

文章编号 1004-924X(2013)09-2333-07

GGBP 蛋白修饰的表面等离子共振微创 血糖检测仪

栗大超*, 李国卿, 张晶鑫, 于海霞, 徐可欣

(天津大学 精密测试技术及仪器国家重点实验室, 天津 300072)

摘要:根据基于微流控芯片的组织液透皮抽取系统设计了一种小型化微创人体血糖检测仪器。该仪器基于微创的方法,利用真空负压抽取人体组织液,并采用表面等离子共振(SPR)技术,通过检测皮肤真皮层组织液中的葡萄糖浓度来预测血液中的葡萄糖浓度。通过绑定对葡萄糖具有特异性吸附的 D-半乳糖/D-葡萄糖结合蛋白(D-GGBP),对 SPR 传感器表面进行预处理,实现对葡萄糖分子的特异性吸附。实验配制了不同浓度的葡萄糖溶液,检测并得出葡萄糖溶液浓度与折射率的关系曲线。应用课题组设计的微创血糖检测仪,实验测量了葡萄糖溶液浓度与组织液浓度,并与血糖仪测量得到的葡萄糖溶液浓度进行了比较。结果表明,使用 GGBP 修饰过的表面等离子共振传感器测量葡萄糖水溶液浓度的下限为 0.625 mg/dL,当葡萄糖水溶液浓度在 0.625~5 mg/dL 时有较好的线性。通过测试实验验证了该仪器的可行性,显示了结合 GGBP 蛋白的 SPR 测量技术在微创血糖检测领域有良好应用前景。

关键词:血糖检测仪;表面等离子共振;D-半乳糖/D-葡萄糖结合蛋白(GGBP);组织液;微创

中图分类号:TH773;R318 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20132109.2333

Minimally-invasive blood glucose detection instrument based on surface plasmon resonance sensor decorated with GGBP

LI Da-chao*, LI Guo-qing, ZHANG Jing-xin, YU Hai-xia, XU Ke-xin

(State Key Laboratory of Precision Measuring Technology and Instrument,
Tianjin University, Tianjin 300072, China)

* Corresponding author, E-mail: dchli@tju.edu.cn

Abstract: A portable minimally-invasive human blood glucose detection instrument was designed by a microfluidic chip based interstitial fluid transdermal extraction system. On the basis of the minimally-invasive method, the instrument utilizes a vacuum pressure to extract the interstitial fluid from human body, adopts the Surface Plasmon Resonance (SPR) technology to measure the glucose concentration of the interstitial fluid, and then predicts the blood glucose concentration with the glucose concentration of the interstitial fluid. Moreover, by immobilizing D-galactose/D-glucose Binding Protein (D-GGBP) which has a specific adsorption function to the glucose, it preprocesses the surface of the SPR sensor and realizes the specific adsorption of glucose molecules. In the experiment, the glucose solu-

收稿日期:2013-04-12;修订日期:2013-04-22.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No. 61176107, No. 11204210, No. 51350110233);国家 863 高技术研究发展计划资助项目(No. 2012AA022602);天津市科技支撑计划重点资助项目(No. 11ZCKFSY01500);国家公益性行业科研专项资金重点资助项目(No. GYHY2009060371)

tion with different concentrations was prepared and detected. According to the experimental results, the curve illustrating the relationship between glucose concentration and refractive index was obtained. In addition, the glucose solution and interstitial fluid were measured by using minimally-invasive blood glucose detection instrument designed by our research group. The test result was compared with that measured by a glucose meter. The experimental result indicates that the glucose detection resolution could reach 0.625 mg/dL using the SPR sensor decorated with the GGBP. It shows a good linearity when the glucose concentration ranges from 0.625 mg/dL to 5 mg/dL. The experiment verifies the feasibility of the instrument, and demonstrates that the SPR technology with immobilized GGBP will obtain a wide application in the field of minimally-invasive glucose measurement.

Key words: glucose detection instrument; surface plasmon resonance; D-galactose/D-glucose Binding Protein(GGBP); interstitial fluid; minimally-invasion

1 引 言

糖尿病是中老年人的常见病和多发病,因此人体血糖浓度的连续、动态、精确检测是糖尿病预防和治理的基础和前提^[1]。当今,国际上人体血糖浓度检测方法主要包括有创血糖检测、无创血糖检测和微创血糖检测。其中,有创血糖检测方法即传统的指尖取血^[2],这种方法的缺点在于使病人受创较大,伤口易于感染,无法实现血糖浓度的连续、动态检测,而基于光学光谱的无创血糖检测方法尚处于研究阶段,且距临床应用还有较大距离^[3]。因此微创血糖检测技术越来越成为研究热点。

国内外已有多个机构对微创血糖检测技术做了大量的分析与研究。现阶段的微创血糖检测技术主要包括透过皮肤植入型检测技术^[4]和组织液透皮抽取型检测技术^[5]。透过皮肤植入型的特点是将微型葡萄糖传感器植入体内,通过检测组织液中的葡萄糖浓度来实现血糖检测。组织液透皮抽取型的特点是通过物理化学方法破坏皮肤角质层的结构,增大皮肤通透性,进而透皮抽取并检测组织液中的葡萄糖浓度,最终实现血糖检测。本课题组对组织液透皮抽取型检测方法做了相关研究,设计并制作了基于微流控芯片的组织液透皮抽取系统^[6]。该系统主要可以实现组织液透皮抽取、收集、定量功能。

在基于微流控芯片的组织液透皮抽取系统的基础上,本文设计了一种小型化的微创血糖检测

仪器,该仪器在真空环境下抽取人体组织液,基于表面等离子共振^[7]葡萄糖浓度测量技术,通过在 SPR 传感器表面绑定对葡萄糖具有特异性吸附的 D-半乳糖/D-葡萄糖结合蛋白(D-galactose/D-glucose Binding Protein, GGBP)^[8],分析组织液中的葡萄糖浓度,并最终对人体血糖浓度做出预测。该仪器主要包括组织液提取部分、SPR 检测部分、液体输送管道以及电路控制部分等。在整个工作过程中设计完成了微创血糖检测仪,进行了 GGBP 蛋白绑定以及葡萄糖浓度测量实验,不需抽取患者血样,无痛、无感染风险,快速、准确地得到了检测结果,并可实现 24 h 连续监控,满足了动态、连续、精确检测血糖的需求。

2 SPR 血糖检测仪器工作原理

本仪器主要采用 TI 公司生产的 Spreeta 表面等离子共振生物传感器^[9]。利用表面等离子共振技术测量葡萄糖溶液浓度的原理为:入射光在玻璃与金膜交界处发生全内反射时,产生倏逝波 K_p ,使得金属表面的自由电子被激发而产生表面等离子波 K_{sp} 。当入射角或波长满足一定条件时,表面等离子波与倏逝波的频率和波数相等,两者发生共振,入射光被吸收,使反射光能量急剧降低,在反射光谱上出现共振峰(反射强度最小值)。不同浓度的葡萄糖溶液对应紧靠在金属薄膜表面的不同折射率,其共振峰位置将不同。我们根据不同的折射率推算出不同的葡萄糖溶液浓度,进而达到能够测量不同浓度葡萄糖溶液的目的。该

仪器的检测原理如图 1 所示。

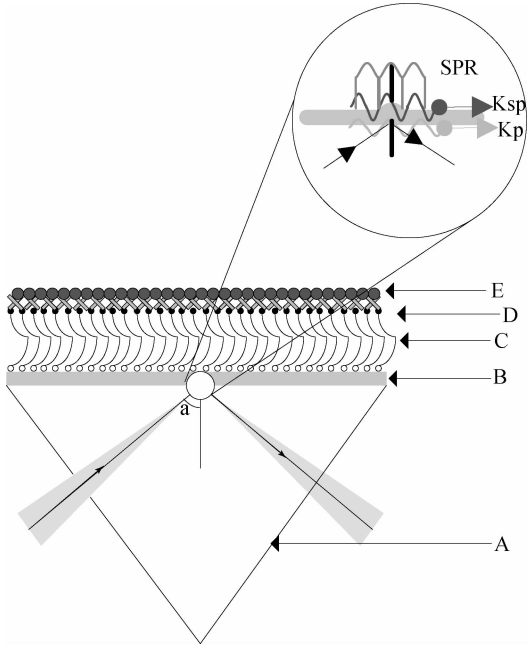


图 1 SPR 血糖测量原理

Fig. 1 Theory of SPR blood glucose measurement

如图 1 所示, A 是棱镜, B 是金属薄膜, C 是自组装分子层, 与 B 生成 Au-S 键的连接, C 的另一端 D 固定了与待测物质有很强亲和力的蛋白质, E 是葡萄糖, 被 D 吸附。本仪器利用表面等离子共振测量方法, 通过测量组织液中葡萄糖的折射率来间接地推算出葡萄糖的浓度, 然而组织液的提取量是微量的, 因此需要通过缓冲液的稀释以利于提取。由于组织液和缓冲液的混合液中不仅含有葡萄糖, 同时还含有其它对溶液的折射率有影响的物质, 所以通过在 SPR 传感器表面绑定对葡萄糖具有特异性吸附的 GGBP 蛋白, 来准确测量组织液中的葡萄糖含量^[10]。实验中所应用的 GGBP 是通过采用埃希氏大肠杆菌中的染色合体片断构造而成, 再由 PCR 技术使其数量不断扩大, 最后从大肠杆菌中分离出来。GGBP 与葡萄糖作用的位点是可以控制的, 本实验中采用的 GGBP 是在 E149C 上定点突变^[11]。

3 SPR 微创血糖仪器设计

3.1 仪器结构

本套仪器主要通过组织液透皮提取, SPR 检测以及液体输送等环节实现了葡萄糖溶液浓度测

量以及组织液提取、输送与测量等功能, SPR 仪器结构示意图如图 2 所示, 系统包括组织液抽取单元、SPR 传感器单元、液体流分配单元、电路控制单元等。

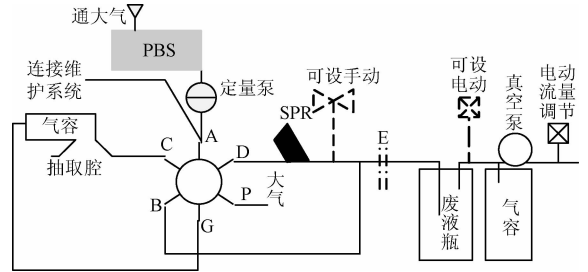


图 2 SPR 微创血糖仪器结构示意图

Fig. 2 Structure diagram of SPR mini-invasive blood glucose instrument

系统由微型真空泵和电磁阀配合工作产生不同的真空度, 在负压下实现组织液的抽取和检测液体流动, 实现我们测量需要的流速 $20 \mu\text{L}/\text{min}$ 和 $200 \mu\text{L}/\text{min}$ 。能实现最大 65 kPa 的负压, 并由主机盒内的压力传感器芯片检测整个系统的压力值, 实现系统压力的反馈控制。

系统中由六通阀来实现液体的分配控制, 六通阀由步进电机带动控制, 并配置零位检测系统。六通阀可工作在 7 种状态下, 通过联通六通阀中的通道, 可以在不同的时刻达到向 SPR 中输送不同试剂以及达到真空抽取组织液的目的。六通阀 7 种状态下的阀位如图 3 所示(数字序号代表阀的工位)。

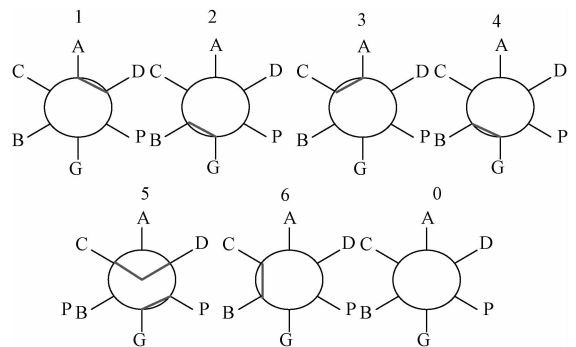


图 3 六通阀阀位

Fig. 3 Valve position of six valve

位 1: 缓冲液标定: 用于在测量开始前的一段时间获得平稳的缓冲液折射率参考值。

位 2: 预抽真空: 用于抽去抽取腔中的空气, 使抽取腔能够附着在皮肤表面。

位 3: 预充缓冲液: 向抽取腔中定量通入缓冲液 1 mL。

位 4: 抽取真空: 使抽取腔真空, 并维持 3 min 左右。

位 5: 检测: 开始测量, 组织液通入 SPR 中进行测量。

位 6: 排除清洗液: 用于排除抽取腔中的用于清洗的液体。

位 0: 停止: 各个通道断开。

3.2 仪器测量过程

基于微创血糖检测仪, 我们进行了组织液中葡萄糖浓度的测量实验。仪器测量过程包括仪器初始化, 缓冲液标定, 蛋白绑定, 组织液测量, 仪器维护以及清洗等。测量的具体步骤为:

(1) 仪器预热, 系统中的各个泵阀进入初始位置。

(2) 通入缓冲液到 SPR 中, 对 SPR 进行标定和初始化, 并获得测量的基准。

(3) 步进电机置于阀位 2, 抽取真空到压力 2。

(4) 利用定量泵向抽取腔中充入 1 mL 的缓冲液。缓冲液的数量应该保证在真空抽取组织液时能够完全覆盖皮肤表面。

(5) 对抽取腔中抽真空, 计时 3 min, 将组织液通入 SPR 中, 开始对组织液进行测量, 组织液的测量时间为 4 min, 流速为 $10 \mu\text{L}/\text{min}$ 。

(6) 通入缓冲液到 SPR, 冲走传感器表面吸附的葡萄糖, 时间为 20 s, 流速 $200 \mu\text{L}/\text{min}$ 。并同时计算浓度值, 显示并保存。

(7) 将剩余的组织液排除干净。

(8) 通过维护盒的自动识别进入维护、标定或是绑定过程。

3.3 仪器实物

仪器小型化系统实物如图 4 所示, 测量时, 首先对被测者腕部皮肤作超声预处理, 以提高皮肤的通透性, 便于组织液的抽取, 然后将仪器佩戴在腕处, 手臂平放, 如图 4(a) 所示, 通过腕带传感器模块上的按键进行操作。腕带传感器模块的内部结构如图 4(b)。进行绑定或维护操作时, 通过管道将腕带传感器模块和试剂盒模块连接, 也是通过腕带传感器模块上的按键进行操作。



(a) 腕式模块
(a) Wrist module



(b) 腕式模块内部图
(b) Internal structure diagram

图 4 SPR 测量仪器实物图

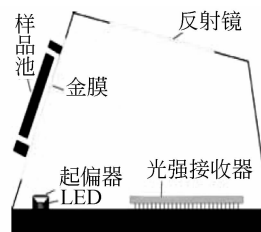
Fig. 4 Diagram of SPR measuring instrument

4 SPR 微创血糖仪器实验过程及结果

开发出实验样机后, 进行了 GGBP 蛋白胺耦合绑定实验, 并利用绑定好 GGBP 的传感器测量了不同浓度的葡萄糖溶液, 得到溶液浓度与折射率之间的关系。最后, 应用于组织液中葡萄糖浓度的测量, 并与已知浓度的葡萄糖水溶液以及使用固定化酶膜传感器测量所得到的参考值进行比对。

4.1 GGBP 绑定蛋白实验

本实验所使用的 TI 公司生产的 SPR 传感器的尺寸为 $14 \text{ mm} \times 29 \text{ mm} \times 41 \text{ mm}$ 。传感器是基于微系统技术制造的, 在极小的空间内集成了 3 个共阳极的 LED 光源 (波长为 840 nm)、起偏器、棱镜、金膜 (厚度为 50 nm)、反射镜、以及 3 个 128 像元的线阵二极管光强检测器^[12]。其分辨率为 5×10^{-6} RU, 传感器内部及外部结构示意图如图 5 所示。



(a) 传感器内部结构图
(a) Internal structure of sensor



(b) SPR 传感器外部示意图
(b) External structure of sensor

图 5 SPR 传感器结构

Fig. 5 Structure of SPR sensor

本实验首先在 SPR 传感器表面绑定 GGBP 蛋白, 实现对葡萄糖分子的特异性吸附, 金膜表面处理和绑定 GGBP 蛋白的主要步骤是:

(1) 在对金膜表面进行清洁处理后, 通入含羟

基的溶液,使得在金膜表面生成 Au-S 键的自组装分子层。

(2)通入缓冲液洗去多余的羟基溶液,再通入表面活性剂,通常为 NHS/EDC 的混合物,EDC 与 NHS 反应后,可产生 NHS 活性酯。NHS 活性酯可以与蛋白质 N 端上的氨基以及赖氨酸残基上的氨基发生缩合反应产生氨基化合物,从而形成共价键连接。

(3)通入待固定在金膜表面的配体,而后观察 SPR 曲线的趋势,直至 SPR 曲线不再变化,说明此时的金膜表面已经达到了所能吸附的配体的最大量。

(4)通入 PDEA 或乙醇胺等胺类的物质,这些物质主要是封闭那些没有与配体作用形成共价键的部位,再通入缓冲液洗去多余的 PDEA 或乙醇胺。

(5)传感器表面的预处理已全部完成,此时即可通入待检测的溶液。

本实验中采用的是胺耦合绑定方法,绑定过程中折射率随时间变化曲线如图 6 所示。

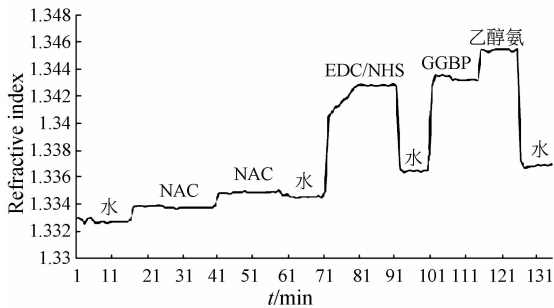


图 6 SPR 传感器表面折射率变化图

Fig. 6 SPR sensor surface refractive index profile

4.2 测量葡萄糖溶液实验结果

实验中配置不同浓度的葡萄糖水溶液,在室温 28 °C 下,在表面绑定了 GGBP 蛋白后的 SPR 传感器上进行实验。实验用水以及配制葡萄糖溶液的溶剂都为去离子水,溶质为分析纯葡萄糖。对不同浓度葡萄糖溶液的替换都需要通入去离子水清洗管道,用以获得稳定的折射率参考曲线。实验结果如图 7 所示,当 SPR 仪器测量浓度较低的葡萄糖溶液时,有较好的线性测量结果,当测量浓度较高的葡萄糖溶液时,线性变差,但测量得到的折射率随溶液浓度的增大而增大。当葡萄糖溶液的浓度在 0.625~5 mg/dL 时有较好的线性,

其分辨率已经能够满足稀释后的组织液的测量需求。

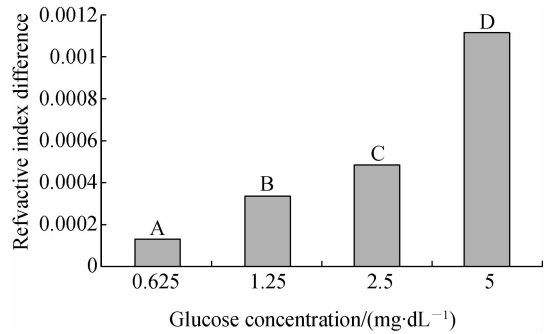


图 7 葡萄糖溶液浓度测量曲线

Fig. 7 Measuring curve of glucose concentration

4.3 组织液测量结果

利用低频超声对皮肤进行预处理,增加皮肤的通透性,然后通过真空负压抽取组织液。现在医学研究已经证明了组织液中和血液中葡萄糖含量的一致性,只是由于细胞的渗透作用,也许会有 10~15 min 的延时。

人体正常的空腹血糖浓度为 80~120 mg/dL,餐后 2 h 的血糖浓度大于 140 mg/dL 即为糖尿病。由于抽取的组织液量很小,约 1 μ L,所以需要利用磷酸盐缓冲液进行稀释。稀释 10 倍后的组织液通过 SPR 仪器测量其葡萄糖浓度值为 13~15 mg/dL,将其与已知浓度的葡萄糖水溶液进行比较,如图 8 所示。使用内置固定化酶膜传感器的血糖仪测量获得参考值,并对两者进行比较,对比的结果如表 1 所示。通过对比显示,实验结果达到了预期效果。

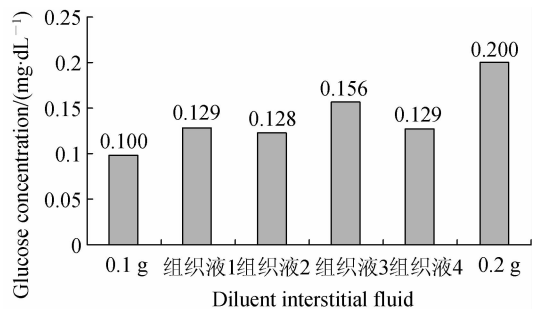


图 8 绑定蛋白测量组织液中葡萄糖浓度

Fig. 8 Measurement of interstitial fluid glucose concentration by binding protein

表 1 血糖仪与 SPR 仪器测量组织液葡萄糖浓度对比

Tab. 1 Comparison of interstitial fluid glucose concentrations measured by a glucose meter and SPR

	血糖仪测量浓度 (g/L)	SPR 测量浓度 (g/L)	相对误差/(%)
1	0.13	0.129	0.76
2	0.13	0.123	5.38
3	0.15	0.156	4

5 结 论

本文研究了基于表面等离子共振技术的微

创血糖检测仪器,设计了一种新型的小型化微创人体血糖检测仪器,在 SPR 传感器表面绑定了 GGBP 蛋白,并应用微创血糖检测仪测量了葡萄糖水溶液浓度和组织液葡萄糖浓度,获得了良好的实验结果。实验结果表明,使用对葡萄糖有特异性吸附的 D-半乳糖/D-葡萄糖结合蛋白(GGBP)修饰过的表面等离子共振传感器,测量葡萄糖水溶液的下限为 0.625 mg/dL。当葡萄糖水溶液浓度在 0.625~5 mg/dL 时有较好的线性,验证了本套仪器的可行性,显示出了结合 GGBP 蛋白的 SPR 测量技术在微创血糖检测领域的良好应用前景。下一步的工作是研究组织液的定量抽取,提高仪器的分析精度,并建立组织液中葡萄糖浓度和血糖浓度的关系。

参考文献:

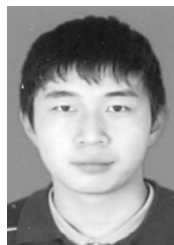
- [1] 许曼音, 陆广华. 糖尿病学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2004: 189.
XU M Y, LU G H. *Diabetes Study* [M]. Shanghai: Publishing of Shanghai Science and Technology, 2004: 189. (in Chinese)
- [2] GEOFFREY M, RICHARD B. Detection of hypoglycemia with continuous interstitial and traditional blood glucose monitoring using the freeStyle navigator continuous glucose monitoring system [J]. *Diabetes Technology & Therapeutics*, 2009, 11(3): 145-150.
- [3] BAE Y M, OH B K, LEE W, *et al.*. Study on orientation of immunoglobulin G on protein G layer [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2005, 21(1): 103-110.
- [4] YUN J H, SHOJI T. Towards smart tattoos: implantable biosensors for continuous glucose monitoring[J]. *Adv. Healthcare Mater*, 2012, DOI: 10.1002/adhm.201200167.
- [5] YU H X, LI D CH, ROBERTS R C, *et al.*. An interstitial fluid transdermal extraction system for continuous glucose monitoring [J]. *IEEE*, 2012, 21(4): 917-925.
- [6] 于海霞. 基于 PDMS 微流控芯片的组织液透皮抽取方法及系统研究[D]. 天津: 天津大学, 2011.
YU H X. *Interstitial fluid transdermal extraction method & systematic research based on PDMS mi-*

- crofluidic chip* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2011.
- [7] 蒋稼欢. 生物医学微系统技术及医用[M]. 北京: 化学工业出版社, 2006: 25-29.
JIANG J H. *Biomedical Micro-system Technology and Application* [M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2006: 25-29. (in Chinese)
- [8] HSIEH H V, PFEIFFER Z A, AMISS T J. Direct detection of glucose by surface plasmon resonance with bacterial glucose/galactose-binding protein [J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2004, 19(7): 653-660.
- [9] KRETSCHMANN E, RAETHER H. Radiative decay of non-radiative surface plasmons excited by light [J]. *Z. Naturforsch*, 1968, 23A: 2135-2136.
- [10] MAHONEY W C, HOGG R W, HERMODSON M A. The amino acid sequence of the galactose binding protein from *Escherichia coli* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1981, 256(9): 4350-4356.
- [11] WARE R A, ENSOR C M, DAUNERT S, *et al.*. A novel reagentless sensing system for measuring glucose based on the galactose/ glucose-binding protein [J]. *Analytical Biochemistr*, 2001, 294(1): 19-26.
- [12] MELENDEZ J R, BARTHOLOMEW D U. A commercial solution for surface plasmon sensing [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 1996, 35(1-3): 212-216.

作者简介:



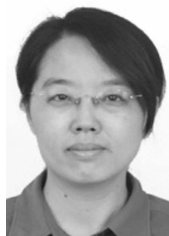
栗大超(1976—),男,河南南阳人,博士,副教授,硕士生导师,2001年、2004年于天津大学分别获得硕士和博士学位,2004~2006年在北京大学微电子学研究院“微米/纳米加工技术国家重点实验室”从事博士后研究工作,2006~2008年于美国CWRU大学电子工程系从事博士后研究工作,主要从事微系统技术与微型仪器、生物医学检测技术、精密测试技术及仪器等领域的研究。E-mail: dchli@tju.edu.cn



李国卿(1988—),男,天津人,硕士研究生,2011年于天津大学获得学士学位,主要从事血液与组织液的生理延迟模型在血糖连续监测中的应用研究。E-mail: liguoqing@tju.edu.cn



张晶鑫(1986—),女,河北张家口人,硕士研究生,2010年于天津大学获得硕士学位,主要从事微创血糖表面等离子共振葡萄糖检测研究。E-mail: herbs@126.com



于海霞(1980—),女,河北唐山人,博士,2007年、2011年于天津大学分别获得硕士、博士学位,目前在天津大学精密仪器与光电子工程学院进行博士后研究工作,主要从事微创血糖监测方法的研究。E-mail: jyyhx2000@163.com



徐可欣(1956—),男,安徽颖上人,博士,教授,博士生导师,1985年、1988年于天津大学分别获得硕士、博士学位,主要从事采用光谱方法进行人体微弱成分无创伤检测方法的研究、生物光学及微弱化学成分智能化检测方法的研究。E-mail: kexin@tju.edu.cn

(版权所有 未经许可 不得转载)