

用于离心式微流控生化分析芯片的光探测系统

王宇^{1,2} 郝鹏¹ 武俊峰¹ 徐阳^{1,2} 邓永波¹ 吴一辉¹

¹中国科学院长春光学精密机械与物理研究所应用光学国家重点实验室, 吉林 长春 130033

²中国科学院大学, 北京 100049

摘要 针对离心式微流控生化分析芯片的结构特点,设计了一种基于吸光度检测技术的光探测系统。通过双波长检测方法降低了闪烁氙灯光强输出稳定性差对吸光度检测结果的影响,采用同步触发的定位方式实现了检测过程中芯片的精确定位,并分析了进样误差对吸光度检测结果的影响。实验结果显示,采用双波长检测方法时系统吸光度重复性为0.0994% CV(变异系数);同步触发定位误差极小,在该种定位方式下的吸光度重复性为0.1429% CV;样品与试剂的进样重复性小于2% CV,满足国家标准。该系统结构简单,易于集成,检测结果稳定可靠,在医学临床诊断领域具有重要的实用价值。

关键词 生物光学;光探测系统;吸光度检测;定位误差;进样误差;微流控芯片

中图分类号 O436 文献标识码 A

doi: 10.3788/LOP52.121701

Optical Detection System of Centrifugal Microfluidic Chip for Biochemical Analysis

Wang Yu^{1,2} Hao Peng¹ Wu Junfeng¹ Xu Yang^{1,2} Deng Yongbo¹ Wu Yihui¹

¹State Key Laboratory of Applied Optics, Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, Changchun, Jilin 130033, China

²University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract Taking advantage of the centrifugal microfluidic chip for biochemical analysis, an optical detection system based on absorbance detection technology is designed. The effect of the poor light output stability of xenon flash lamp on test results is reduced by dual wavelength detection. The chip is located precisely by synchronous trigger positioning in the detection process. The effect of sampling error on the test results is also analyzed. The test results show that the absorbance repeatability of the system is 0.0994% by dual wavelength detection; the locating error is extremely small, it is 0.1429% by synchronous trigger positioning; and the sampling error is lower than 2%, which meets the requirements of national standards. The system has the advantages of simple structure, easy integration, and stable and reliable test results, it is promising in medical diagnosis.

Key words biotechnology; optical detection system; absorbance detection; locating error; sampling error; microfluidic chip

OCIS codes 170.3890; 120.1880; 120.3890

1 引言

微流控芯片实验室又称为微流控芯片或芯片实验室,是将化学和生物等领域中所涉及的样品制备、反应、分离、检测等基本操作单元集成在一块几平方厘米(甚至更小)的芯片上,用以取代常规化学或生物实验室各种功能的一种技术平台^[1],具有体积小、集成度高、分析速度快、消耗试剂少等优点^[2-3]。而以离心力为驱动力对微量液体进行操作和控制的离心式微流控芯片,克服了微泵驱动难以集成的缺点,单一电机即可驱动数十至数

收稿日期: 2015-07-07; 收到修改稿日期: 2015-08-01; 网络出版日期: 2015-11-20

基金项目: 国家 863 计划(2015AA042402)、国家自然科学基金(51205381)、吉林省双十工程重大科技攻关项目(201402011GX)、吉林省科技发展计划(20140101057JC, 20130522185JH)、中国科学院科研装备研制项目(yz201353)

作者简介: 王宇(1991—),男,硕士研究生,主要从事微流控芯片检测技术方面的研究。E-mail: wangyu1514@163.com

导师简介: 吴一辉(1965—),女,研究员,博士生导师,主要从事微光机电系统方面的研究。

E-mail: yihuiwu@ciomp.ac.cn(通信联系人)

百个独立结构单元,具有设备简单、流速稳定易调的特点,非常有利于微流控芯片的高通量化^[4]。目前,该种芯片已在血清分离、DNA提取^[6]、蛋白质和核酸分析^[6]、临床小分子分析^[7]以及多种离子检测^[8-9]领域实现了应用。

光探测系统用来测定样品经芯片处理后相关成分的组成及含量,是准确获取微流控生化芯片检测结果的重要保障。根据检测方式不同,微流控芯片检测装置一般可以分为光学检测、电化学检测、质谱检测和其他检测方法^[10-11]。其中,吸光度检测技术是一种常用的光学检测方法,结构简单且使用方便,可测定的物质种类多,在日常分析检验中被广泛使用^[4]。

本文以吸光度检测技术为基础,设计了一种基于冻干试剂预封装芯片,以闪烁氙灯为光源、微型光谱仪为检测器的旋转式光探测系统,分析了光源输出稳定性、芯片定位误差和进样误差对检测结果的影响,解决了光源输出稳定性差以及芯片难以精确定位的问题。这种光探测系统结构简单,易于集成,且检测结果稳定可靠,在生化检测领域具有重要应用。

2 探测原理、结构及流程

离心式微流控生化分析系统的光探测原理为朗伯-比尔定律,其数学描述为^[12]

$$A = \lg \frac{I_0}{I} = \varepsilon b C, \quad (1)$$

式中 A 为吸光度; I_0 为入射光强; I 为透射光强; ε 为摩尔吸光系数; b 为光程; C 为被测物质的物质的量浓度。

如图1所示,系统以无刷直流电机驱动离心式微流控生化分析芯片做离心运动,为芯片前处理过程提供驱动力。选用闪烁氙灯作为探测光源,与传统生化分析仪使用的卤钨灯相比,闪烁氙灯紫外波段光强更强,可以提高系统紫外波段的测量精度;工作温度更低,仅为40℃,相比于卤钨灯工作温度250℃,更利于控制生化反应的环境温度。采用微型光谱仪作为系统的检测器,其检测范围为340~850nm,覆盖常规生化检测所需波长,满足芯片中多种生化指标的检测需求;其体积较小,便于系统集成;可以同时检测多个波长,易于实现分光后双波长的检测需求。系统由数字信号处理器(DSP)作为控制与处理系统,协调控制电机转速与信号采集,经处理后交由显示装置得到最终结果。

系统进行探测前,首先在芯片内进行样品预处理与混合反应过程。如图2所示,将全血注满至腔1,无刷

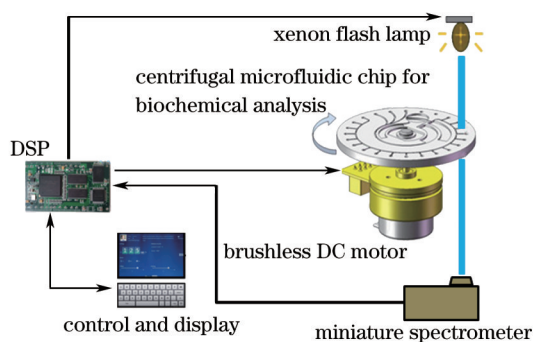


图1 光探测系统结构示意图

Fig.1 Schematic diagram of optical detection system

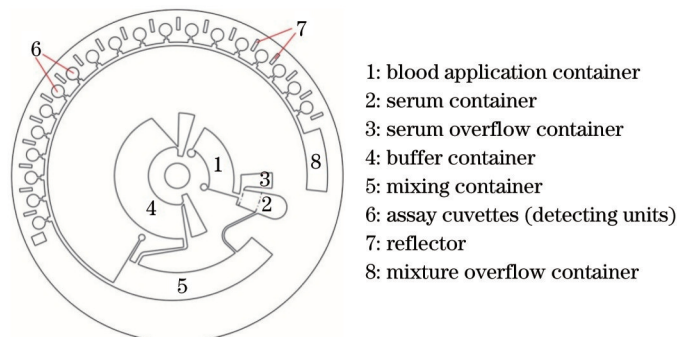


图2 离心式微流控生化分析芯片结构示意图

Fig.2 Structure diagram of centrifugal microfluidic chip for biochemical analysis

直流电机带动芯片高速旋转,在离心力的作用下,全血进入腔2,并在腔2中实现全血离心分离。此时,少量血细胞集中于腔2右侧顶部,待测血清充满腔2,其余部分及多余血清溢出至腔3。芯片以特定速度曲线做离心运动,在离心力的作用下,仅腔2中虚线所示部分定量血清通过虹吸管进入腔5。将缓冲液注入腔4,芯片高速旋转,在离心力的作用下缓冲液进入腔5。芯片做加减速运动,实现血清与缓冲液均匀混合。最后,芯片以特定的速度曲线做离心运动,将腔5中的混合液依次分配至腔6,并与其内部预封装的不同种类冻干试剂小球混合反应,用于实现不同指标检测,多余的混合液由腔8收集。

探测时,因闪烁氙灯非持续性发光,且检测单元放射性分布于芯片边缘,为了提高检测效率,采用旋转探测方案,即电机带动芯片低速旋转,芯片中检测单元依次经过检测位置时,闪烁氙灯触发,检测光经过芯片后进入微型光谱仪分光,根据检测指标不同实现对应波长光强采集。

3 系统误差分析

在上述检测过程中,影响吸光度检测的物理因素主要有:1)光强 I 和 I_0 (由光源输出稳定性决定);2)检测单元和微型光谱仪的相对位置(由定位误差决定);3)溶液浓度 C (由进样误差决定)。因此,主要分析光源输出稳定性、芯片定位误差、进样误差对检测结果的影响。

3.1 光源输出稳定性分析

在上述探测过程中,闪烁氙灯非持续性发光,其输出稳定性仅为2% CV(变异系数)。如果采用传统吸光度检测方法,即先测量试剂空白 I_0 ,再测量透射光强 I_1 ,由(1)式计算吸光度,则因闪烁氙灯两次触发时光强输出绝对值差异,导致探测结果重复性较差。因此采用双波长测量方法,在氙灯触发一次条件下完成吸光度测量,原理如下。

对于某一个测试指标,选定 λ_1 作为检测波长, I_{01} 和 I_1 为检测波长下的入射光强与透射光强;选定 λ_2 作为参考波长, I_{02} 和 I_2 为参考波长下的入射光强和透射光强。同一次测量中,两波长处吸光度相减有

$$\Delta A = A_{\lambda_1} - A_{\lambda_2} = \lg \frac{I_{01}}{I_1} - \lg \frac{I_{02}}{I_2} = (\varepsilon_{\lambda_1} - \varepsilon_{\lambda_2})bC, \quad (2)$$

化简后得

$$\Delta A = \lg \frac{I_2}{I_1} - \lg \frac{I_{02}}{I_{01}} = (\varepsilon_{\lambda_1} - \varepsilon_{\lambda_2})bC. \quad (3)$$

实际检测过程中,待测物质对参考波长(生化检测中常选用850 nm)的吸收极小,可认为此波长处的吸光度为0, $\varepsilon_{\lambda_2} = 0$ ^[13],因此(3)式可以化简为

$$A_{\lambda_1} = \lg \frac{I_2}{I_1} - \lg \frac{I_{02}}{I_{01}} = \varepsilon_{\lambda_1}bC, \quad (4)$$

式中可令 $\lg(I_{02}/I_{01}) = B$,其中 I_{01} 、 I_{02} 分别为测试波长和参考波长的入射光强。即使因光源输出不稳定导致每次测量时 I_{01} 、 I_{02} 绝对值都不相等,但光源每次发光时其光谱中 $\lg(I_{02}/I_{01})$ 为常数,即 B 为固定值。令 $A' = A_{\lambda_1} + B$ 为系统检测吸光度,则(4)式化简为

$$A' = \lg \frac{I_2}{I_1} = \varepsilon_{\lambda_1}bC + B, \quad (5)$$

式中 A' 与 C 呈严格线性关系,且 A' 只与两波长处透射光强 I_1 和 I_2 的比值有关。在固定浓度的溶液中,检测波长处透射率不变,即使每次闪烁氙灯发光光强有差异,两透射光强的比值为常数,故吸光度不易受光强绝对值变化影响,提高了吸光度检测的重复性。

实际检测过程中,光源发出白光经过芯片检测单元,波长 λ_1 被样品吸收后,透射光进入微型光谱仪分光并采集检测波长光强 I_1 和参考波长光强 I_2 ,由(5)式计算吸光度 A' 。

为了验证双波长吸光度检测方法对光源输出不稳定的抑制效果,以0.001 mol/L的重铬酸钾溶液为样品,以340 nm为检测波长,850 nm为参考波长,在芯片静止的条件下,分别采用单波长吸光度检测方法与双波长吸光度检测方法对样品进行检测,检测结果如表1、表2所示。

经计算,单波长检测结果的平均值为0.2470,标准差为0.004434,变异系数为1.79% CV。经计算,双波长检测结果的平均值为0.4617,标准差为0.0004591,变异系数为0.0994% CV。

表1 单波长检测结果

Table 1 Measurement results of single wavelength

Serial No.	Absorbance <i>A</i>									
1~10	0.2453	0.2426	0.2523	0.2417	0.2486	0.2459	0.2544	0.2508	0.2419	0.2415
11~20	0.2424	0.2528	0.2513	0.2415	0.2444	0.2482	0.2519	0.2467	0.2513	0.2436

表2 双波长检测结果

Table 2 Measurement results of dual wavelength

Serial No.	Absorbance <i>A</i>									
1~10	0.4621	0.4612	0.4622	0.4618	0.4613	0.4617	0.4621	0.4620	0.4608	0.4613
11~20	0.4616	0.4622	0.4614	0.4617	0.4621	0.4618	0.4627	0.4611	0.4616	0.4620

由表1和表2对比可知,采用双波长吸光度检测方法有效抑制了光源输出稳定性差对检测结果的影响,吸光度重复性仅为0.0994% CV,相比于单波长吸光度检测结果,吸光度重复性提高了18倍。

3.2 芯片定位误差分析

因芯片中血液前处理需要芯片做高速离心运动,其最高转速可达5500 r/min,所以系统采用无刷直流电机作为离心驱动装置。但采用无刷直流电机难以同采用步进电机一样通过控制步进角的方式实现精确定位。为了解决上述问题,系统采用同步触发的定位方法。如图3所示,在芯片各检测单元中间增加45°全反射棱镜。图3所示为芯片定位系统示意图,红外光源水平方向放置,对应位置传感器竖直方向放置,当芯片中检测单元经过检测位置时,红外光源发出的光信号经45°全反射棱镜反射至位置传感器,产生一个脉冲信号,此时闪烁氙灯触发,完成一次探测过程。在位置传感器上方放置一个狭缝,通过计算反射脉冲信号的宽度,可以滤除探测过程中杂散光对定位信号的干扰。

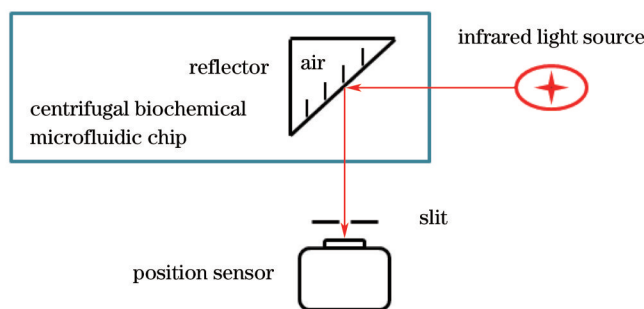


图3 芯片定位系统示意图

Fig.3 Schematic diagram of chip positioning system

检测过程中电机转速为120 r/min,实际测得其转速控制误差不超过5%,即 $\Delta\omega = 36^\circ/\text{s}$ 。闪烁氙灯的触发时间为10 μs ,即位置传感器检测到反射脉冲信号至闪烁氙灯触发的时间为10 μs 。则在芯片同步触发定位过程中,产生的角度误差为

$$\Delta\theta = 36^\circ/\text{s} \times 10 \mu\text{s} = 0.00036^\circ, \quad (6)$$

芯片检测单元有效检测宽度为2.5 mm,检测单元距芯片中心47 mm,经计算其有效检测角度为3°。因此该定位误差远远小于芯片检测单元有效检测角度,可以满足探测过程中芯片定位要求。

在实际检测过程中,无刷直流电机的定位误差无法直接测量。通过对比芯片静止时双波长吸光度检测结果的重复性和采用同步触发定位时双波长吸光度检测结果的重复性,可以衡量这种定位方式对吸光度检测结果的影响。表3所示为采用同步触发定位时双波长吸光度检测结果,其中样品为0.001 mol/L重铬酸钾溶液。

表3 同步触发定位探测结果

Table 3 Measurement results of synchronized trigger positioning

Serial No.	Absorbance <i>A</i>									
1~10	0.4526	0.4507	0.4511	0.4520	0.4510	0.4519	0.4518	0.4503	0.4520	0.4513
11~20	0.4509	0.4515	0.4522	0.4521	0.4515	0.4511	0.4508	0.4512	0.4522	0.4525

经计算,采用同步触发定位的双波长吸光度检测结果的平均值为0.4515,标准差为0.0006450,变异系数

为0.143% CV。对比表2中芯片静止的检测结果,吸光度重复性增加约0.05% CV,但总体重复性仍然较好,约为0.15% CV,可以满足芯片的探测需求。

3.3 进样误差分析

在探测系统工作时,芯片检测单元中样品和试剂的量按特定比例混合,如果二者进量不准,则探测结果的重复性就无从谈起。根据朗伯-比尔定律,吸光度与被测溶液浓度成正比,如果存在进样误差,被测物浓度较理论值发生变化,则吸光度随之发生变化^[14],即

$$\Delta A = \varepsilon b \Delta C, \quad (7)$$

又因为 $\Delta C = \frac{C}{V} \Delta V$, $C = \frac{A}{\varepsilon b}$, 代入(7)式得

$$\Delta A = \frac{\Delta V}{V} A, \quad (8)$$

可见进样误差会影响吸光度检测结果。而中华人民共和国医药行业标准 YY/T 0654-2008 规定,全自动生化分析仪进样误差重复性应小于2%^[15],可以认为在进样误差重复性小于2%的条件下,其对吸光度造成的影响可以忽略不计。

在实际检测过程中,样品进样过程由血清腔2中虚线部分的体积大小所决定,试剂进样过程由冻干试剂小球的质量决定。根据中华人民共和国医药行业标准 YY/T 0654-2008 对全自动生化分析仪进样误差重复性的要求,随机测量20组微流控生化分析芯片血清腔2虚线部分的体积,结果如表4所示。

表4 芯片中血清腔体积检测结果

Table 4 Volume measurement results of serum container

Serial No.	Volume / μL									
1~10	65.42	64.65	63.85	64.15	65.19	64.99	64.37	64.94	65.08	62.51
11~20	66.17	63.86	64.84	64.97	64.29	65.30	64.17	64.05	64.34	63.59

经计算该部分体积平均值为64.54 μL ,标准差为0.7945,样品进样重复性为1.23% CV。

随机称量20组总蛋白和葡萄糖冻干试剂小球的质量,质量分布如表5、表6所示。

表5 总蛋白冻干试剂小球质量检测结果

Table 5 Mass measurement results of total protein lyophilized reagent

Serial No.	Mass / mg									
1~10	4.23	4.25	4.30	4.30	4.34	4.45	4.37	4.25	4.24	4.21
11~20	4.30	4.36	4.30	4.35	4.35	4.27	4.49	4.38	4.23	4.22

表6 葡萄糖冻干试剂小球质量检测结果

Table 6 Mass measurement results of glucose lyophilized reagent

Serial No.	Mass / mg									
1~10	2.75	2.68	2.75	2.75	2.76	2.77	2.68	2.64	2.77	2.67
11~20	2.65	2.76	2.68	2.69	2.64	2.65	2.64	2.67	2.78	2.65

经计算表5中总蛋白冻干试剂质量的重复性为1.78% CV,表6中葡萄糖冻干试剂质量的重复性为1.94% CV。可见在检测过程中样品和试剂的进样重复性均满足国家标准,可以忽略进样误差对检测结果的影响。

4 结 论

基于离心式微流控生化分析芯片设计了一种以闪烁氙灯为光源、微型光谱仪为检测器的旋转式光探测系统,介绍了系统原理、结构与探测流程,分析了吸光度重复性、定位误差与进样误差对检测结果的影响,解决了因光源输出不稳定性造成的结果偏差以及芯片难以精确定位的问题。实验结果表明:

1) 采用双波长测量方法,在闪烁氙灯触发一次的条件下来完成探测,避免光源输出不稳定对探测结果的影响,吸光度重复性可达0.0994% CV;

2) 采用同步触发的定位方式,可以实现探测过程中无刷直流电机的精确定位,该种定位方式下的吸光度重复性达到0.143% CV;

3) 探测系统的进样误差由芯片血清定量体积和冻干试剂质量决定,其中样品进样重复性为1.23% CV,

试剂进样重复性为1.94% CV, 满足国家标准, 可以忽略其对检测结果的影响。

该光探测系统实现了样本预处理和检测过程集成于一体, 具有结构简单、易于集成的特点, 且检测结果稳定可靠, 在未来临床检测领域必有广阔应用前景。

参 考 文 献

- 1 Lin Bingcheng, Qin Jianhua. Laboratory on a Microfluidic Chip[M]. Beijing: Science Press, 2006.
林秉承, 秦建华. 微流控芯片实验室[M]. 北京: 科学出版社, 2006.
- 2 Fan Jianhua, Deng Yongbo, Xuan Ming, *et al.*. Synergistic bonding press of solvent and tendon for PC-based microfluidic chips[J]. Optics and Precision Engineering, 2015, 23(3): 708–713.
范建华, 邓永波, 宣明, 等. PC微流控芯片黏结筋与溶剂的协同辅助键合[J]. 光学精密工程, 2015, 23(3): 708–713.
- 3 Tan Wensheng, Zhou Jianzhong, Huang Shu, *et al.*. Experiment of laser melting-forming for PMMA microstructure parts [J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(7): 0703009.
谭文胜, 周建忠, 黄舒, 等. PMMA微结构件激光融化成型实验[J]. 中国激光, 2014, 41(7): 0703009.
- 4 Lin Bingcheng, Qin Jianhua. Graphic Laboratory on a Microfluidic Chip[M]. Beijing: Science Press, 2008.
林秉承, 秦建华. 图解微流控芯片实验室[M]. 北京: 科学出版社, 2008.
- 5 Mark D, Haeberle S, Roth G, *et al.*. Microfluidic lab-on-a-chip platforms: Requirements, characteristics and applications [J]. Chemical Society Reviews, 2010, 39(3): 1153–1182.
- 6 Zhang Yuquan, Wu Xiaojing, Wang Yijia, *et al.*. Monitoring SKOV3 cell apoptosis based on dynamic laser tweezers[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(11): 1104001.
张聿全, 吴晓静, 王弋嘉, 等. 基于动态光镊技术的卵巢癌SKOV3细胞凋亡检测[J]. 中国激光, 2014, 41(11): 1104001.
- 7 Huang Guoliang, Tian Hao, Li Zhiyong, *et al.*. Study of high sensitive and fast detection to trace sample and portable system [J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(2): 0217003.
黄国亮, 田浩, 李志永, 等. 痕量样品高灵敏度快速测量方法与便携式系统研究[J]. 光学学报, 2012, 32(2): 0217003.
- 8 Badr I H A, Johnson R D, Madou M J, *et al.*. Fluorescent ion-selective optode membranes incorporated onto a centrifugal microfluidics platform[J]. Analytical chemistry, 2002, 74(21): 5569–5575.
- 9 Watts A S, Urbas A A, Moschou E, *et al.*. Centrifugal microfluidics with integrated sensing microdome optodes for multiion detection[J]. Analytical chemistry, 2007, 79(21): 8046–8054.
- 10 Gao Renxi, Fan Guanghua, Chen Baoxue, *et al.*. Design and simulation of microfluidic chips based on multimode interference waveguide for measuring refractive index of liquid[J]. Chinese J Lasers, 2009, 36(5): 1180–1183.
高仁喜, 范光华, 陈抱雪, 等. 多模干涉光波导型微流控液体折射率监测用芯片的设计[J]. 中国激光, 2009, 36(5): 1180–1183.
- 11 Huang Shushi, Lu Mingqian, Li Bing, *et al.*. Real-time detection on the expression of soluble protein and inclusion body in the recombinant *Escherichia coli* with laser tweezers Raman spectroscopy[J]. Chinese J Lasers, 2014, 41(12): 1215003.
黄庶识, 卢明倩, 李冰, 等. 重组大肠杆菌表达可溶性蛋白和包涵体过程的拉曼光谱实时分析[J]. 中国激光, 2014, 41(12): 1215003.
- 12 Li Changhou. Ultraviolet/Visible Spectrometer[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 2005.
李昌厚. 紫外可见分光光度计[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
- 13 Bernstein D M, Lingane P J, Nagle R, *et al.*. Methods for photometric analysis[P]. US Patent 5478750, 1995.
- 14 Chen Qinghai, Li Haiwen, Wu Yihui, *et al.*. The error analysis and modeling of automatic chemistry analyzer[J]. Journal of Xi'an University of Technology, 2011, 27(1): 112–115.
陈清海, 黎海文, 吴一辉, 等. 生化分析仪的误差分析与建模[J]. 西安理工大学学报, 2011, 27(1): 112–115.
- 15 State Food and Drug Administration. YY/T0654–2008 Standard of medicine industry in People's Republic of China[S]. Beijing: China Standard Press, 2008.
国家食品药品监督管理局. YY/T0654–2008 中华人民共和国医药行业标准[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.

栏目编辑: 吴秀娟