal-based surface plasmon resonance biosensor [J]. *Plasmonics*, 2020, 15(1): 61-71.
- [5] ZHANG J, SU X X, YANG D, *et al.* Label-free liquid crystal biosensor for cecropin B detection [J]. *Talanta*, 2018, 186: 60-64.
- [6] YANG X X, LI H Y, ZHAO X F, *et al.* A novel, label-free liquid crystal biosensor for Parkinson's disease related

- alpha-synuclein [J]. *Chemical Communications*, 2020, 56(40): 5441-5444.
- [7] CHEN F L, FAN Y J, LIN J D, *et al.* Label-free, color-indicating, and sensitive biosensors of cholesteric liquid crystals on a single vertically aligned substrate [J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(9): 4636-4642.
- [8] SHABAN H, LEE M J, LEE W. Label-free detection and spectrometrically quantitative analysis of the cancer biomarker CA125 based on lyotropic chromonic liquid crystal [J]. *Biosensors*, 2021, 11(8): 271.
- [9] 李兰英, 蒋维成, 何勇, 等. 液晶生物材料新用途-液晶生物传感器[J]. 化工新型材料, 2013, 41(6): 149-150, 156.
- L I L Y, J I A N G W C, H E Y, *et al.* New application of LC biopolymer-liquid crystal biosensors [J]. *New Chemical Materials*, 2013, 41(6): 149-150, 156. (in Chinese)
- [10] YEO D H, PARK S Y. Liquid-crystal-based biosensor for detecting Ca^{2+} in human saliva [J]. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 2019, 74: 193-198.
- [11] POPOV P, MANN E K, JÁKLI A. Thermotropic liquid crystal films for biosensors and beyond [J]. *Journal of Materials Chemistry B*, 2017, 5(26): 5061-5078.
- [12] CARLTON R J, HUNTER J T, MILLER D S, *et al.* Chemical and biological sensing using liquid crystals [J]. *Liquid Crystals Reviews*, 2013, 1(1): 29-51.
- [13] POPOV N, HONAKER L W, POPOVA M, *et al.* Thermotropic liquid crystal-assisted chemical and biological sensors [J]. *Materials*, 2018, 11(1): 20.
- [14] LEE M J, LEE W. Liquid crystal-based capacitive, electro-optical and dielectric biosensors for protein quantitation [J]. *Liquid Crystals*, 2020, 47(8): 1145-1153.
- [15] LIN C M, WU P C, LEE M J, *et al.* Label-free protein quantitation by dielectric spectroscopy of dual-frequency liquid crystal [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2019, 282: 158-163.
- [16] LEE M J, DUAN F F, WU P C, *et al.* Liquid crystal - photopolymer composite films for label-free single-substrate protein quantitation and immunoassay [J]. *Biomedical Optics Express*, 2020, 11(9): 4915-4927.
- [17] HSU W L, LEE M J, LEE W. Electric-field-assisted signal amplification for label-free liquid-crystal-based detection of biomolecules [J]. *Biomedical Optics Express*, 2019, 10(10): 4987-4998.
- [18] LIN C H, LEE M J, LEE W. Bovine serum albumin detection and quantitation based on capacitance measurements of liquid crystals [J]. *Applied Physics Letters*, 2016, 109(9): 093703.
- [19] WU P C, KARN A, LEE M J, *et al.* Dye-liquid-crystal-based biosensing for quantitative protein assay [J]. *Dyes and Pigments*, 2018, 150: 73-78.
- [20] LEE M J, LIN C H, LEE W. Liquid-crystal-based biosensing beyond texture observations [C]//*Proceedings of SPIE 9565, Liquid Crystals XIX*. San Diego: SPIE, 2015: 956510.
- [21] ZHUANG Z Z, SUH S W, PATEL J S. Polarization controller using nematic liquid crystals [J]. *Optics Letters*, 1999, 24(10): 694-696.
- [22] ZHANG Z C, YOU Z, CHU D P. Fundamentals of phase-only liquid crystal on silicon (LCOS) devices [J]. *Light: Science & Applications*, 2014, 3(10): e213.
- [23] 叶文江, 苏军红, 刘晓梦, 等. 输出光强恒定的液晶自动调节系统[J]. 液晶与显示, 2014, 29(4): 538-543.
- YE W J, SU J H, LIU X M, *et al.* Liquid crystal self-regulation system of exporting fixed light intensity [J]. *Chinese Journal of Liquid Crystals and Displays*, 2014, 29(4): 538-543. (in Chinese)

作者简介:



郝希晨(1998—),女,河北石家庄人,硕士研究生,2020年于河北民族师范学院获得学士学位,主要从事液晶光电子器件的研究。E-mail: xchao18332052922@163.com



戴海涛(1977—),男,河南焦作人,博士,教授,2005年于复旦大学获得博士学位,主要从事液晶光电子器件的研究。E-mail: htdai@tju.edu.cn