

文章编号: 0258-7025(2006)Supplement-0382-03

# 基于荧光编码的悬浮阵列二维微流场检测

张 玺, 孙 斌, 王小兵, 曹海源, 万 强, 韦尚方

(武汉军械士官学校光电技术研究所, 湖北 武汉 430075)

**摘要** 研究了一种悬浮阵列的二维微流场检测技术。用激光烧蚀法、光刻和蚀刻法制备专门设计的微流器件, 采用连续激光激发流过检测区域的微球探针上的荧光, 高灵敏度冷却 CCD 成像探测技术来实现悬浮阵列的二维微流场并行检测分析。这种检测方法具有快速、准确、灵敏度高的优点。通过实验验证了此方法的可行性。

**关键词** 测量; 荧光编码; 悬浮阵列; 二维微流场

**中图分类号** TH79 **文献标识码** A

## Two-Dimensional Micro-Fluidic Detection Technique of Suspension Array Based on Fluorescence Encoding

ZHANG Xi, SUN Bin, WANG Xiao-bing, CAO Hai-yuan, WAN Qiang, WEI Shang-fang  
(*Opto-Electronics Facility, Wuhan Ordnance Noncommissioned Officers School, Wuhan, Hubei 430075, China*)

**Abstract** A two-dimensional micro-fluidic detection technique was studied. Micro-fluidic device designed distinguishingly was fabricated through methods of laser ablation, laser lithography and chemical etching. Continuous laser is used to excite fluorescence from the microprobes passing the detection area and molecules reaction information of suspension array is obtained by using highly sensitive cooling CCD freezing imaging technology. Two-dimensional micro-fluidic detection technique of suspension array, with high sensitivity and speediness and nicety, was validated by experiment.

**Key words** measurement; fluorescence encoding; suspension array; two-dimensional micro-fluidic

### 1 引 言

生物芯片技术是 20 世纪 90 年代中期发展起来的一项尖端技术<sup>[1]</sup>。固态平面微阵列是以玻片、硅为载体, 在单位面积上高密度地排列大量的生物材料点阵, 点阵与标记的样品分子进行杂交后, 检测杂交信号, 进而获取样品分子的数量和序列等信息, 从而达到一次试验同时检测多种疾病或分析多种生物样品的目的。这种固态平面微阵列制作工艺复杂、成本昂贵, 不宜根据每个不同检测对象制作不同的平面微阵列。另外点阵不易制作均匀、杂交反应亲和力较弱, 并需小心冲洗, 这对芯片的检测带来很大的不便, 限制了它的发展与应用<sup>[2,3]</sup>。

相对于固态平面微阵列, 悬浮阵列技术的检测载体为不同规格的微球, 利用许多不同的微球作为主要基质, 把不同的探针分子固定在微球上, 然后将这些微球探针悬浮在用来检测的液相体系中<sup>[4]</sup>。通

过两束激光同时对逐一通过检测流场的微球探针上的分类荧光和报告分子上的标记荧光进行检测, 以获得被固定的待测分子的种类和数量信息<sup>[5]</sup>。悬浮阵列技术的优点是: 可根据每个检测对象的需要随时进行有目的的配置(微球、生物探针), 而不是固定的平面微阵列, 这将大大降低成本; 悬浮阵列也不存在冲洗问题, 易于信号检测, 而且液相环境更有利于保持蛋白分子的天然构像, 也更有利于探针和被检测物的反应。悬浮阵列技术将获得更好的发展与应用<sup>[6]</sup>。

### 2 流式细胞仪法检测原理

悬浮阵列的传统检测方法是利用流式细胞仪作为检测平台, 不同基质的单排微球作为检测载体来获取生物信息的。如图 1 所示, 将待测分子和固定有探针分子的微球杂交后制成待测悬浮试液, 用一

作者简介: 张 玺(1974—), 男, 江苏启东人, 武汉军械士官学校光电技术研究所讲师, 硕士, 主要从事光学检测及激光技术方面的研究与教学工作。E-mail: zhangxiluye@163.com

定的压力将待测试液从喷嘴喷出,由于鞘液的作用,微球在检测区域呈单排分布,依次流过检测区域。利用激光作为激发光,两种不同波长的激光同时对微球探针上的红色分类荧光和报告分子上的绿色标记荧光进行检测。红色激光激发微球探针上的红色分类荧光,根据分类荧光信号的不同,可将微球探针进行分类,从而将各个不同的分子反应区分开来。绿色激光激发的是绿色标记荧光,目的是确定微球探针上结合的标记荧光数量,从而确定微球探针上结合的待测分子的数量。因此,通过红绿双色激光的同时检测,可以确定被结合的待测分子的种类和数量。采用这种检测技术,每秒钟可以检测几十个至上百个微球探针,通过检测微球探针的前向散射光和侧向散射光来判断微球探针是否粘连,获得微球探针的尺寸。前向散射光多采用 APD 作为探测器,侧向散射光和荧光采用 PMT 作为探测器。由于采取串行检测,检测速度慢,APD 与 PMT 均需要设计复杂的光学系统,并需要设计高压偏置及低噪声放大电路,使得整个检测系统复杂,成本高。

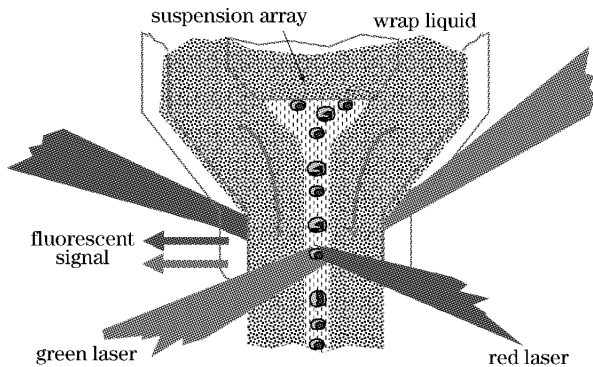


图 1 检测原理

Fig.1 Detection principle

### 3 检测技术改进方案

为了实现多微球探针二维并行进样检测,提高检测速度,设计了一种新型的悬浮阵列检测装置,图 2 为原理图。

本方案采用一个宽通道二维微流场系统,流场的通道呈扁平状,通道的截面是一个宽度和深度比很大的矩形,其中微流场由精确的推射装置形成,见示意图 3。

线性电机控制着特殊的推进装置,使悬浮着的用不同分类荧光标定的微球探针的待测试液匀速流过流场通道。分别用经扩束镜  $L_1$  扩束的波长为 532 nm 和 635 nm 的均匀脉冲激光宽光束照射在流

场的检测区域上,即悬浮阵列的待测试液。

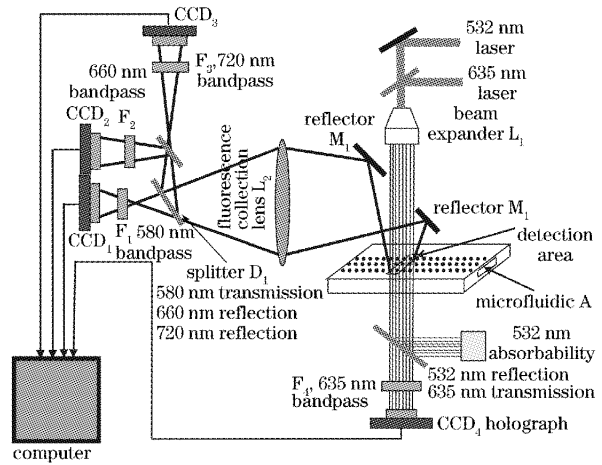


图 2 检测方案原理图

Fig.2 Configuration of detection system

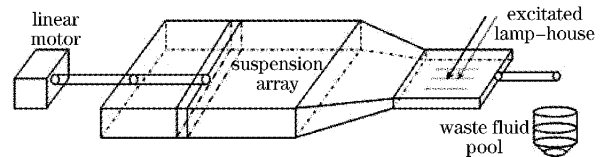


图 3 微流场系统示意图

Fig.3 Micro-fluidic device

悬浮在待测试液中的微球探针被掺入了两种比例不同的红色分类标记荧光,两种荧光的发射波长分别为 660 nm 和 720 nm,每种荧光浓度又分为 10 个等级,一共有  $10^2$  种分类(微球探针地址)。用波长为 580 nm 的绿色荧光来标记报告分子。三种波长的激光激发荧光被反射镜  $M_1$  反射,聚光镜  $L_2$  将其收集会聚,然后被分光镜  $D_1$  分开,波长为 580 nm 的荧光通过带通滤色片  $F_1$  后被  $CCD_1$  收集。再使用分光镜  $D_2$  将波长为 660 nm 和 720 nm 的荧光进一步分开,波长为 660 nm 的荧光通过带通滤色片  $F_2$  后被  $CCD_2$  收集,波长为 720 nm 的荧光通过带通滤色片  $F_3$  后被  $CCD_3$  收集。 $CCD_1$  获得的图像可得出报告分子的绿色标记荧光强度分布; $CCD_2$  和  $CCD_3$  获得的图像可得出微球探针的红色分类荧光信息,进而对微球探针进行分类,即对应微球探针地址; $CCD_4$  获得的图像为全息干涉条纹,并将数据送到计算机进行全息干涉图像的数字重建,然后根据重建的全息图像获得待测试液中微球探针的三维位置和尺寸数据,进而判断微球探针的粘连情况。全息干涉条纹是通过 635 nm 激光的微球探针前向散射光和通过微球探针间隙的直射光干涉产生的。根据这 4 个 CCD 获得的图像,再进行计算分析,可获得

被检测的悬浮阵列所需要的全部信息。

用图 2 所示的实验装置,每个 CCD 都对荧光信号的收集进行了验证实验,如图 4,说明用此方法来检测悬浮阵列是切实可行的。

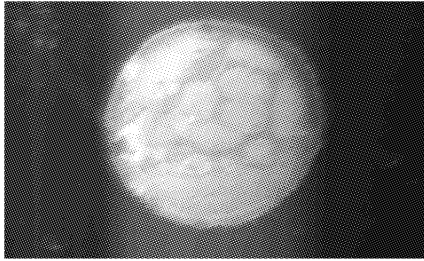


图 4 微球单元荧光图像

Fig. 4 Fluorescent image for micro-sphere probe unit

## 4 分 析

本检测方案充分利用了高灵敏度的 CCD 进行荧光探测,减去了 PMT 及其高压电源、低噪声放大电路,而且 CCD 的读出电路都集成在单片芯片上,使得本测试技术在保证灵敏度的情况下设计简便。方便地利用计算机强大的计算功能,对测量数据进行软件处理,整个检测系统的设计方便灵活,因为很多功能可采用软件算法实现,因而对检测系统硬件的要求降低,升级更容易;并且采用多排微球并行检测的方法,大大加快了检测速度,提高了检测效率。

采用此宽通道多排微球探针并行检测的方法,对微流场系统的设计提出了较高的要求。微流场系统是整个悬浮阵列技术中的检测平台。带有荧光信息的微球悬浮在液体中,液体从专门制备的微流器件中流过,微流器件的形状和尺寸参量都需专门设计,通过对液体流速的控制,用专门设计的扫读装置把所有悬浮在液体中的待测微球的荧光信号记录下来,然后再通过计算机进行分析处理,从而获得所需要的生物信息,实现生物信息的多排微球探针并行检测。由于整个微流场系统的性能将直接影响检测结果,因此需要根据宽通道多排微球探针并行检测方案,设计连续、均匀、平稳的微流场系统。该系统需要达到如下要求:为确保每个微球通过流场时只被 CCD 记录一次信息,要求微流场无回流;为

保证每个带荧光信息的微球都被检测到,要求流场连续、均匀、平稳;为了使微球的速度与 CCD 的拍摄速度相匹配,要求对流场的流速进行精确控制。

微流器件是悬浮体系的承载体,选择合适的材料,并根据微球体和悬浮液的特点,对微流器件的形状和尺寸参量进行设计,以满足整个系统的检测要求。分析微球探针在本系统设计的微流场中的行为与特性,并且根据分析结果来优化设计微流器件。液流的推进装置也非常重要,根据检测时扫读装置的特点,设计与之相匹配的液流推进控制装置。

## 5 结 论

研究了悬浮阵列的一种新型流场宽通道快速测试分析技术,整个系统由高能量、宽光束、大口径、均匀分布的脉冲激光输出控制系统,高灵敏度、低噪声的 CCD 荧光探测系统,连续、均匀、平稳的流场系统,微球探针的荧光图像计算机分析处理系统组成。本技术用 CCD 凝结成像技术与数字全息技术相结合的方法,将悬浮阵列的检测分析时间大大缩短,提高了效率。使得悬浮阵列继承了固态平面微阵列具有的高通量、快速的优点,同时克服了固态平面微阵列技术缺点。悬浮阵列技术必将在临床诊断、基因研究、新药开发、物种改良等领域推广应用,发展前景广阔。

## 参 考 文 献

- 1 D. J. Lockhart, H. Dong, M. C. Byrne *et al.*. Expression monitoring by hybridization to high-density oligonucleotide arrays [J]. *Nat. Biotechnol.*, 1996, **14**(13): 1675~1680
- 2 M. Schena, R. A. Heller, T. P. Theriault *et al.*. Microarrays: biotechnology's discovery platform for functional genomics [J]. *Trends Biotechnol.*, 1998, **16**(7): 301~306
- 3 D. Shalon, S. J. Smith, P. O. Brown. A DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization [J]. *Genome Research*, 1996, **6**(7): 639~645
- 4 A. Sprio, M. Lowe, D. Brown. A bead-based method for multiplexed identification and quantitation of DNA sequences using flow cytometry [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 2000, **66**(10): 4256~4265
- 5 Li Yang, D. K. Tran, X. Wang. Badge, beads array for the detection of gene expression, a high-throughput diagnostic bioassay [J]. *Genome Research*, 2001, **11**(11): 1888~1898
- 6 J. Nolan, L. Sklar. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm [J]. *Trends in Biotechnology*, 2002, **20**(1): 9~20