

# 多功能时间分辨仪和苯丙酮尿症荧光仪 一体化设计

郭 龙

(成都理工大学地球物理学院, 四川 成都 610059)

**摘要** 新生儿疾病筛查中需要使用荧光分析和时间分辨荧光免疫分析技术,而国内尚无集成两种测量手段的仪器。研发了一套可同时进行两种测量的透镜-光纤结合型多功能时间分辨仪。根据美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)文件以及相关文献,将研制的荧光仪和在国内各大医院已获广泛应用的标准仪器(雷勃仪器, THERMO Varioskan Flash 全波长多功能酶标仪;芬兰 PekinElmer Wallac1420 多标记免疫分析仪)相比较,对所研发的仪器进行了全面评价。结果表明仪器的各项指标均符合要求,可考虑投入实际生产。

**关键词** 测量;医用光学;光学设计;一体化仪器设计;仪器检测

**中图分类号** TH741 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/LOP50.051203

## Integrated Design of Multifunction TRFIA and Phenylketonuria Fluorometer

Guo Long

(College of Geophysics, Chengdu University of Technology, Chengdu, Sichuan 610059, China)

**Abstract** Fluorescence analysis and time-resolved fluorescence immunoassay (TRFIA) are often used in screening of new born babies' disease, while there is no domestic instrument having a collection of two measurements. A multi-function time-resolved instrument is developed to integrate two measurements, which is a lens-optical fiber combined instrument. According to the US. Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) documents and related literatures, the instrument is tested. It is compared with THERMO Varioskan Flash and PekinElmer Wallac 1420, which are used widely by major hospitals in China. The results show that the specification of the instrument are in line with requirements, and it could be put into practical production.

**Key words** measurement; medical optics; optical design; integrated instrument design; testing of instrument

**OCIS codes** 120.4570; 120.4820; 170.3890

## 1 引 言

苯丙酮尿症(PKU)是一种由于人体正常染色体缺陷所造成的新生儿体内苯丙氨酸(Phe)代谢紊乱性疾病,可导致婴儿不可逆的智力障碍。但是若能及时确诊,就可以采取手段防止智力发育障碍的出现。故对新生儿进行 PKU 筛查,对提高我国人口素质具有重大的意义<sup>[1]</sup>。目前检测苯丙氨酸的常用方法包括细菌抑制法、荧光法和高效液相色谱法(HPLC)等<sup>[2]</sup>。其中,荧光法具有操作简单、方法快捷等优点<sup>[3,4]</sup>。而在产筛中,时间分辨荧光免疫分析技术(TRFIA)<sup>[5]</sup>则在精度上具有无可争议的优势。通过这两种方法,我们可以实现大部分的产筛和新筛疾病检测。现在国内医院使用的基本为雷勃仪器和芬兰 Wallac 分析仪,国内尚无实用的商业化产品。本文研发了一套光路检测系统,构建了集时间分辨荧光免疫分析法和荧光分析法于一体的多功能时间分辨免疫分析体外诊断仪,特别适合用于新生儿产前筛查和新生儿筛查。

**收稿日期**: 2012-12-18; **收到修改稿日期**: 2013-02-04; **网络出版日期**: 2012-04-12

**作者简介**: 郭 龙(1985—),男,硕士,助教,主要从事光学仪器研制和光电图像相关等方面的研究。

E-mail: qinglong@mail.nankai.edu.cn

## 2 荧光测量技术和时间分辨测量技术

PKU 测量技术是荧光分析法的一种具体运用,其以血液样品中的苯丙氨酸作为检验指标。采用茚三酮标记,利用 390 nm 波长的紫外(UV)光激发。在低浓度下,荧光复合物产生的荧光强度和苯丙氨酸浓度成正比,通过测量激发产生的 486 nm 荧光光强,可间接得到待测血液中的 Phe 浓度。TRFIA 则利用了具有独特荧光特性的镧系元素及其螯合物为示踪物,利用 340 nm 波长的紫外光激发。镧系元素的荧光特点是激发光与发射光之间的 Stokes 位移大,可达 290 nm,因而可方便地将激发光和发射光(波长为 613 nm)分隔开来;镧系离子螯合物的荧光衰变时间极长,是传统荧光的  $10^3 \sim 10^6$  倍,从而在测量时可采用“时间门”技术,测量光源脉冲后的荧光,通过时间延迟将背景荧光分辨开(故称为时间分辨),达到极高的测量精度<sup>[6]</sup>。

## 3 多功能时间分辨仪的设计

### 3.1 多功能时间分辨仪总体测量系统

因 PKU 和 TRFIA 发射荧光强度峰值的波长分别为 486 nm 和 613 nm,其峰值间隔较小,故可考虑采用同一个光电倍增管(PMT)作为接收器。而对于 TRFIA 光源,为实现时间门,必须采用高频闪烁光源,不能仅通过连续谱光源分光的方法实现两个波长。故在光路中应有两个光源(分别为卤素灯和氙灯),一个接收器(PMT),光路摆放为“十字形”。因测量皿为标准的医用 96 孔板,故只能采用“竖十字”的方法设计。具体光路如图 1 所示。

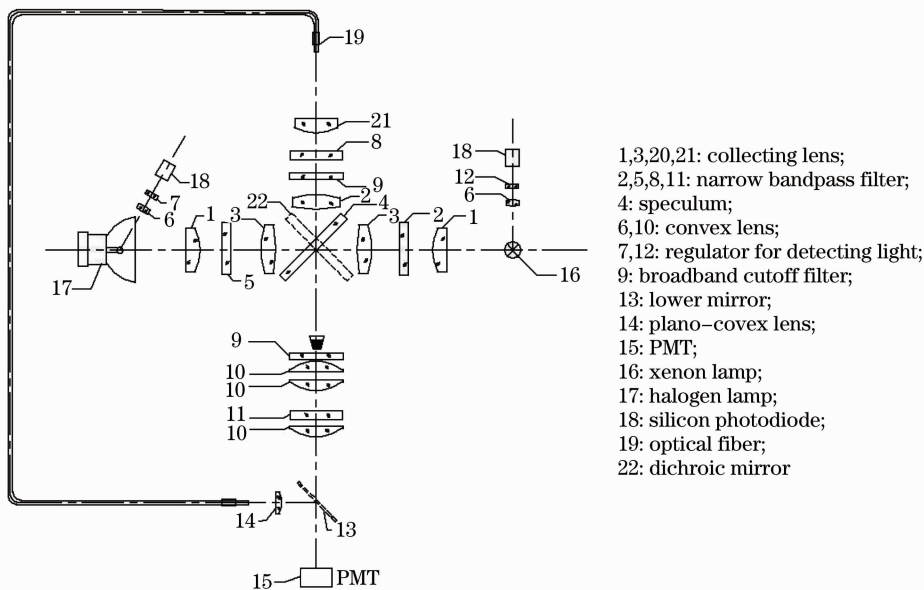


图 1 多功能时间分辨仪光路设计图

Fig. 1 Optical design of the multifunctional TRFIA

对于“激发-接收”的光学系统,一般有“顶部激发-顶部接收”、“顶部激发-底部接收”和“顶部激发-侧面接收”三种方式。因为采用的是“竖十字”的设计,同时 PKU 溶液在可见光波段是不透明的,只能采用“顶部激发-顶部接收”的工作方式,故对于 PKU 测量系统,左部的光源(卤素灯)所发出的激发光通过二向分色镜反射到下部的测量皿中,激发的荧光通过二向分色镜透射到上部,由透镜组聚光后通过光纤导入到下部反射镜 13,由 PMT 接收。如此亦可通过空间结构较好地排除光源的本底影响。对于 TRFIA 测量系统,右部的光源(氙灯)所发出激发光通过反射镜 4 反射到下部的测量皿中,此时下部反射镜移开,激发的荧光由 PMT 直接接收。其本质为“顶部激发-底部接收”,从空间结构上无法排除光源的本底影响,但通过时间分辨技术(特殊的“时间门”方法),可以从时间上将其和荧光分离开来,得到极高的精度。

### 3.2 反馈系统和光路切换

在图 1 中,光源发出的光通过凸透镜 6 聚光和卤素灯、氙灯的检测光调节器(7,12)的衰减,最终照射到

硅光二极管上。通过电子电路的负反馈,对光源强度波动予以自动校正,增强了测量的稳定性。TRFIA 和 PKU 的切换是通过反射镜 4 和二向分色镜 22 的平移实现的,其实际工件图如图 2 所示。当使用二向分色镜时,下部反射镜 13 用于反射光路,同时隔离透射的光源本底,进行 PKU 测量;进行 TRFIA 测量时,步进电机移动工件,使反射镜处于光路,同时下部反射镜 13 联动移开,激发荧光从测量皿透射到 PMT。

### 3.3 光源和 PMT 的选择

对于 PKU,样品的吸收波长为 390 nm,故相应的光源采用碘钨灯。碘钨灯为热致发光,光源稳定性较好,测量中强度不容易产生波动,其连续光谱在 390 nm 附近具有较强的辐射。对于 TRFIA,因时间分辨技术的特殊要求,光源选择高频脉冲氙灯<sup>[7,8]</sup>,通过电子控制系统,使得其发光频率为 1000 Hz,脉宽约为 100  $\mu$ s。在 1 ms 的测量周期中,仅对 400  $\mu$ s 以后的荧光进行测量,从而将光源本底和激发荧光完全分隔开来。

探测器采用高灵敏度的 PMT,其接收光信号转换为电信号,通过信号放大电路放大,用积分器进行累加,经模/数(A/D)转换,送至微处理器进行处理,再将数据送至计算机软件系统进行分析处理,最终得出样品的浓度值。对于 PMT,其特性主要有光谱响应、光照灵敏度、电流放大(增益)、阳极暗电流、磁场影响、温度特点和滞后特性<sup>[9~12]</sup>。根据仪器的具体特点,采用的 PMT 应具有灵敏度高、稳定性好、暗电流小、滞后时间短、量子效率高和噪声低等特性。实际选用的 PMT,其光谱响应范围是 300~890 nm,波长 486 nm 处的转换效率约为 53%,波长 613 nm 处的转换效率约为 25%。

### 3.4 其它元件的选择

在 PKU 测量光路中,聚光镜 1,3 形成一个倒像透镜组,用于将卤素灯灯丝像耦合到测量皿中;两个聚光镜之间为扩束光,可以安放激发光窄带滤光片 5,其中心透过波长  $\lambda_0 = 391.5$  nm,带宽  $\Delta\lambda \approx 13.1$  nm,中心波长处的透射率  $T = 67.3\%$ 。二向分色镜要求对 390 nm 的反射率  $R \geq 95\%$ ,对 486 nm 光的透射率  $T \geq 95\%$ 。聚光镜 20,21 的作用是将样品的激发荧光耦合到光纤中,故其数值孔径应和光纤束数值孔径相匹配<sup>[13]</sup>。滤光片 8,9 分别位于透镜组 20,21 之间的扩束光中。宽带截止滤光片 9 的截止区为 200~400 nm,截止深度小于 0.00001%;透射区波长为 410~700 nm,于  $486 \pm 10$  nm,  $613 \pm 10$  nm 处透射率  $T \geq 90\%$ 。窄带滤光片 8 的中心透过波长  $\lambda_0 = 486.1$  nm,带宽  $\Delta\lambda \approx 10.2$  nm,中心波长处的透射率  $T = 63.1\%$ 。光纤为多丝玻璃纤维,每一根光纤束由一定数量的光学纤维丝组成,光纤束数值孔径  $NA \geq 0.2$ ,束径  $\Phi \geq 2$  mm,光纤束的传光效率  $\eta \geq 80\%$ ,其选用的玻璃材质也可对 390 nm 的本底光起到抑制作用。平凸透镜 14 用于将光纤的光耦合进 PMT,故其光斑大小应小于 PMT 的接受端面积。

在 TRFIA 测量光路中,聚光镜 1,3 中窄带滤光片 2 的中心透过波长  $\lambda_0 = 341.3$  nm,带宽  $\Delta\lambda \approx 11.2$  nm,中心波长处的透射率  $T = 65.9\%$ 。反射镜 4 要求反射率  $R \geq 95\%$ 。窄带滤光片 11 的中心透过波长  $\lambda_0 = 611.8$  nm,带宽  $\Delta\lambda \approx 14.6$  nm,中心波长处的透射率  $T = 85.3\%$ 。凸透镜 10 构成的透镜组用于将测量皿成像于 PMT 接收端。

## 4 测量检验

### 4.1 重复性检验

将医院常用的进口标准仪器(PKU 采用 THERMO Varioskan Flash, TRFIA 采用 Perkin-Elmer Wallac1420)作为对照组,和研制的仪器同时对同一浓度做 4 次测量,其结果见表 1 和表 2。表中 STD, Mean 和 CV 分别表示标准差,平均值,相对偏差(标准差和平均值的比值)。

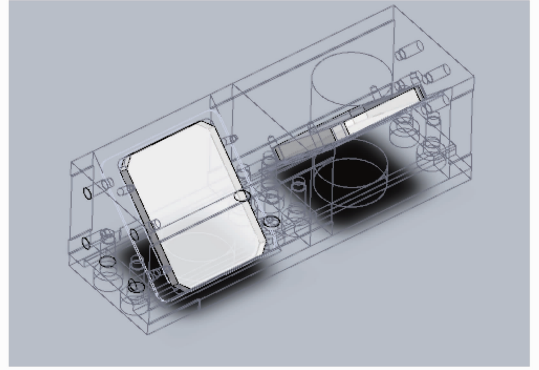


图 2 反射镜和二向分色镜的三维工件图

Fig. 2 Three-dimensional part drawing of speculum and dichroic mirror

表 1 PKU 重复性测量  
Table 1 Repeatability measurement of PKU

Concentration / (mg/dL)	Control group						Measurement group					
	0	0.001	0.1	1	10	15	0	0.001	0.1	1	10	15
1	243	568	938	8789	36803	51846	181	356	672	7745	90340	149136
2	275	568	875	7898	34376	47628	181	361	648	7704	89734	145508
3	262	576	892	8247	35706	49521	181	352	682	7810	87315	151409
4	271	536	913	8521	35102	50128	181	344	633	7605	90920	149112
STD	18.87	17.74	27.20	381.28	1026.64	1740.46	0	7.18	22.32	85.91	1583.99	2439.54
Mean	262.75	562	904.5	8363.75	35496.75	49780.75	181	353.25	658.75	7716	89577.25	148791.3
CV / %	5.4	3.2	3.0	4.6	2.9	3.5	0	2.0	3.4	1.1	1.8	1.6

表 2 TRFIA 重复性测量  
Table 2 Repeatability measurement of TRFIA

Concentration / (U/mL)	Control group						Measurement group					
	0	1.03	11.31	30.61	194	431	0	1.03	11.31	30.61	194	431
1	1542	22168	247952	651402	1836557	3927470	4057	31749	342480	882769	2488256	5356679
2	1522	22256	247063	647853	1833947	3939235	4051	31801	339360	883516	2507944	5367378
3	1544	22311	247850	648793	1834879	3929754	4059	32080	340231	879036	2497355	5384631
4	1531	22202	247232	650180	1835362	3931852	4038	31620	341209	885217	2518471	5346218
STD	10.24	62.69	442.43	1557.72	1086.27	5096.02	9.46	193.88	1339.83	2608.55	13077.29	16396.61
Mean	1534.75	22234.25	247524.3	649557	1835186	3932078	4051.25	31812.5	340820	882634.5	2503007	5363727
CV / %	0.67	0.28	0.18	0.24	0.06	0.13	0.23	0.61	0.39	0.30	0.52	0.31

因测量仪器和对照仪器所采用的光源强度、光电倍增管型号以及相应的电子系统各不相同,故对于同一样品,各自的 PMT 值相差很大,仅能通过 CV 值的比较来分析仪器的性能。在 PKU 测量方法的检验中,对覆盖仪器测量线性范围的 6 个样品值的测量结果进行数据处理。相较于对照组,测量组所得到的 CV 值仅有一个大于对照组 0.4%,其余均远小于对照组。可见仪器在 PKU 测量部分重复性很好,此项指标上已超过了对照仪器,达到国际先进水平。对于 TRFIA 的检验,6 个样本中除第一个外,均大于对照组的 CV 值,但相差均不是很大,且其值均为小数点后 3 位,较之 PKU 低了一个数量级。可见其重复性很好,但较之国外先进仪器还有一定差距。因为 PMT 采用了积分器进行累加采集数据方式,可有效抑制 PMT 白噪音的影响,但是对环境温度变化影响的抑制则较差。而由于碘钨灯的热致发光机理,使得碘钨灯的开启会对仪器内部温度变化产生影响,因此,对于仪器的进一步改进,需要对碘钨灯灯室采用更好的隔热材料,同时在成本可控的范围内,考虑引入温度的负反馈系统,使得测量部位达到恒温条件,排除环境温度和仪器散热的影响。

#### 4.2 线性检验和方法学对比

在实际医院测量中,需按照国家标准,采用工作曲线法<sup>[14]</sup>进行定量测量。由其测量原理可知,该方法对仪器线性要求极高( $r \geq 99\%$ )。故将溶液浓度设为自变量,PMT 值平均值为因变量进行线性拟合,拟合式为  $Y = bX + a$ 。a、b 和线性系数 r 的结果如表 3 所示。

表 3 线性测量结果  
Table 3 Results of linearity measurement

	PKU		TRFIA	
	Control group	Measurement group	Control group	Measurement group
a	1659.98	-959.17	129097.95	176909.07
b	3272.31	9694.36	8853.24	12073.65
r	99.6%	99.8%	99.6%	99.6%

对比 r 值可见,相对于对照仪器,测量仪器在线性方面与其相差无几,甚至在 PKU 测量上还优于对照仪器,完全能达到线性要求。

在方法学对比中,将对照组测得的 PMT 值为自变量,以测量组测得的 PMT 值为因变量,进行线性拟合,得到  $Y_{\text{measure}} = bX_{\text{control}} + a$  和 r 值<sup>[15]</sup>。其 r 值表征了测量仪器和标准仪器的相关性,r 值越大,相关性越

高,测量仪器性能越接近标准仪器。可得 PKU 和 TRFIA 的  $r$  值分别为 99.2% 和 99.9%,参考美国临床实验室标准化委员会(NCCLS)EP15-A 文件<sup>[16]</sup>, $r > 97.5\%$  即可。可见仪器完全满足方法学对比要求。

## 5 结 论

在对 PKU 荧光仪和 TRFIA 荧光仪的充分了解以后,设计了一种新型的多功能时间分辨仪,并给出了相应器件的挑选标准以及相关电子电路设计思想,从而在一台仪器上实现了 PKU 和 TRFIA 两种测量方式,填补了国内空白。根据 NCCLS 文件以及相关文献,分别对仪器的重复性、线性和方法学对比性进行了检验。结果显示该仪器 PKU 测量在重复性和线性指标方面优于对照仪器,而 TRFIA 测量的重复性方面较之国际先进水平还有一定差距,但已经能够达到设计要求。可考虑投入实际生产,同时下一步仪器改进时应在 TRFIA 测量的重复性上多加钻研,初步考虑从控制温度波动入手。

## 参 考 文 献

- 1 G. Xueyuan. The status and prospects of newborn screening[J]. *Guangdong Medical Journal*, 2000, **21**(7): 533~534  
顾尧苑. 新生儿筛查现状和展望[J]. 广东医学, 2000, **21**(7): 533~534
- 2 R. Fingerhut, M. Sten, A. Kohlschütter. Comparison of four different phenylalanine determination methods[J]. *Clinica Chimica Acta*, 1997, **264**(1): 65~73
- 3 Sidney Golden. Temporally quantized theory of damped multimodulated fluorescence[J]. *Physica A*, 1997, **246**(1-2): 172~186
- 4 Guo Yaojun. Spectrophotometry and Its Application in Biochemistry[M]. Beijing: Science Press, 1987. 50~75  
郭尧君. 分光光度技术及其在生物化学中的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1987. 50~75
- 5 Tian Zhen. The Research of Time-Resolved Fluorescence Immunoassay and Tester[D]. Guangzhou: South China Normal University, 2003. 1~4  
田 振. 时间分辨荧光免疫分析技术及测试仪的研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2003. 1~4
- 6 Han Caiqin, Duan Peitong, Liu Ying *et al.*. Fluorescent emission of erythrocyte suspension with time-resolved fluorescence spectrometer[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, **32**(4): 0430005  
韩彩芹, 段培同, 刘 莹 等. 用时间分辨光谱研究红细胞悬液的荧光发射[J]. 光学学报, 2012, **32**(4): 0430005
- 7 Tian Zhen, Guo Zhouyi. A pulsed light emitter for time resolved fluorometer[J]. *J. Optoelectronics • Laser*, 2002, **13**(11): 1198~1201  
田 振, 郭周义. 适用于时间分辨荧光免疫分析仪的激发光系统[J]. 光电子·激光, 2002, **13**(11): 1198~1201
- 8 Ren Lanxu, Wei Xiudong, Niu Wenda *et al.*. A high flux solar simulator based on an array of non-coaxial ellipsoidal reflector[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, **32**(10): 1022002  
任兰旭, 魏秀东, 牛文达 等. 非共轴椭球面聚光阵列式高焦比太阳模拟器[J]. 光学学报, 2012, **32**(10): 1022002
- 9 Wu Xingjian, Wu Jinhong. Principle, characteristics and application of photoelectric magnification tube[J]. *International Electronic Elements*, 2001, (8): 13~17  
武兴建, 吴金宏. 光电倍增管原理、特性与应用[J]. 国外电子元器件, 2001, (8): 13~17
- 10 Guo Congliang, Sun Jinjun, Fang Rongchuan *et al.*. Noise analysis and model building of PMT[J]. *J. Optical Technology*, 2003, **29**(5): 637~640  
郭丛良, 孙金军, 方容川 等. 光电倍增管的噪声分析和建模[J]. 光学技术, 2003, **29**(5): 637~640
- 11 Zhang Yunbo, Zheng Jihong, Jiang Yanmeng *et al.*. Near UV-band frequency division multiplexing detecting technique with fluorescence microscopy[J]. *Acta Optica Sinica*, 2011, **31**(6): 0618002  
张运波, 郑继红, 蒋妍梦 等. 近紫外波段频分复用荧光显微探测技术研究[J]. 光学学报, 2011, **31**(6): 0618002
- 12 Zhao Ming, Xiao Shali, Wang Xi *et al.*. Ultraviolet communication system based on deep LED[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2010, **47**(4): 040602  
赵 明, 肖沙里, 王 玺 等. 基于 LED 的紫外光通信系统研究[J]. 激光与光电子学进展, 2010, **47**(4): 040602
- 13 Lei Pingshun, Xue Lifang, He Jun *et al.*. Design of multi-mode fiber collimator with ZEMAX[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2011, **48**(1): 010605  
雷平顺, 薛力芳, 何 军 等. ZEMAX 在多模光纤准直器设计中的应用[J]. 激光与光电子学进展, 2011, **48**(1): 010605
- 14 中华人民共和国卫生部. 新生儿疾病筛查技术规范(2010年版)[S]. 2010
- 15 Tan Yuhua, Liu Haiping, Zhang Zhengwu *et al.*. Quantitative determination system for neonatal phenylalanine[J]. *J. Modern Laboratory Medicine*, 2010, **25**(2): 66~68  
谭玉华, 刘海平, 张正武 等. 自建新生儿苯丙氨酸荧光定量检测系统的应用评价[J]. 现代检验医学杂志, 2010, **25**(2): 66~68
- 16 NCCLS. User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy[S]. NCCLS EP15-A, 2001