

激光与光电子学进展

核酸检测系统荧光激发光路的标定方法

杜曼殊^{1,2}, 林晓辉^{1*}, 杨佳羽², 刘建春¹, 张东旭²

¹厦门理工学院电气工程与自动化学院, 福建 厦门 361024;

²厦门大学公共卫生学院, 福建 厦门 361102

摘要 激发光的光斑大小和准直性能是评价核酸检测系统的荧光激发光路性能的重要指标。为此, 提出一种用于核酸检测系统的荧光激发光路性能的标定方法。首先建立激发光的光斑模型和光路准直模型, 利用 MATLAB 进行数值计算, 再利用 ZEMAX 光线追迹仿真初步验证模型准确性, 最后搭建激发光路准直性能测试平台, 利用工业相机采集光斑, 进行实验验证。激发光路出射光斑最大值为 2.23 mm, 光线出射角为 1.72°。结果表明, 建立的光斑模型和光路准直模型可以用来标定核酸检测仪器激发光路的性能, 有效地解决了光斑难以被精准控制的问题, 为光路准直评价提供了一种新的思路。

关键词 测量; 核酸检测; 激发光路; 光路标定; 光斑模型; 准直模型

中图分类号 O436

文献标志码 A

doi: 10.3788/LOP202259.0712003

Calibration Method of Fluorescence Excited Light Path in Nucleic Acid Detection System

Du Manshu^{1,2}, Lin Xiaohui^{1*}, Yang Jiayu², Liu Jianchun¹, Zhang Dongxu²

¹School of Electrical Engineering and Automation, Xiamen Institute of Technology, Xiamen, Fujian 361024, China;

²School of Public Health, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361102, China

Abstract Spot size and collimation performance of excitation light are important indexes to evaluate the performance of fluorescence excitation light path of nucleic acid detection system. This paper introduces a calibration method of fluorescence excitation light path performance for nucleic acid detection system. Firstly, the excitation light spot model and optical path collimation model are established, and the numerical calculation is carried out by MATLAB. Then, the accuracy of the model is preliminarily verified by ZEMAX ray tracing simulation. Finally, the excitation light path collimation performance test platform is built, and the industrial cameras are used to collect the light spot for experimental verification. The maximum output spot of the excitation light path is 2.23 mm, and the output angle is 1.72°. The results show that the established spot model and optical path collimation model can be used to calibrate the excitation optical path performance of nucleic acid detection instrument, which can effectively solve the problem that the spot is difficult to be accurately controlled, and provides a new idea for optical path collimation evaluation.

Key words measurement; nucleic acid detection; excitation light path; light path calibration; spot model; collimation model

收稿日期: 2021-05-19; 修回日期: 2021-06-28; 录用日期: 2021-07-01

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(62003284)、福建省科技厅自然科学基金青年创新项目(2019J05018)

通信作者: *xhxm@163.com

1 引言

核酸检测技术是直接对生命体的遗传物质,比如脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA),进行检测的技术。核酸检测技术的特异性和灵敏度极高、窗口期短、具备多重检测能力^[1]。但是,核酸检测过程十分复杂,对检测环境、实验室条件、人员技术水平要求甚高^[2]。因此,核酸检测的发展趋势为即时检测、随地随检。在体外诊断领域,将此类小型、便携、即时即地的检测手段被称为快速检测(POCT),也称为床边检测、现场检测等^[3]。

核酸检测仪器中常用的光学检测系统的工作原理是荧光染料或者探针与目标基团有选择性的特异性结合,然后在光的激发下释放出荧光信号,荧光信号通过光学系统传输至光电传感器,从而检测出荧光信号的强度^[4],而荧光强度又与目标基因浓度呈线性关系,因此可以监测整个核酸扩增进程^[5]。

针对现场快速荧光检测仪系统的核心——光学模块,目前仍然存在体积大、能量利用率低、聚焦光斑大^[6]等问题。传统核酸检测仪多采用激光作为激发光源,激光光束具有良好的光强稳定性及较大的光功率密度,因此在荧光检测应用中,具有很好的检测灵敏度与信噪比^[7]。但是,激光器及其附属的电源装置往往存在体积庞大、功耗很高的问题,而且激光器的使用寿命短。难以满足现场检测对便携性和快速性的极高要求。越来越多的核酸 POCT 仪器使用发光二极管(LED)作为激发光源,因为 LED 有比激光更好的准直性能和稳定性^[8]。但 LED 的结构使得出射光的发散难以控制、光斑杂乱无章、能量利用率降低。如果准直性能差的光线通过光纤束直接照射到荧光染料上,不仅光强损耗极大,而且激发光的强弱不均,导致荧光得不到充分的激发。

核酸检测仪要求光斑无论是在光路传导的过程中还是在接收面上都要更为精细的量化,这样才能使光路结构更为紧凑,体积尽可能减小以及进一步提升光路准直性能。然而目前的研究更多地聚焦于光路中个别元器件的优化与增减上^[9],还没有对元件之间的联动性做出系统的评估。

本文提出一种能够标定激发光路光斑大小和准直性能的方法。针对核酸检测仪器的激发光路,利用光路追迹的思维,将光线作为光学元件之间彼

此联系的桥梁,基于激发光准直模型,通过 ZEMAX 软件对激发光路光斑出射的情况进行仿真分析,并与 MATLAB 数学模型的数值计算结果变化趋势进行对比,验证了模型的正确性。最终通过光斑实验进行核酸检测仪器光路激发模块的标定,并给出标定结果。

2 光路系统

核酸检测仪的光学系统是由 LED、平凸透镜、滤光片、光纤束和光电二极管等元件组成^[10]。核酸检测仪器光学系统结构如图 1 所示。

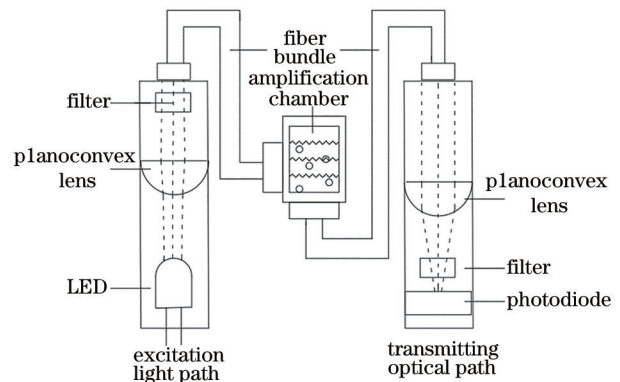


图 1 核酸检测仪器光学系统结构图

Fig. 1 Structure diagram of optical system of nucleic acid detection instrument

工作过程如下:1) LED 作为激发光源发出激发光通过透镜准直后穿过窄带滤光片;2) 由滤光片滤去杂光再经光纤束传导至微流控芯片的核酸扩增腔;3) 扩增腔底部的光纤束接收激发出来的荧光经平凸透镜会聚在光电二极管(PD)的光窗上;4) 由光电模块进行检测^[11]。

3 激发光准直建模

3.1 建模原理

给定平凸透镜凸面的曲率半径 r 、空气和透镜折射率分别为 n_1 和 n_2 。激发光路结构如图 2 所示,设任意一条光源出射光线出射角为 x ,应用正弦定理于光源、入射点和球心构成的三角形,得到

$$\frac{r}{\sin x} = \frac{l+m}{\sin a}, \quad (1)$$

式中: l 为入射光到透镜顶点的距离; m 为球心到透镜顶点的距离;光线射入第一个折射面的入射角为 a 。在平凸透镜两个折射面依次应用折射定律可得,

$$n_1 \sin a = n_2 \sin b, \quad (2)$$

$$n_2 \sin c = n_1 \sin d, \quad (3)$$

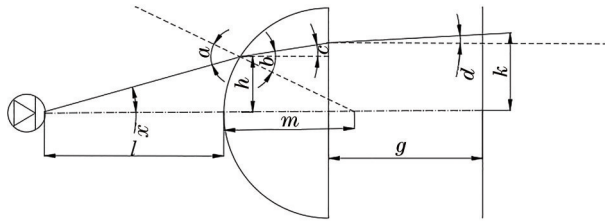


图 2 激发光路原理图

Fig. 2 Schematic of excitation light path

式中： b 为第一个折射面的出射角； c 为经过光线第一个折射面后与光轴的夹角； d 为光线经过第二个折射面之后与光轴的夹角。根据(1)式、(2)式和(3)式，可以推出光线经过平凸透镜之后与光轴的夹角为

$$d = \arcsin \left[\frac{n_2}{n_1} \sin (\arcsin \varpi - \arcsin \theta + x) \right], \quad (4)$$

式中： ϖ 为光线经过一个折射面的折射角的正弦值； θ 为第一个折射面的入射角的正弦值，推知，

$$\varpi = \frac{n_1}{n_2} \left(\frac{l+m}{r} \right) \sin x, \quad (5)$$

$$\theta = \left(\frac{l+m}{r} \right) \sin x. \quad (6)$$

由于平凸透镜边缘与中心对光线的折射能力不同，光路的出射角并不是所有光线出射角 d 的简单累加，因此需要引入光斑半径作为参数指标，利用光斑的变化来描述整体光路的出射角变化情况，再利用光路的出射角的大小来判断光路准直性能。在图 2 经虚线围成的三角形中分别应用正弦定理，推出光斑半径 k 为

$$k = r \sin (a-x) + \frac{r \sin (a-x)}{\tan (a-x)} \tan c + g \tan d. \quad (7)$$

由上述推导结果可知，当透镜的材质、曲率半径和放置距离确定后，光斑半径 k 只与光源的出射角 x 有关。当光源的出射角不变时，激发光路的准直性能可以利用不同距离下接收面光斑半径的变化角进行计算，

$$\delta = \arctan \frac{k_1 - k}{g_1 - g}, \quad (8)$$

式中： δ 为光路出射角； g 为光屏到透镜距离； g_1 为移动后的光屏到透镜距离； k_1 为移动后光屏接收到的光斑半径。

3.2 光路准直模型的数值计算

平凸透镜参量已知，将入射光初始条件代入(4)式，可以得到光线经过透镜之后与光轴的夹角，

再将其代入(7)式即可得到光路边缘光线的半径。整体的光斑半径是透镜接收到所有边缘光线的累积，可以通过边缘光线的变化情况推出^[12]。在 MATLAB 中进行平凸透镜光斑半径的数值计算，初始条件参数如表 1 所示。

表 1 光斑半径数值计算体系参量表

Table 1 Parameters table of numerical calculation system for spot radius

r_1 /mm	r_2 /mm	n_1	n_2	l /mm	g /mm
5.17	∞	1.0	1.5	7.3	7.7

光斑半径计算结果如图 3 所示，可以看到折射面形成的边缘光线随着光源出射角的增大呈现先增大再减小的趋势。

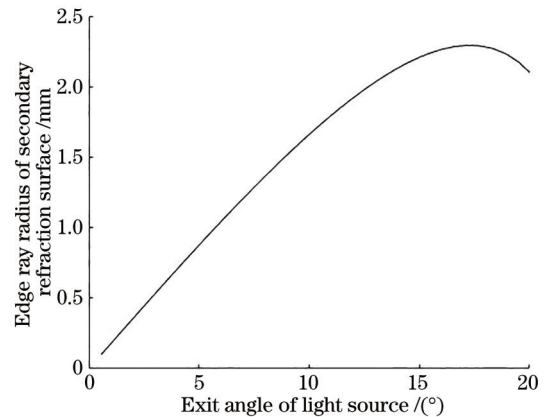


图 3 光源出射角与二次折射面边缘光线半径的关系曲线
Fig. 3 Relation curve between exit angle of light source and radius of light at edge of secondary refraction surface

光斑出射角计算结果如图 4 所示，可以看到折射面出射角随着光源出射角的增大呈现先增大再减小的趋势，与上述出射角的变化情况一致。

结合二次折射面出射角与二次折射面边缘光线半径的变化情况，可以推断光路光斑呈现先增大再不变的趋势，在给定的入射光初始条件下，光斑半径的最大值约为 2.29 mm，实际后续光纤接收面的直径为 3 mm，满足后续的光斑需求。

光路光线出射角越接近 0° ，光路准直性能越好。对照出射角变化曲线和边缘半径变化曲线得到仪器激发光路实际出射角的理论计算值为 2.20° ，激发光路准直性能较好。如果实际测量值能够与理论值基本保持一致，可以认为激发光路能够为后续的核酸扩增腔提供较为准直的激发光。

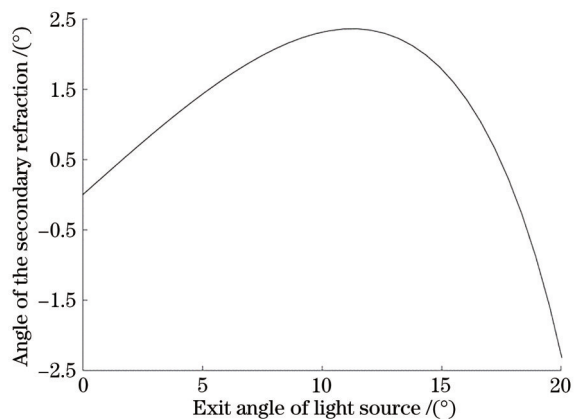


图 4 光源出射角与二次折射面出射角的关系曲线

Fig. 4 Relation curve between exit angle of light source and exit angle of secondary refraction surface

4 激发光路光线追迹仿真

在确定了荧光检测光学系统的结构后,可以通过 ZEMAX 对光学系统的光线传播轨迹进行仿真分析^[13]。首先,根据平凸透镜光学系统的镜头参数搭建出激发光路透镜参数的平面模型^[14]。在 ZEMAX 软件中设定平凸透镜两个表面的曲率半径分别为 5.17 mm 和 ∞ ,厚度为 3.1 mm,直径为 8 mm。通过对点光源及其发散角的控制代替 LED 加管道侧壁的光路打光模型,设置光源到透镜,透镜到接触面的距离分别为 7.7 mm 和 7.3 mm。给定 100000 束光线中检出 100 束的仿真要求,得到了光源半出射角为 22° 时,ZEMAX 光线追迹的仿真结果。

ZEMAX 对光线的追迹效果如图 5 所示,近光轴光线较为准直;光线到达透镜边缘,折射较强,逐渐呈现会聚趋势;中间过渡光线呈现略微发散的趋势。

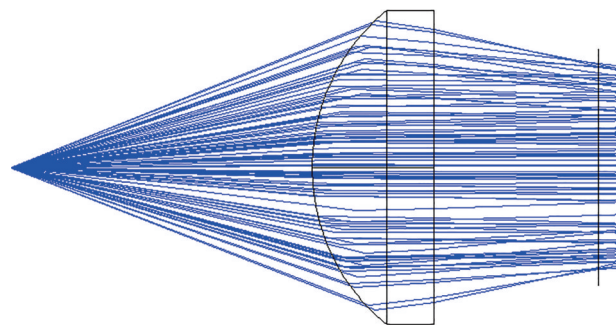


图 5 ZEMAX 仿真结果

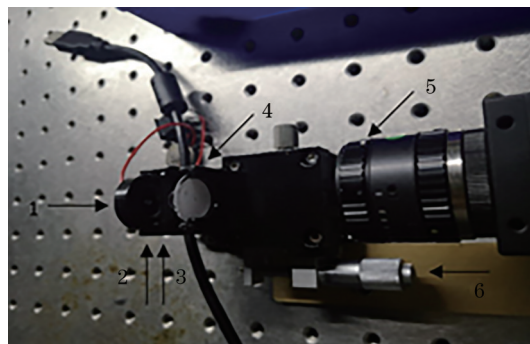
Fig. 5 ZEMAX simulation results

ZEMAX 仿真结果与 MATLAB 计算出折射面的出射角数学模型具有一致的变化趋势。但 ZEMAX 仿真难以得出接收面光斑的具体尺寸,需

要搭建光学实验平台进行激发光路准直模型的验证。

5 实验结果与分析

为验证标定模型的准确性,本文搭建了激发光路准直性能测试平台。如图 6 所示,实验装置主要由一个 LED、一个平凸透镜、一个光屏、光阑槽搭配五个不同尺寸的光阑夹片、一个以电荷耦合元件 (CCD) 作为图像传感器的工业相机和调控距离的千分尺滑台组成。



1: LED; 2: aperture slot; 3: lens; 4: light screen; 5: CCD camera; 6: micrometer slide

图 6 光斑测量实验装置

Fig. 6 Experimental setup for measuring light spot

其中,平凸透镜曲面曲率半径为 5.17 mm,厚度为 3.1 mm,直径为 8 mm。还原光路,用光屏作为接收面,参照物安装在光屏两侧,利用 CCD 拍摄进行光斑捕捉^[15],集成的千分尺滑台可以调整元件之间的距离。CCD 相机为深圳市迈德威视科技有限公司 MV-UBD130C M-T 型号工业相机,使用时,CCD 被固定在高精度平移台的夹具上。

实验采用 5 种不同内径的圆环片作为光阑,来控制入射光的出射角,圆环的内径即为本次实验的变量。设计圆环内径尺寸分别为 1.27 mm、2.16 mm、2.51 mm、3.20 mm、3.43 mm,对应的光线入射角分别为 9° 、 15.1° 、 17.5° 、 21.8° 、 23.2° 。CCD 拍摄的照片如图 7 所示。

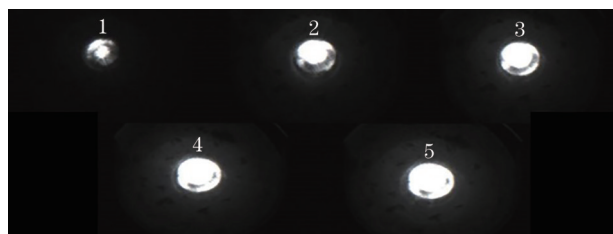


图 7 五种不同光阑下 CCD 拍摄的照片

Fig. 7 Images taken by CCD with five different apertures

以参照物的像素与实际距离比值为参照算出光斑半径的实际值。由 MATLAB 对准直模型的数值计算结果可知,不同光阑尺寸下光斑的变化趋势如图 8 理论值曲线(实线)所示。激发光路在距透镜 7.7 mm 的光屏上捕捉到的光斑整体呈现先变大,达到最大值 2.29 mm 后保持不变的趋势。将测得的像素值转化为实际半径值,数据处理结果如图 8 实际值曲线(虚线)所示。

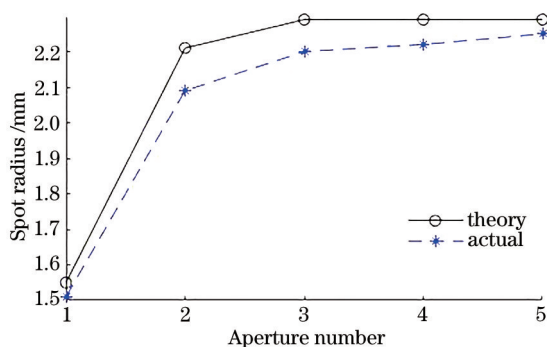


图 8 不同光阑下激发光路出射光斑半径的变化
Fig. 8 Changes of exit spot radius of excitation light path under different apertures

实验测得激发光路光斑大小约为 2.23 mm,与理论值(2.29 mm)接近,并且当光阑变大,即激发光源入射角越来越大时,光斑呈现先增大再不变的趋势。所以,无论从最终的数值还是曲线整体走势来说,实验结果都与理论建模保持一致。由于后续光纤收光口直径为 3 mm,也就是说光纤实际上只接收到光阑 1 及出射角在 18° 以内的光线。

用光阑 1 继续进行出射角的实验,判断光路的准直情况。调节螺旋测微器将光屏放置在距透镜

为 7.7 mm 和 8.7 mm 位置时用 CCD 拍摄此时的光斑情况。图 9(a)是光屏和透镜距离为 7.7 mm 时进行三次实验的拍摄结果,图 9(b)是光屏和透镜距离为 8.7 mm 时进行三次实验的拍摄结果。

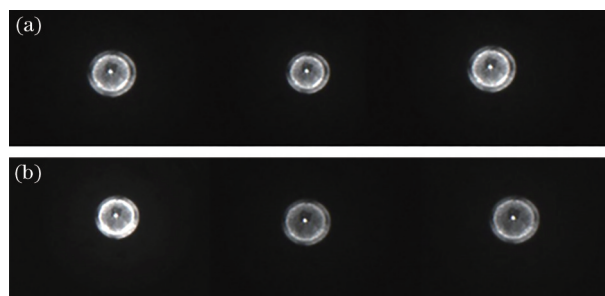


图 9 光屏和镜头距离不同时,光路准直实验 CCD 拍摄结果。(a) 7.7 mm;(b) 8.7 mm

Fig. 9 Images taken by CCD of optical path collimation experiments under different distances between screen and lens. (a) 7.7 mm; (b) 8.7 mm

参考表 2,得到光屏移动前后光斑的实际尺寸,代入(8)式,记光线收敛方向为正方向,求得移动后的正切角的均值为 1.72° ,与理论计算值 2.20° 接近,存在一定的测量误差。

实验测试了光斑随光阑的变化情况,与理论建模有一致的变化趋势,并测量出在仪器光通道限制的情况下,光路实际的出射角,准直模型验证实验结果与理论值接近。实验结果说明,该仪器激发光路实际光线出射角约为 1.72° ,激发光路准直性能较好,出射光斑为 2.23 mm,高于光纤束入射面 1.5 mm 的收光半径,仪器的激发光路还有进一步优化的空间。本文提出的理论模型对仪器的研发与优化具有一定的指导意义。

表 2 激发光路准直实验数据

Table 2 Experimental data of collimation of excitation light path

Experiment	Distance /mm	Spot radius /dpi	Reference size /dpi	Actual size /mm	Exit angle /($^\circ$)
1	7.7	24.97	11.4	2.19	-2.86
	8.7	24.38	11.4	2.14	
2	7.7	24.69	11.2	2.20	-1.72
	8.7	24.79	11.4	2.17	
3	7.7	24.79	11.3	2.19	-0.57
	8.7	24.66	11.3	2.18	

6 结 论

本文通过建立激发光路准直模型,有效地仿真出激发光路出射光的光斑大小并分析了其准直性能,将模型放入 MATLAB 进行数值计算再通过

ZEMAX 仿真初步验证该标定方法的正确性,最后搭建了光学实验平台,进行了准直性能的验证实验。核酸检测系统激发光路出射光斑最大值为 2.23 mm,光线出射角为 1.72° 。实验结果说明,对光源出射光角度进行限制,能精准地控制激发光路

的光斑大小,也能精确计算出激发光路的出射角。对光路出射角建立的准直模型可以为激发光路的准直性能提供较好的标定依据。本文提出的标定方法能够比较精确地反映核酸快速检测仪器激发光路模块的性能,为后续光路的设计与优化提供了参照。

参 考 文 献

- [1] Niemz A, Ferguson T M, Boyle D S. Point-of-care nucleic acid testing for infectious diseases[J]. Trends in Biotechnology, 2011, 29(5): 240-250.
- [2] Jian D, Liu C. Portable multi-channel spectral measurement system for rapid on-site detection[J]. Journal of Applied Optics, 2021, 42(2): 310-316.
简丹, 刘诚. 可用于现场快速检测的小型化多通道光谱测量系统[J]. 应用光学, 2021, 42(2): 310-316.
- [3] Liu F, Niu Y Q, Chang Y L, et al. Application prospect of point-of-care testing in the diagnosis of viral respiratory tract infection[J]. Chinese Journal of Infection Control, 2021, 20(3): 279-282.
刘芳, 牛亚倩, 常钰玲, 等. 分子即时检验(POCT)在病毒性呼吸道感染疾病诊断中的应用前景[J]. 中国感染控制杂志, 2021, 20(3): 279-282.
- [4] Mao H. Study on performances of fiber-typed quantitative PCR fluorescence detection optical system [J]. Mechanical & Electrical Engineering Technology, 2016, 45(11): 54-56, 113.
毛贺. 光纤型定量 PCR 仪荧光检测光学系统性能研究[J]. 机电工程技术, 2016, 45(11): 54-56, 113.
- [5] Li R Z, Yang B, Guo C H, et al. Optical system design of miniature PCR fluorescence detector[J]. Electronic Science and Technology, 2017, 30(11): 34-37.
李润芝, 杨波, 郭彩虹, 等. 应用于微型 PCR 荧光检测仪的光学系统设计[J]. 电子科技, 2017, 30(11): 34-37.
- [6] Li J J, Chu C Y, Lu W T, et al. Development of microlens arrays: from fabrication to photonic applications [J]. Acta Optica Sinica, 2021, 41(21): 2100001.
李建军, 褚春艳, 卢玮彤, 等. 微透镜阵列的制备与应用研究进展[J]. 光学学报, 2021, 41(21): 2100001.
- [7] Lühl L, Andrianov K, Dierks H, et al. Scanning transmission X-ray microscopy with efficient X-ray fluorescence detection (STXM-XRF) for biomedical applications in the soft and tender energy range[J]. Journal of Synchrotron Radiation, 2019, 26(2): 430-438.
- [8] He Q, Zhao Z G, Xu X P, et al. Signal coupling analysis of single-mode large beam fiber collimating lens based on ZEMAX[J]. Laser & Optoelectronics Progress, 2021, 58(21): 2106008.
何琦, 赵振刚, 许晓平, 等. 基于 ZEMAX 单模大光束光纤准直透镜信号耦合分析[J]. 激光与光电子学进展, 2021, 58(21): 2106008.
- [9] Chen Y Q, Zhang X D, Liu X L. Evaluation of optical performance of free-form surface imaging system[J]. Acta Optica Sinica, 2020, 40(24): 2412002.
陈玉强, 张效栋, 刘现磊. 自由曲面成像系统的光学性能评价[J]. 光学学报, 2020, 40(24): 2412002.
- [10] Zhang D X. Nucleic acid extraction device and nucleic acid detection system: CN111187718A[P]. 2020-05-22.
张东旭. 核酸提取装置以及核酸检测系统: CN111187718A[P]. 2020-05-22.
- [11] Wang F H. Research and implementation of POCT nucleic acid diagnostic integrated microfluidic system [D]. Beijing: Beijing University of Chemical Technology, 2020.
王符皓. POCT 核酸诊断集成微流控系统研究与实现[D]. 北京: 北京化工大学, 2020.
- [12] Yu C K, Cen Y. Simulation and measurement of the spherical aberration of convex lens[J]. Physics Experimentation, 2019, 39(12): 44-49.
余昌恺, 岑屹. 凸透镜成像球差的模拟与测量[J]. 物理实验, 2019, 39(12): 44-49.
- [13] Yang L J, Xing H Y, Wang G M, et al. Design and simulation of excitation light path of SO₂ monitor by ultraviolet fluorescence[J]. Laser Technology, 2021, 45(1): 67-72.
杨立洁, 邢鹤园, 王桂梅, 等. 紫外荧光法 SO₂ 监测仪激发光路的设计仿真[J]. 激光技术, 2021, 45(1): 67-72.
- [14] Liu J H, Li X. The fluorescence acquisition path of sulfur dioxide is designed and simulated by ZEMAX [J]. Laser Technology, 2020, 44(2): 221-225.
刘杰辉, 李鑫. 基于 ZEMAX 二氧化硫荧光采集光路的设计仿真[J]. 激光技术, 2020, 44(2): 221-225.
- [15] Li B. Study on real-time photoelectric detection system of PCR device based on different microfluidic systems[D]. Changchun: Changchun Institute of Optics, Fine Mechanics and Physics, Chinese Academy of Sciences, 2021.
李彬. 基于不同微流控体系的实时 PCR 装置光电检测系统研究[D]. 长春: 中国科学院长春光学精密机械与物理研究所, 2021.