

## 激光与光电子学进展

## 用于核酸现场检测的直轴型多通道光学检测系统

奚邦朝<sup>1,2,3,4</sup>, 杨佳羽<sup>1,2,3,4</sup>, 黄绍磊<sup>1,2,3,4</sup>, 戴皓正<sup>1,2,3,4</sup>, 曾俊添<sup>1,2,3,4</sup>, 张东旭<sup>1,2,3,4\*</sup><sup>1</sup>厦门大学公共卫生学院, 福建 厦门 361102;<sup>2</sup>分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室(厦门大学), 福建 厦门 361102;<sup>3</sup>国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心(厦门大学), 福建 厦门 361102;<sup>4</sup>国家药品监督管理局传染性疾病预防检测技术研究及评价重点实验室, 福建 厦门 361102

**摘要** 随着医学检验对核酸检测技术要求的不断提高,现场检测(POCT)已经成为该领域的研究重点和难点。为了规避目前使用的 POCT 核酸检测仪器的缺点,构建了一种直轴型多通道光学检测系统,兼顾实现了多通道核酸实时荧光检测与即地即检。首先,基于正交式几何关系搭建了光路;然后,设计了一种新的直轴型多通道集成与切换装置以实现多个荧光检测通道的实时切换;最后,通过仿真验证了光路设计的有效性,并将本系统集成于自主设计的聚合酶链式反应装置上,以新型冠状病毒标准品进行了实时荧光检测实验。实验结果显示:本系统的变异系数最小可达 0.02%;通道分辨率最低可达 0.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,且没有通道串扰。同时,拥有良好的现场检测能力,可以配合仪器完成“样本进、结果出”的现场检测,为核酸 POCT 的多通道实时荧光检测提供了一种新思路。

**关键词** 医用光学与生物技术;核酸现场检测;光路设计;多通道光学检测

中图分类号 O439

文献标志码 A

DOI: 10.3788/LOP222231

## A Straight-Axis Multi-Channel Optical Detection System for Nucleic Acid On-Site Detection

Xi Bangchao<sup>1,2,3,4</sup>, Yang Jiayu<sup>1,2,3,4</sup>, Huang Shaolei<sup>1,2,3,4</sup>, Dai Haozheng<sup>1,2,3,4</sup>, Zeng Juntian<sup>1,2,3,4</sup>, Zhang Dongxu<sup>1,2,3,4\*</sup><sup>1</sup>School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, Fujian, China;<sup>2</sup>State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostic(Xiamen University), Xiamen 361102, Fujian, China;<sup>3</sup>National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases(Xiamen University), Xiamen 361102, Fujian, China;<sup>4</sup>State Drug Administration Key Laboratory of Infectious Disease Detection Technology Research and Evaluation, Xiamen 361102, Fujian, China

**Abstract** With the continuous demand for technological advances in nucleic acid detection for use in medical testing, point-of-care testing (POCT) has emerged as a research focus, presenting various challenges to overcome. To circumvent the disadvantages of POCT nucleic acid detection instruments that are currently in use, a straight-axis multi-channel optical detection system is proposed and designed, which facilitates both real-time, multi-channel as well as instant detection of nucleic acids. First, an optical path is built based on an orthogonal optical path design. Second, a new straight-axis multi-channel integration and switching device is designed to enable real-time switching between multiple fluorescence detection channels. Finally, the effectiveness of the optical path design is verified by simulation; this system is integrated into a self-designed polymerase chain reaction thermocycler, and a real-time fluorescence detection experiment is conducted using a new coronavirus standard. This system reaches a minimum coefficient of variation value of 0.02%. The minimum channel resolution is 0.49 mg/mL, and no channel crosstalk is observed. The system demonstrates good on-site detection capabilities, and functions cooperatively with the instrument to complete on-site detection from “sample in” to “result out”, offering a new perspective for POCT using multi-channel real-time fluorescence detection of nucleic acids.

**Key words** medical optics and biotechnology; nucleic acid on-site detection; optical path design; multi-channel optical detection

收稿日期: 2022-08-03; 修回日期: 2022-08-19; 录用日期: 2022-09-15; 网络首发日期: 2022-09-25

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(62003284)、厦门大学校长基金(20720210089)

通信作者: \*zhangdongxu@xmu.edu.cn

## 1 引言

核酸检测是一种通过对遗传物质的结构或表达水平进行检测从而作出相关诊断的分子诊断学技术。在肿瘤、传染病及遗传病检测,如对肝炎病毒、艾滋病病毒(HIV)、人巨细胞病毒(HCMV)等病毒的检测方面,都有着非常广泛的应用。自2019年12月以来,新型冠状病毒肺炎疫情(简称“新冠疫情”)爆发并迅速蔓延至全球。其间,核酸检测作为一种新冠病毒的有效检测手段,迅速为世人所熟知。根据公开数据,截至2022年3月17日,全球感染总人数高达5.1亿,国内感染人数已超69万。核酸检测作为监测疫情发展趋势与控制疫情扩散的有效手段,其作用至关重要<sup>[1-2]</sup>。

荧光检测是核酸检测应用最为广泛和重要的技术手段,是当今的研究热点和难点。常用的透镜组检测系统通常结构复杂且体积较大、不易进行操作或携带,所以研究体积小、操作便捷的检测系统变得尤为重要。为减小空间需求,Slusny等<sup>[3]</sup>选择在系统中采用一种特制的熔融石英制成的球透镜,这些球透镜焦距短,最大尺寸为10 mm,可以加工成多种尺寸,使得整个检测系统更加紧凑,该系统可用于核酸的检测与分析;此外,2014年Lin等<sup>[4]</sup>自主研制了由聚二甲基硅氧烷(Polydimethylsiloxane, PDMS)材料制成的微型混合柱面透镜系统,由于其具有自发荧光低、背景干扰小、聚焦效果好等优点,在基于荧光检测的系统中也具有很大的应用前景;为了改善因光学元件界面反射及传播介质吸收而导致的检测灵敏度降低等问题,Tang等选择采用一种Y型光纤进行光能传输,增强激发光强度且避免对荧光造成干扰<sup>[5-6]</sup>;Ma等于2021年研制了一款使用有机发光二极管(Organic light-emitting diode, OLED)作为光源,使用非线性光学元件进行光学系统优化。改善了激励的均匀性,且随着场透镜的加入,荧光的收集效果变得更好<sup>[7]</sup>。上述研究在核酸荧光检测方面都取得了良好的进展,但是,上述系统大多将重点放在自身的结构设计以及某种特殊光学元件的创新上,较少考虑用于现场检测(Point-of-care testing, POCT)场景及实时荧光检测系统的适配性及可行性。本装置在确保了光学检测性能的同时,可以很好地完成随时随地、即到即检的荧光检测,也可以根据试剂反应腔具体形状进行相关的配合与改进,提升了灵活性。

## 2 直轴型多通道荧光检测系统设计

核酸现场检测的直轴型多通道光学检测系统由正交式光路、多通道集成与切换装置、控制系统3个部分组成。目前核酸POCT产品多以微流控方式实现,而微流控芯片的扩增腔为能够实现快速的温度变化,多为扁平状、长条形,所以用于激发和采光的空间大都较为狭窄。多通道集成与切换装置可以在实现六通道多重检测的同时适配于空间狭窄的扩增腔,以实现现场

检测;配套正交式光路可以缩小激发与发射光路结构距离,使得整体系统进一步缩小,提升系统便携性;控制系统的设计确保了系统整体的模块功能实现以及荧光信号的转换与检测。

### 2.1 光路结构设计

为了使整个系统尽量紧凑且排列有序,以满足系统的便携性,设计了直轴型多通道荧光检测系统,对大小和结构进一步限制。在通常情况下激发光的强度远高于发射荧光强度,需要最大程度地避免激发光干扰。故整体光路采用正交式光路设计,即采用90°的夹角设置激发光路与发射光路,充分避免激发光的干扰以获得信噪比的提升。使用与微流控芯片扩增腔结构相匹配的光纤,可以缩短激发与发射光路的结构距离,进一步缩小整体系统<sup>[8-9]</sup>。

正交式光路设计示意图如图1所示,激发光路光源设计需要满足小巧低成本、无需高压供电等特点,故选择发光二极管(LED)作为激发光源<sup>[10]</sup>。扩增腔内物质受激发后发出荧光的荧光强度 $I_f$ 可表示为

$$I_f = k\Phi I, \quad (1)$$

式中: $I_f$ 为荧光强度; $I$ 为激发光强度; $\Phi$ 为荧光效率, $I_f$ 与 $I$ 、 $\Phi$ 成正比; $k$ 为比例系数。要尽可能在保持受光均匀的情况下选择光强较大的LED灯,同时也需确保激发光束的光强稳定且发光光谱具有单色性,故在不同的荧光通道选取对应中心波段、具有较小发散角的LED作为激发光源相关元件,重要参数见表1。

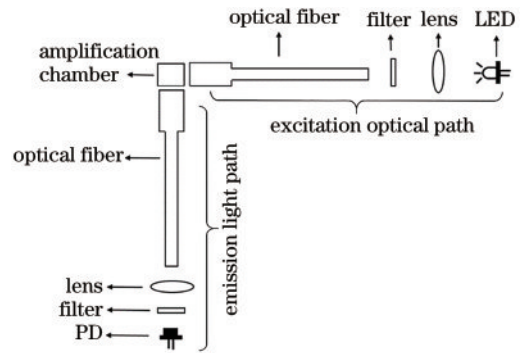


图1 正交式光路结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of the orthogonal optical path structure

在LED参数确定后,通过对实际光路的计算,确定光路中各元件距离,形成所需大小的光斑。以激发光路薄透镜为例,LED发光经过透镜后形成大小合适光斑入射滤光片,滤除杂散光后入射光纤。光源A到透镜球面顶点O的距离为 $L$ ;空气及透镜折射率 $n$ 、 $n'$ 已知;透镜曲率半径 $r$ 及LED发散角 $U$ 已知。光线经过光学元件示意图,如图2所示。

在 $\triangle AEB$ 中,有

$$\sin \alpha = [(L - r) \times \sin U] / r, \quad (2)$$

又由于折射定律,可得

表 1 LED 参数  
Table 1 Parameters of LED

LED	Center wavelength /nm	Half bandwidth /nm	Half-width value / (°)	Company	Fluorescence channel
NSPB510BS	465	20	±15	NICHIA	FAM
NSPG310B	520	35	±15	NICHIA	HEX
HSE575H-L512	575	35	±12	Huashang Optoelectronics	ROX
NSPR310S	635	15	±15	NICHIA	CY5

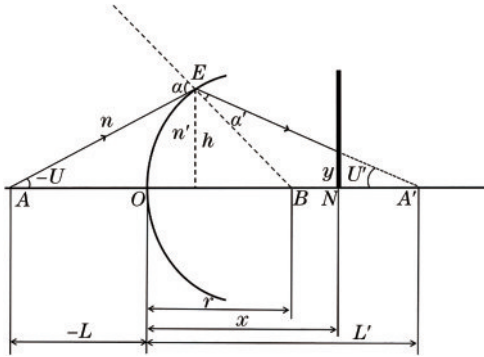


图 2 光线经过光学元件示意图

Fig. 2 Schematic diagram of light passing through optical components

$$\sin \alpha' = [(n \sin \alpha)] / n'. \quad (3)$$

对  $\Delta A'EB$  而言, 有

$$\sin \alpha' / (L' - r) = \sin U' / r, \quad (4)$$

可得

$$L' = r [(\sin \alpha' / \sin U') + 1], \quad (5)$$

其中,

$$U' = U + \alpha - \alpha'. \quad (6)$$

将滤光片放置在透镜后侧即放置在  $N$  点, 设  $ON$  之间的距离为  $x$ , 光斑大小  $y$  可以表示为

$$y = (L' - x) \tan U', \quad (7)$$

最终可得

$$y = \left\{ r \left\{ \left[ \frac{(n/n') \sin \alpha}{\sin U + \alpha - \arcsin [(n/n') \sin \alpha]} \right] + 1 \right\} - x \right\} \tan \{ U + \alpha - \arcsin [(n/n') \sin \alpha] \}. \quad (8)$$

通过调整透镜曲率半径  $r$  及透镜与滤光片间距  $x$ , 得到大小合适的光斑, 入射滤光片及光纤端面。滤光片根据后续检测中相应波段荧光通道, 如 FAM 通道、HEX 通道、ROX 通道的激发及发射波段定制了相关窄带滤光片, 从而滤除杂散光。光线最终通过光纤传导至微流控芯片扩增腔完成对待测样本中荧光染料或探针的激发。在激发 LED 后设置焦距  $f$  为 10 mm、 $\varphi$

为 8 mm 的激发端平凸透镜, 并在透镜后设置激发滤光片, 最终形成直径为 2.3 mm 光斑入射直径为 2 mm 的光纤收光口; 发射光路中荧光染料或探针被激发发光后, 由光纤后端出射, 在光纤出射端面后放置发射端平凸透镜, 透镜参数与激发端一致, 透镜后放置发射端滤光片, 最终形成 2 mm × 2 mm 的光斑入射光电探测器感光面, 具体距离参数如表 2 所示。

表 2 光路距离参数<sup>[11]</sup>

Table 2 Parameters of optical path distance

Fluorescence channel	Distance between LED and excitation lens /mm	Distance between excitation lens and filter/mm	Distance between fiber and emission lens /mm	Distance between emission lens and filter /mm
FAM	7.7	7.3	7.6	4.3
HEX	7.7	7.3	7.6	4.3
ROX	7.1	7.3	7.6	4.3
CY5	7.7	7.3	7.6	4.3

当荧光物质受到激发光照射激发后, 产生的荧光信号为微弱光信号<sup>[12]</sup>。信号通过光纤传输, 透镜会聚、滤光片滤除杂散光后, 通常无法直接分析, 需借助探测器将其转换为电信号以便后续信号处理与检测。所以光电探测器需要具备较好的灵敏度及响应速度, 同时其自身的噪声应该足够低以提高整体检测性能。因受到系统机械结构与微流控芯片自身结构的限制, 不需要通过大光窗成像对其进行检测, 且同样需要保证小型化、低成本化、无需高压驱动等特点, 选用了日本滨

松 HAMAMATSU 的 S1133-01 光电二极管 (PD) 作为发射光路的检测元件。S1133-01 具有 2.4 mm × 2.8 mm 的感光面积及 320~1100 nm 的光谱响应范围, 契合光学系统设计需求。

### 2.2 多通道集成与切换装置

多通道集成与切换装置主要用于控制聚合酶链式反应 (PCR) 过程中多个荧光检测通道的自主切换, 并与加热模块、微流控芯片等相互配合完成整体荧光激发检测流程。装置可以实现光学元件及硬件电路的集

成与装配,能够大幅提高检测系统的集成度。装置整体紧凑便携、易于操作,且相比于传统的核酸检测仪,本系统可以配合仪器实现快速扩增检测,将一般扩增检测所需 2~3 h 缩短至 25 min。此外,根据国家卫健委发布的《新型冠状病毒感染的肺炎实验室检测技术指南(第 3 版)》中推荐选用双靶标进行检测的相关说明,核酸检测需要至少能够满足双通道荧光检测。而本装置最多可实现 6 个检测通道的集成与切换,在确保仪器满足新冠检测的使用需求之下,额外增加了 4 个预留通道,提高了装置在乙肝、艾滋、结核等其他核酸检测诊断领域的扩展性。

图 3 为多通道集成与切换装置三维结构示意图,装置使用美国 Stratasys 公司 3D 打印机 Objet30 Pro 打印制作,采用黑色光敏树脂(Black photosensitive resin)作为打印材料,确保了材料表面平滑且具有耐高温的优点。多通道直轴与切换装置可以分为 2 个模块,分别

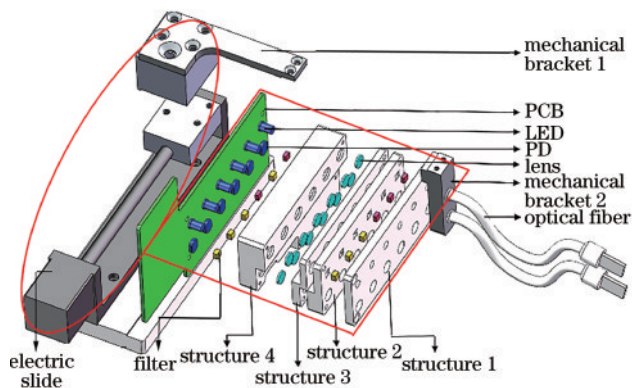


图 3 多通道集成与切换装置示意图

Fig. 3 Schematic diagram of multi-channel integration and switching device

为运动模块以及光学装配模块。运动模块由一个电动滑台作为主体,通过直线电机的运动带动导向杆转动从而带动机械支架移动,以实现让光纤水平移动以满足多通道切换的功能,如圆框所示。运动模块的切换运动已提前设置跟随聚合酶链式反应装置的扩增进程来进行移动,每当完成一轮扩增,便进行一轮移动采光,最终实现六通道的实时荧光检测。光学装配模块主要由 4 个独立架体及信号采集电路组成,如矩形框所示。4 个独立架体主要起到对光学元件的集成组装作用,同时,根据不同荧光通道之间的距离,改变不同架体距离,进而实现内部通道对光学元件距离的适配。

在核酸 POCT 产品中,微流控芯片多设计为扁平状或片状。这是为了在芯片扩增腔两侧装配快速升降温模块,以实现快速的 PCR 反应。根据微流控芯片结构以及扩增装置的机械结构限制,使用一种具有线状光斑的光纤进行光线传导,在节省空间的同时保证光学检测的性能,且可以完成快速扩增检测。图 4(a)为系统使用的微流控芯片,使用该微流控芯片配合本装置进行完整的扩增及检测。在采用双面夹紧加热模式的情况下,实际光通路十分狭窄,仅有如图 4(b)所示 1.2 mm×11 mm 的通道空间可用于光线传导,空间受限。而本系统仍需快速扩增检测,为了在节省空间的同时保证光学检测的性能,使用了一种如图 4(c)所示具有线状光斑的光纤,光纤线状出光口尺寸与光通路的空间尺寸完全一致。微流控芯片扩增腔为一个 1 mm×10 mm×1 mm 的超薄立方体,因此该光纤可以充分照射微流控芯片的扩增腔室并尽可能多地收集目标待测物发出的荧光。光纤可耐受 120 °C 以上高温,不会受仪器快速 PCR 扩增时温度剧烈变化的影响。当扩

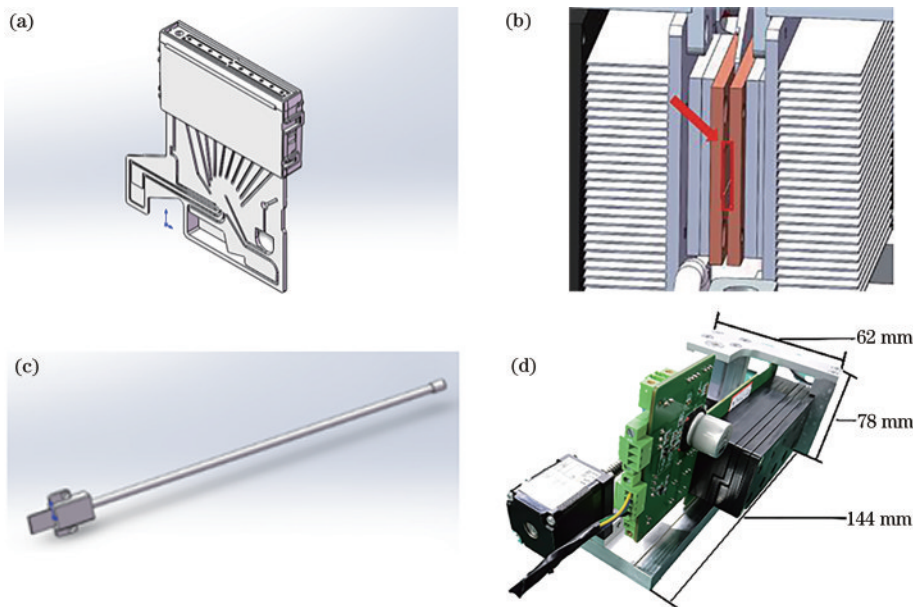


图 4 快速扩增配套装置。(a)微流控芯片;(b)扩增加热时光通路;(c)具有线状光斑的光纤;(d)多通道集成与切换装置实物图

Fig. 4 Rapid amplification supporting device. (a) Microfluidic chip; (b) amplification heating light path; (c) optical fiber with linear spot; (d) physical map of multi-channel integration and switching device

增腔形状发生改变时,也可通过改变光纤端面的形状来进行适配,大大增加了系统应用于 POCT 场景的适配性。如图 4(d)所示为直轴型多通道光学检测系统实物图,整体尺寸为 144 mm×78 mm×62 mm,将整个系统与其余关键模块进行集成以完成“样本进、结果出”的全自动核酸检测。首先,将检测试剂如新冠病毒标准品注入微流控芯片中,通过芯片的进出仓模块将芯片放入设定位置,待仪器的超声辅助核酸提取模块完成提取步骤,并配合聚合酶链式反应装置完成样本的扩增,最后通过所设计的光学检测模块完成最后的多通道荧光曲线绘制。只需加入样本,仪器自动完成全流程操作,真正意义上实现“样本进、结果出”的全自动核

酸检测,全流程仅需 25 min,具有较好的核酸检测能力。

### 2.3 控制系统设计

该系统的控制模块硬件结构框图如图 5 所示。选用 STM32 进行总体控制与处理,并根据实际控制需要,重点对以下几个主要的功能模块进行设计:1) 电源供电模块用于实现电压的转换以及对子电路的供电;2) LED 驱动电路用于实现对激发光源的恒流驱动控制;3) 步进电机驱动电路则用于完成对切换装置中电动滑台的驱动控制,实现通道切换;4) 通信模块用于与上位机完成通信并作为电路调试接口打印调试信息;5) 信号调理及采样电路用于实现对光电转换器输出电信号的调理及采样。

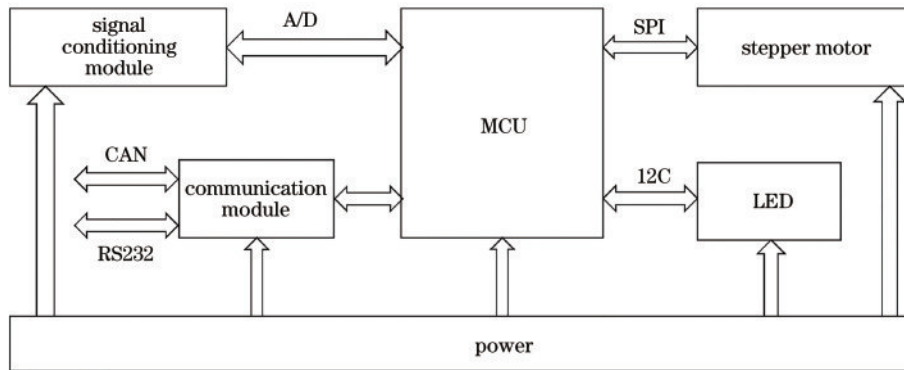


图 5 检测系统硬件结构框图

Fig. 5 Block diagram of the hardware structure of the detection system

为降低反馈电阻的阻值,同时不影响对荧光信号的转换与检测,采用 T 型电阻反馈网络替代单一反馈电阻的形式进行优化设计。样本荧光经过光电转换后的光电流通常处于皮安级,为精准地实现对光电流的测量,本系统采用美国德州仪器 TI 公司的精密跨阻放大器 OPA380(静态电流为 7.5 mA、输入偏置电流为 3 pA(典型值)、输入偏置电压为 4  $\mu$ V(典型值)、增益带宽为 90 MHz)。经由 ADG1408 组成的多路选通开关之后,利用 TI 公司的 OPA277 运算放大器设计了二

级放大电路对光电信号作进一步放大处理。

## 3 仿真及试验

### 3.1 Light Tools 光路仿真

为了确保整体光路设计的合理性,使用 Light Tools 仿真光路中各部分元件以及荧光检测系统整体的结构,从而对整体光路的结构设计进行指导及验证<sup>[14]</sup>。整体光路仿真示意图如图 6 所示,可以根据光源出射角度及距离精确改变光路光斑的大小。

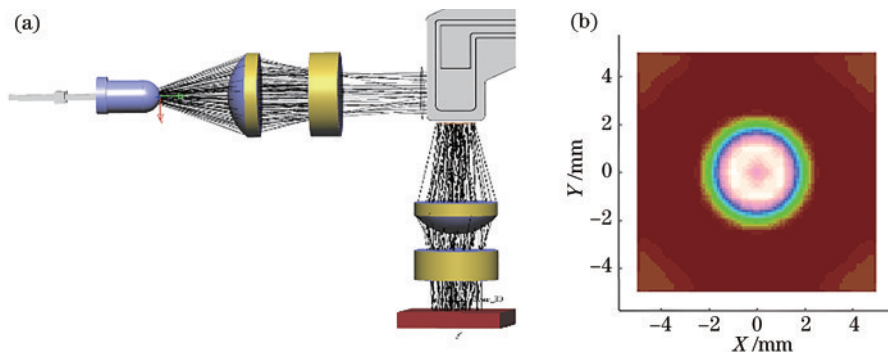


图 6 Light Tools 仿真。(a)光路结构;(b)光斑大小

Fig. 6 Light Tools simulation. (a) Optical path structure; (b) spot size

Light Tools 根据各元件相关参数搭建出激发光路,激发光路中的平凸透镜等光学元件均按照全自动核酸检测仪中荧光检测系统的实际参数进行设置,激

发与发射光路呈 90°,以达到正交设计的目的。光在光纤中的传播具有一定随机性,影响因素复杂,使用与光纤圆端大小相当的探测面及荧光发射面代替光纤。在

发射光路中,将光源设置为朗伯光源来仿真实际荧光的出射,最终形成一个半径为 2.4 mm 的圆形光斑布满光电探测器(PD)的光窗以完成检测。最终得到的 Light Tools 仿真结果也与实际系统保持一致,为光学检测系统的性能测试与生物实验测试奠定了基础。

### 3.2 荧光检测系统性能测试实验

#### 3.2.1 重复性测试

将所设计的直轴型多通道光学检测系统与自主设

计的超声辅助核酸提取模块及自主设计的聚合酶链式反应装置集成在一起,构成“样本进、结果出”的全自动核酸检测装置,如图 7(a)所示。由于在完成集成后,会进行整机套壳处理,故外界环境对实验的影响不大。通过更换微流控芯片内的试剂来进行系统的性能测试,将芯片放入进出仓模块,点击开始,荧光值以及扩增曲线等信息便会实时显示。去掉外壳后的内部结构图如图 7(b)所示。

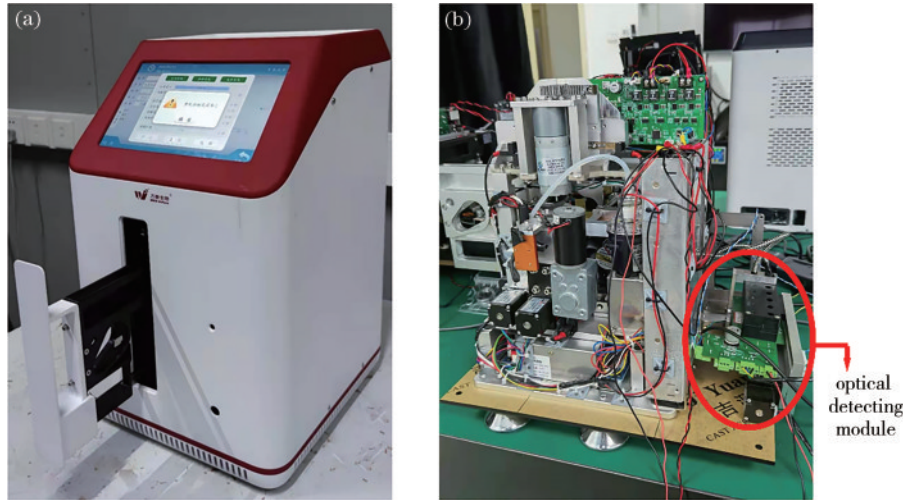


图 7 测试实验环境及条件:(a)全自动核酸检测装置;(b)内部结构图

Fig. 7 Test environment and conditions. (a) Fully automatic nucleic acid detection device; (b) internal structure diagram

使用标准荧光染料对直轴型多通道光学检测系统进行荧光信号检测重复性测试、荧光信号检测分辨率测试、通道间荧光信号串扰测试。配制由有机溶剂二甲基亚砜 DMSO 以 2 倍梯度进行稀释的 FAM(异硫氰酸荧光素)、HEX(6-HEX, SE)、ROX(R4526)等 3 种测试荧光染料。将 3 种荧光染料的高、中、低含量各取 50  $\mu\text{L}$ ,分别加入微流控芯片,利用对应通道对待测样

本进行连续 10 次荧光测量,记录数据并计算各通道变异系数(Coefficient of variation, CV)。如表 3 所示,不同通道的高、中、低含量样本的检测 CV 值,最大为 0.83%,最小为 0.02%,所有数值均小于 1%,说明本系统具有良好的检测重复性,稳定性较好,能够有效避免检测过程中带来的误差干扰<sup>[17-19]</sup>。

表 3 荧光染料检测重复性测试结果

Table 3 Fluorescent dye detection repeatability test results

Dye	FAM			HEX			ROX		
	High	Moderate	Low	High	Moderate	Low	High	Moderate	Low
CV / %	0.02	0.10	0.72	0.10	0.18	0.83	0.17	0.54	0.80

#### 3.2.2 分辨率测试

荧光信号检测分辨率测试的目的是测试荧光检测系统的分辨率,对其检测下限进行探究。将 3 种荧光染料加入微流控芯片腔室后,利用对应通道分别对所有待测样本进行荧光激发与采集。同时为进一步表征本系统的性能,使用美国伯乐商用 PCR 仪开展对照实验,设置扩增程序维持 25 $^{\circ}$ 进行采光<sup>[20]</sup>。结果如图 8 所示,本系统能够有效地检测并区别出不同梯度的荧光染料试剂, FAM 通道可达 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , HEX 通道可达 0.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , ROX 通道可达 0.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,测试结果与商用 PCR 仪在荧光强度随含量梯度变化的趋势基本保持一致,拥有较好的梯度分辨率。

#### 3.2.3 通道串扰测试

为了探究在进行多通道实时荧光定量 PCR 检测过程中,是否存在由于不同通道间激发光与荧光的光谱存在部分重叠而产生的荧光串扰,利用 3 种激发光对各个通道及其对应染料依次激发,记录对应激发状态下的采样荧光值,并用超纯水设置对照组,通道串扰数据直方图如图 9 所示。结果显示,荧光染料仅在对对应通道激发时会产生较高的荧光强度,其余通道对其激发所产生的荧光最高不超过对应通道激发产生荧光强度的 20%<sup>[21]</sup>。故所提设计的多通道直轴光学检测模块在检测时,通道间不会产生荧光串扰,验证了该系统在多重检测方面的可行性。

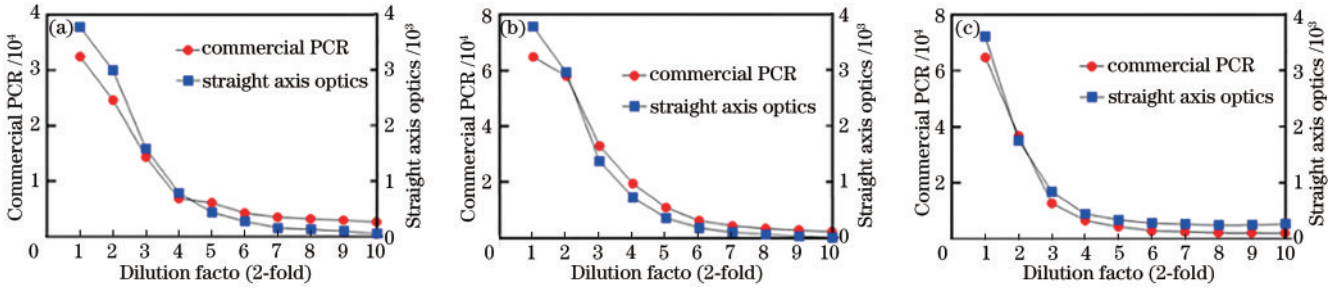


图 8 直轴多通道光学检测系统与商用 PCR 仪分辨率对比。(a) FAM; (b) HEX; (c) ROX

Fig. 8 Resolution comparison between the straight-axis multi-channel optical detection systems and commercial PCR instruments.

(a) FAM; (b) HEX; (c) ROX

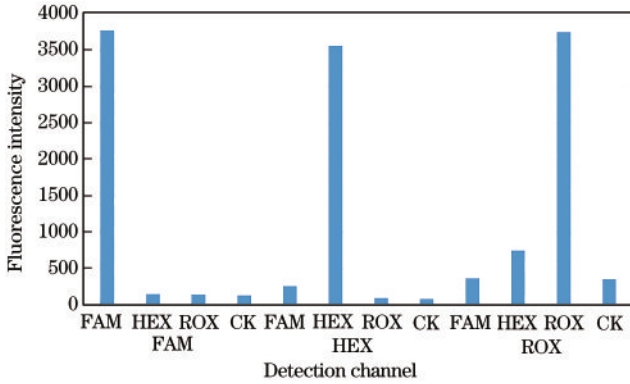


图 9 通道串扰数据直方图

Fig. 9 Channel crosstalk data histogram

3.2.4 新冠病毒标准品测试

使用多通道扩增检测结果来验证本系统能否完

成多通道核酸检测。将本系统集成于自主设计的聚合酶链式反应装置上,使用中国计量科学研究所新型冠状病毒标准品(新型冠状病毒全序列假病毒核糖核酸标准物质)进行系统的性能评估测试。主要检测试剂为 PCR 聚合酶(Takara 公司)、脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP)、缓冲物质。本实验具体体系为 DEPC 水 23.6  $\mu\text{L}$ 、dNTPs (2.5  $\mu\text{mol/L}$ ) 4  $\mu\text{L}$ 、 $10^* \text{FBI}$  4  $\mu\text{L}$ 、COVID-19-F1 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、COVID-19-R11 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、COVID-19-P1 (10  $\mu\text{mol/L}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 、Hs Taq (5 U/ $\mu\text{L}$ ) 0.4  $\mu\text{L}$ 、聚合酶 0.24  $\mu\text{L}$ 、COVID-19 标准品 5  $\mu\text{L}$ 。进行 30 次重复实验<sup>[22-23]</sup>，“样本进、结果出”，得到直轴型多通道光学检测系统的检测结果如图 10 所示,表明本光学系统可以较好地完成基于 POCT 的多通道实时荧光检测<sup>[24]</sup>。

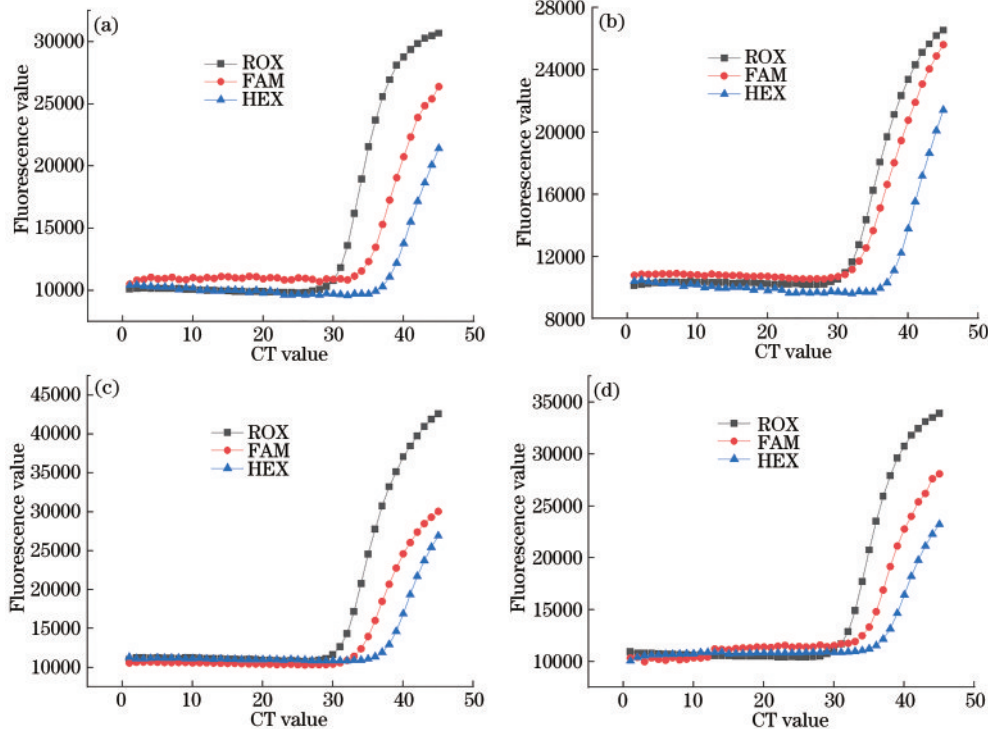


图 10 直轴型多通道光学检测系统检测曲线。(a)随机结果 1;(b)随机结果 2;(c)随机结果 3;(d)随机结果 4

Fig. 10 Detection curves of straight-axis multi-channel optical detection systems. (a) Random result 1; (b) random result 2; (c) random result 3; (d) random result 4

## 4 结 论

设计了一个基于多通道集成与切换模块的直轴型多通道光学检测系统,实现了多通道核酸实时荧光检测。系统 CV 值最小可达 0.02%;3 个测试通道通道分辨率,可达 1.56  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、0.49  $\mu\text{g}/\text{mL}$  和 0.63  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ;不存在荧光串扰现象,可以较好地完成新冠病毒多通道实时荧光检测。检测性能与目前商用仪器保持一致,同时拥有良好的 POCT 检测能力及 POCT 系统适配性。

### 参 考 文 献

- [1] Shen M Z, Zhou Y, Ye J W, et al. Recent advances and perspectives of nucleic acid detection for coronavirus[J]. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 2020, 10(2): 97-101.
- [2] Wang J H, Wang C H, Lee G B. Sample pretreatment and nucleic acid-based detection for fast diagnosis utilizing microfluidic systems[J]. *Annals of Biomedical Engineering*, 2012, 40(6): 1367-1383.
- [3] Slusny C, He Y, Yeung E S. Light-emitting diode-induced fluorescence detection of native proteins in capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2005, 26(21): 4197-4203.
- [4] Lin B S, Yang Y C, Ho C Y, et al. A PDMS-based cylindrical hybrid lens for enhanced fluorescence detection in microfluidic systems[J]. *Sensors*, 2014, 14(2): 2967-2980.
- [5] Yang X P, Gao H H, Qian F, et al. Internal standard method for the measurement of doxorubicin and daunorubicin by capillary electrophoresis with in-column double optical-fiber LED-induced fluorescence detection [J]. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2016, 117: 118-124.
- [6] 唐宇, 王洪, 邓诚先, 等. 基于光纤束传感器结构的激光诱导荧光检测系统的研制[J]. *传感技术学报*, 2007, 20(12): 2713-2715.  
Tang Y, Wang H, Deng C X, et al. Development of a laser-induced fluorescence detection system based on optical fiber beam sensor[J]. *Chinese Journal of Sensors and Actuators*, 2007, 20(12): 2713-2715.
- [7] Ma Y T, Zeng L, Zhang J H. A fluorescence detection optical system for real-time quantitative PCR[J]. *Proceedings of SPIE*, 2020, 11548: 115481U.
- [8] Whiting C E, Dua R A, Duffy C F, et al. Determining under- and oversampling of individual particle distributions in microfluidic electrophoresis with orthogonal laser-induced fluorescence detection[J]. *Electrophoresis*, 2008, 29(7): 1431-1440.
- [9] 程真, 司赶上, 李振钢, 等. 基于自适应差分进化算法的 LED 光谱匹配[J]. *光学学报*, 2022, 42(9): 0930004.  
Cheng Z, Si G S, Li Z G, et al. LED spectral matching based on adaptive differential evolution algorithm[J]. *Acta Optica Sinica*, 2022, 42(9): 0930004.
- [10] 臧留琴, 张镇西, 苗宝刚, 等. 多重定量 PCR 系统中多色荧光检测和光谱串扰校正方法[J]. *光学学报*, 2014, 34(1): 0117002.  
Zang L Q, Zhang Z X, Miao B G, et al. Multicolor fluorescence detection in the multiplex quantitative PCR system and spectra crosstalk correction method[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(1): 0117002.
- [11] 杜曼殊, 林晓辉, 杨佳羽, 等. 核酸检测系统荧光激发光路的标定方法[J]. *激光与光电子学进展*, 2022, 59(7): 0712003.  
Du M S, Lin X H, Yang J Y, et al. Calibration method of fluorescence excited light path in nucleic acid detection system[J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2022, 59(7): 0712003.
- [12] 彭年才, 张镇西, 李政, 等. 基于高通量微弱荧光快速检测的高分辨熔解曲线分析仪[J]. *光学学报*, 2012, 32(2): 0217001.  
Peng N C, Zhang Z X, Li Z, et al. High resolution melting analyzer based on high throughput fast detection of weak fluorescence[J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(2): 0217001.
- [13] Huang S L, Wu J G, Dai H Z, et al. Development of amplification system for point-of-care test of nucleic acid [J]. *Computer Methods in Biomechanics and Biomedical Engineering*, 2022, 25(9): 961-970.
- [14] Chang W J, Zhou K, Wang Z L, et al. An analytical method for cold optical lens design based on Light Tools [J]. *Proceedings of SPIE*, 2021, 12061: 120611W.
- [15] Fang Y, Wang L Q, Xu J, et al. The analysis on fluorescence signals of the multi-channel DNA analyzer [C]//*Proceedings of 2011 International Conference on Electronics and Optoelectronics*, July 29-31, 2011, Dalian, China. New York: IEEE Press, 2011: 331-334.
- [16] 谷鹏阳. 应用于自动化核酸分析检测工作站的荧光检测系统的研究与设计[D]. 南京: 东南大学, 2015.  
Gu P Y. Research on fluorescent detection system applying on automatic testing workstation of nucleic acid [D]. Nanjing: Southeast University, 2015.
- [17] 韦族武, 杨森, 吴名, 等. 近红外二区荧光手术导航探针研究进展[J]. *中国激光*, 2022, 49(5): 0507102.  
Wei Z W, Yang S, Wu M, et al. Recent progress in near-infrared- II fluorescence imaging probes for fluorescence surgical navigation[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2022, 49(5): 0507102.
- [18] 祁恒, 王贤松, 陈涛, 等. PMMA 基连续流式 PCR 微流控芯片的 CO<sub>2</sub> 激光直写加工与应用[J]. *中国激光*, 2009, 36(5): 1239-1245.  
Qi H, Wang X S, Chen T, et al. Fabrication and application of PMMA continuous-flow PCR microfluidic chip with CO<sub>2</sub> laser direct-writing ablation micromachining technique[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2009, 36(5): 1239-1245.
- [19] Rao S N, Manissero D, Steele V R, et al. A systematic review of the clinical utility of cycle threshold values in the context of COVID-19[J]. *Infectious Diseases and Therapy*, 2020, 9(3): 573-586.
- [20] 王立强, 倪旭翔, 陆祖康, 等. 生物芯片的激光共聚焦扫描检测[J]. *中国激光*, 2004, 31(s1): 307-309.  
Wang L Q, Ni X X, Lu Z K, et al. Fluorescence



- detection for biochips by laser confocal scanning[J]. Chinese Journal of Lasers, 2004, 31(s1): 307-309.
- [21] Gupta N, Augustine S, Narayan T, et al. Point-of-care PCR assays for COVID-19 detection[J]. Biosensors, 2021, 11(5): 141.
- [22] Hansen C H, Michlmayr D, Gubbels S M, et al. Assessment of protection against reinfection with SARS-CoV-2 among 4 million PCR-tested individuals in Denmark in 2020: a population-level observational study [J]. The Lancet, 2021, 397(10280): 1204-1212.
- [23] Li Y C, Li J, Zhang Y, et al. Development of an automatic integrated gene detection system for novel severe acute respiratory syndrome-related coronavirus (SARS-CoV2) [J]. Emerging Microbes & Infections, 2020, 9(1): 1489-1496.
- [24] Corman V M, Landt O, Kaiser M, et al. Detection of 2019 novel coronavirus (2019-nCoV) by real-time RT-PCR[J]. Euro Surveillance, 2020, 25(3): 2000045.