

文章编号: 0253-2239(2007)03-0499-6

先进的微生物芯片检测系统及其应用*

黄国亮^{1, 2, 3} 邓 橙^{1, 2, 3} 徐书宽^{1, 2, 3} 朱 疆^{1, 2, 3} 董中华^{1, 2, 3} 杨 阳^{1, 2, 3}
阳小勇³ 张 亮³

1 清华大学生物科学与技术系, 北京 100084
2 清华大学系统生物学研究中心, 北京 100084
3 生物芯片北京国家工程研究中心, 北京 102206

摘要: 发展了一种先进的微生物芯片检测方法, 并研制用于芯片检测的新型数字化成像扫描检测系统。采用激光诱导荧光的检测原理设计一种新颖的 CCD 数字化成像扫描检测系统结构, 荧光信号采集端的数值孔径 $NA=0.72$, 工作距离 3.22 mm, 系统检测灵敏度小于每平方米 1 个荧光分子。以微生物大肠杆菌和黄单胞菌检测为例, 设计基因芯片, 并应用所研制的芯片检测系统实现了微生物的正确鉴定, 提供了一种高效的食品安全检测整体解决方法。实验结果表明两种微生物的芯片检测实验结果稳定可靠, 与国外共焦扫描仪检测的结果完全一致。

关键词: 医用光学与生物技术; CCD 扫描检测系统; 荧光; 微生物芯片

中图分类号: O43 文献标识码: A

Novel Detection System of Microbe Chip and Its Application

Huang Guoliang^{1,2,3} Deng Cheng^{1,2,3} Xu Shukuan^{1,2,3} Zhu Jiang^{1,2,3}
Dong Zhonghua^{1,2,3} Yang Yang^{1,2,3} Yang Xiaoyong³ Zhang Liang³

1 Department of Biological Science and Biotechnology, Tsinghua University, Beijing 100084
2 Research Center of System Biology, Tsinghua University, Beijing 100084
3 National Engineering Research Center for Beijing Biochip Technology, Beijing 102206

Abstract: An advanced microbe chip testing method was put forward, and a new digital imaging scanning system for testing biochips was developed. A novel CCD scanning system with laser induced fluorescence for biochip detection was proposed, with a high numerical aperture $NA=0.72$ for collecting fluorescence, long working distance 3.22 mm and high sensitivity less than 1 fluorescent molecule / μm^2 . Microbe chip was designed and tested by the above novel CCD scanning system, which provided a whole solution scheme for efficient food safety inspection. An example of testing escherichia coli and xanthomonas campestris was shown and proved the stability and creditability of the system. The experimental results obtained by the developed digital imaging scanning system indicated the same correct identification of microbe as the commercial confocal scanner.

Key words: medical optics and biotechnology; CCD scanning system; fluorescence; microbe chip

1 引 言

生物芯片需要有专门的光电混合检测装置来获取并显示其生物分子检测结果信息, 如激光诱导荧光的检测方法^[1]。生物分子的光电混合检测方法有

许多, 如荧光显微成像方法、表面等离子共振生物传感检测方法、激光共焦扫描检测方法、光子扫描隧道显微方法等^[1~5]。在荧光显微成像检测方法中, 通常使用一台荧光显微镜, 然后在显微镜的数字化输

* 国家 863 计划 (2006AA020701, 2006AA020803)、国家 973 计划 (2006CB705700)、浙江省科技攻关重点项目 (2006C21G3210005)、清华大学基础研究基金 (052205003) 和清华-裕元医学科学研究基金 (40000510B) 资助课题。

作者简介: 黄国亮 (1966—), 男, 湖南湘阴人, 副研究员, 博士, 主要从事光学仪器研究。

E-mail: tshgl@mail.tsinghua.edu.cn

收稿日期: 2006-04-27; 收到修改稿日期: 2006-08-28

出接口端安装一台制冷 CCD 探测器来接收显微图像,不过这种常规 CCD 荧光显微镜方法是非扫描的,一次只能采集其设定探测面积范围内(小于 1 mm)所有点的光强信号,适合于芯片的观察使用。为了获得较高的检测灵敏度,常常采用制冷 CCD 和增强 CCD(Intensified CCD, ICCD),相对比较昂贵。提高检测分辨力和扩大检测区域范围是显微成像的发展方向^[3]。在激光共焦扫描检测方法中,调焦控制技术是保证共焦图像质量的关键^[4]。激光共焦扫描检测方法的优点是可以进行大面积尺寸物体的扫描检测,周围环境的影响比较小,背景低;其缺点是系统相对比较复杂,检测分辨力不可能很小(一般大于 5 μm),再小以后运动平台的精度就难以保证,成本也会显著提高。

大多数单位由于受条件的限制主要是从事单一的生物芯片技术研究或开展单一的相关检测仪器开发,很少有人能同时将生物芯片技术与相关检测仪器结合起来研究,因而无法从生物芯片与检测仪器两方面给予完整的介绍。本文利用激光诱导荧光的检测原理将显微成像与扫描重构方法结合起来,设计了一种新颖的 12 个镜片组成的双焦面显微成像 CCD 扫描检测系统结构,并针对荧光信号接收与物镜数值孔径的 2 次幂成正比的变化关系,设计了一种大数值孔径($NA=0.72$, Numerial Apture)、长工作距离(3.22 mm)的检测系统结构。与传统的显微镜结构相比具有大数值孔径长工作距离的特点(通常显微物镜当数值孔径大于 0.6 时,其工作距离小于 1 mm,并且随着数值孔径的增加,其工作距离越来越小)。然后进行系统集成研制成一种先进的科学仪器——微阵列芯片扫描仪,仪器的检测灵敏度小于每平方微米 1 个荧光分子。同时,以微生物检测为对象,将该仪器与微生物芯片配套,成为食品安全检测的整体解决方案。最后以大肠杆菌和黄单胞菌检测为例,详细介绍仪器在微生物芯片检测中的应用,并给出了两种微生物的芯片检测实验结果,以便读者对生物芯片技术和相关的检测仪器有一个完整的了解。

2 基本原理与方法分析

2.1 数值孔径对荧光信号探测的影响

生物分子被激发所产生的荧光可以等效看成是一个球面波,球面波在传播过程中的波前振幅可以表示为

$$\xi(R) = \frac{K_0}{R} \exp[i(\omega t - kR)], \quad (1)$$

其中 K_0 为荧光信号球面波的波前常量, ω 为光波的角速度, k 为光波的波数, R 为球面波波前离开荧光发光中心的距离, t 是时间。

一个光学系统接收荧光信号生成图像,产生的光强对应的是一定立体角内的球面波的信号强度,如图 1 所示,荧光信号强度如(2)式所示:

$$I(Z) = \iint \xi(x, y, Z) \times \xi^*(x, y, Z) dx dy \approx \frac{K_0^2}{Z^2} \pi r^2, \quad (2)$$

其中 Z 为荧光发光中心到探测物镜第一个镜片的距离, r 为物镜的有效探测面的半径。

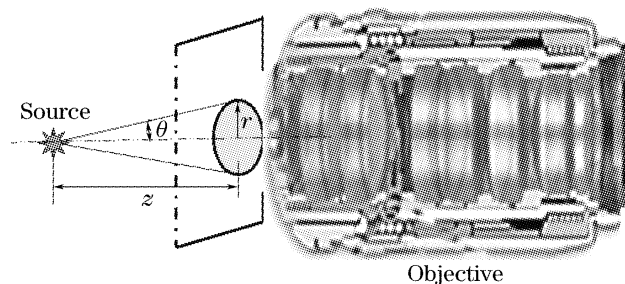


图 1 物镜接收荧光信号的几何光学图示

Fig. 1 Geometry of fluorescence collection of objective

在显微成像应用中,发光物体通常在物镜的焦平面上,物镜的有效探测面的半径 r 为

$$r = Z \cdot \tan \theta, \quad (3)$$

其中 θ 为半孔径角。物镜的数值孔径为 $NA = n \sin \theta$, n 为荧光到达物镜前所通过检测环境的折射率,如果检测环境是空气,则 $n = 1$ 。当 θ 比较小时,(3)式可以表示为

$$r = Z \cdot NA/n. \quad (4)$$

将(4)式代入(2)式,得到荧光信号强度为

$$I(Z) \approx K_0^2 \pi NA^2 / n^2. \quad (5)$$

从(5)式可以看出,在生物荧光信号检测过程中荧光信号强度与检测系统的数值孔径的平方成正比的关系,作为光学系统的设计,数值孔径越大荧光信号检测越强。同时,只有在焦平面产生的荧光信号才能够最大限度地发挥物镜的有效数值孔径的作用。

2.2 生物芯片检测技术的分子生物学原理

基于生物芯片技术的生物分子检测主要过程如图 2 所示。

根据图 2 所示的流程,首先制备一种生物分子载体——基片,使其表面富含氨基,有利于生物分子在基片表面的结合与固定。第二步是将生物分子以微阵列的形式分配到载体基片上——点样,以共价键形式牢固地固定在玻璃基片表面。第三步是多聚

酶链式反应(Polymerase chain reaction, PCR)扩增与荧光标记^[7],大量复制生物分子并带上荧光标记,以便提高检测的灵敏度。第四步是杂交反应,在适当的温湿度条件下让被测样品多聚酶链式反应扩增产物与玻璃基片上的核酸探针按照碱基配对原则杂

交,在具有特异性的互补配对分子之间能够形成稳定的双链结合在一起而被保留下来。第五步是荧光信号检测,利用前面介绍的激光诱导荧光的原理来检测杂交反应后保留下来的特异性互补配对生物分子,生成图像显示出来,以便观察和分析。

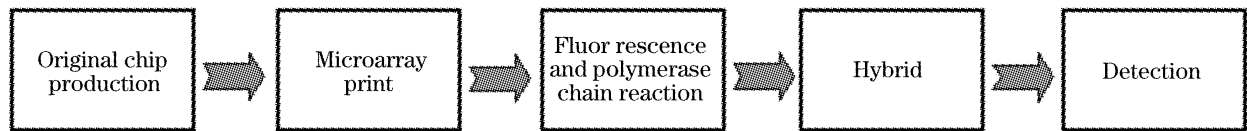


图 2 生物芯片应用的基本流程图示

Fig. 2 Flow chart of biochip application.

利用生物芯片技术配合使用荧光信号检测仪器,即可以进行生物分子检测,荧光信号强度与分子数成正比。

3 实验方法和系统

3.1 微生物芯片设计与制作

利用生物芯片技术与激光诱导荧光的方法进行微生物检测,分别选择大肠杆菌和黄单胞菌各一个特异性基因(与其它基因没有同源性)。每个基因都设计两对引物,其中一对引物不用荧光染料 Cy3 标记,另一对引物用荧光染料 Cy3 标记 5' 末端,这样一共得到 4 对引物。使用未标记荧光染料的引物,以细菌基因组 DNA(deoxyribonucleic acid, 脱氧核糖核酸)为模板进行多聚酶链式反应扩增生成 DNA 片段作为探针样品,采用机械手点样仪进行微液样分配点样将这些探针样品固定在氨基修饰的玻璃基片上,制作成微生物芯片,如图 3 所示。标记有荧光染料的引物用于扩增被测样品的基因组 DNA 作为杂交样品。

在图 3 中,左边为一张设计好的微生物芯片,包含了 4 个微阵列探针区域,可以同时进行 4 次相同(或不同)的对照实验,每个区域上有一个 6×6 的微

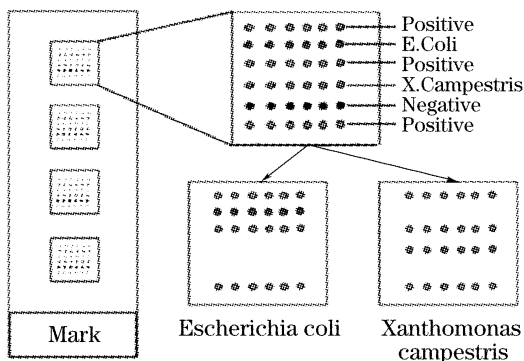


图 3 微生物芯片设计的结构图示

Fig. 3 Structure of microbe chip design

阵列探针点阵如图 5 右上角点阵图形所示。在图 3 右上角点阵图形中,共有 6 行,每一行有 6 个相同的探针点,用来进行重复对照。从上面开始,第 1、第 3 和第 6 行是用 Cy3 标记的核酸片段样品点制的阳性探针,第 5 行是用 50% 的二甲亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)样品点制的阴性探针,阳性探针和阴性探针用来监测芯片反应过程是否出现问题;正常情况下,阳性探针给出高亮度信号,而阴性探针给出与背景相同的低亮度信号;否则,则表明芯片反应过程中出现了异常情况,本次实验结果无效。第 2 行是由非标记的大肠杆菌特异性核酸片段样品点制的大肠杆菌基因识别探针,第 4 行是由非标记的黄单胞菌特异性核酸片段样品点制的黄单胞菌基因识别探针。

3.2 微生物芯片检测系统的构建

基于激光诱导荧光的生物芯片检测原理方法,将 CCD 显微镜成像技术和共焦扫描技术紧密结合在一起,构建了一种新颖的 CCD 成像扫描的生物芯片检测实验系统,如图 4 所示。系统中物镜由 12 个镜片组成,荧光会聚镜由 5 个镜片组成,整个系统设计仅使用了 3 种普通光学玻璃材料。系统荧光信号

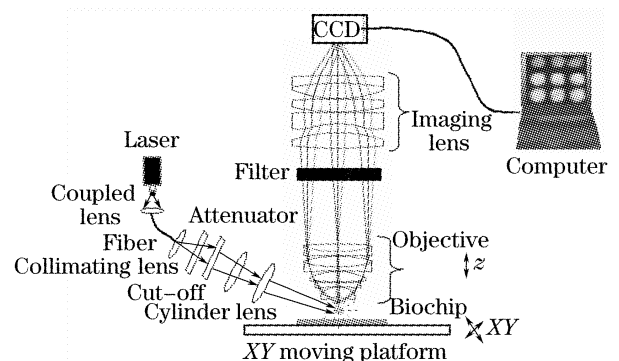


图 4 一种新颖的生物芯片 CCD 成像扫描检测系统结构图

Fig. 4 A novel CCD scanning system for biochip detection

接收端数值孔径为 $NA = 0.72$, 工作距离为 3.22 mm 。对于常规的显微物镜, 当数值孔径大于 0.6 时, 其工作距离小于 1 mm , 并且随着数值孔径的增加, 其工作距离越来越小; 同时, 一个数值孔径为 0.7 左右的显微物镜, 其镜片数通常不小于 9 , 所使用的光学玻璃材料一般不小于 5 。由此可见, 本文设计的由 7 个镜片 3 种光学玻璃材料组成的 0.72 数值孔径的长工作距离 (3.22 mm) 物镜在性能指标和工艺性方面具有明显的优越性。

在图 4 中, 采用波长为 532 nm 固体激光器作为激发光源, 光强为 110 mW 左右, 发射出来的激光由耦合镜输入光纤, 再由准直镜扩展经衰减器调整强度, 最后由柱面镜整形照射生物芯片, 激发生物分子产生荧光。衰减片可以旋转, 以调节入射光强。斩光器用来控制激光的照明时间, 只有在扫描检测过程中才让激光通过, 其它时间将切断激光, 以便减少激光对生物样品的光漂白影响。芯片上生物分子标记的荧光分子在激光激发下产生波长为 570 nm 左右的荧光, 由物镜捕获后变成平行光, 然后由滤色片滤除激发光和其他杂光, 仅让荧光通过, 这些被滤色片过滤后的荧光由会聚镜头捕获成像在 CCD 上, 通过光电转换后由图像采集卡输入计算机生成数字化的可视图像, 一次可以对 $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 的芯片区域进行图像采集。XY 运动载物平台用来改变芯片的检测位置, 对整个芯片进行全平面扫描检测, 生成一系列小图, 然后通过计算机软件将这些图像进行一定的位置重叠修正拼图, 最后生成一幅显示全部芯片信息的数字图像, 最大可以检测 $20 \text{ mm} \times 60 \text{ mm}$ 的芯片区域。通过专门的图像分析软件提取扫描图像中荧光信号斑点的相对荧光强度值, 进行阴阳性判断, 显示图像和信息强度矩阵, 并给出参考结论。

为了实现大面积反射照明生物芯片激发荧光信号, 图 4 中微阵列芯片扫描仪设计了一种斜入射照明结构方案, 采用柱面镜进行光束整形, 使斜入射椭圆光斑到达被测芯片表面时被整形成为一个圆形光斑, 如图 5 所示, 这样就能够保证入射照明光斑的均匀性。

采用传递函数评价系统的性能指标, 如图 6 所示, 控制光学传递函数 (Optical transfer function, OTF) 大于 10% 时系统的检测分辨力可以达到 250 lp/mm 以上。由于在系统设计中实现了大数值孔径 ($NA=0.72$) 荧光信号检测, 即使采用普通视频型低照度 CCD 依然可以使系统的检测灵敏度达到小于每平方微米 1 个荧光分子。采用 Perkin Elmer 公司

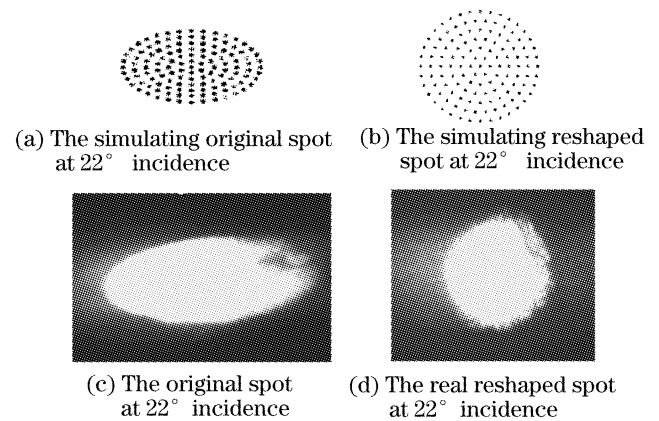


图 5 整形前后的斜入射照明光斑对比

Fig. 5 Contrast of the real reshaped spot to the original one

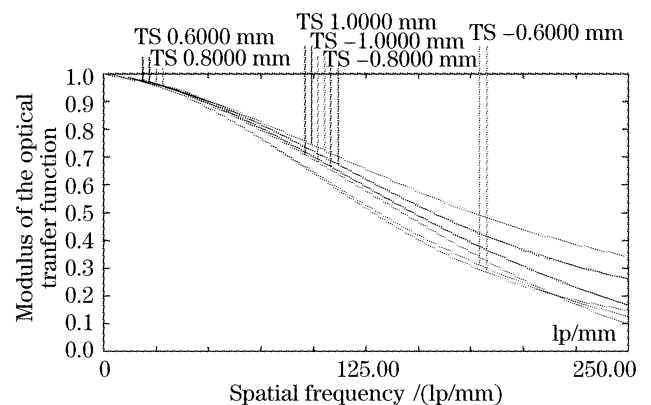


图 6 系统的调制传函曲线

Fig. 6 Modulation transfer function of system

(美国珀金-埃尔默公司) 的标准共焦扫描仪 Scanarray Express (灵敏度为每平方微米 0.1 个荧光分子) 对同一张梯度样品芯片进行灵敏度检测实验, 利用信噪比计算, 得到扫描图像和检测灵敏度实验结果如图 7 所示, 图中显示微阵列芯片扫描仪的检测灵敏度为每平方微米 0.49 个荧光分子。该系统目前已经完成集成定型并实现了产业化, 是一种先进的科学仪器——微阵列芯片扫描仪。

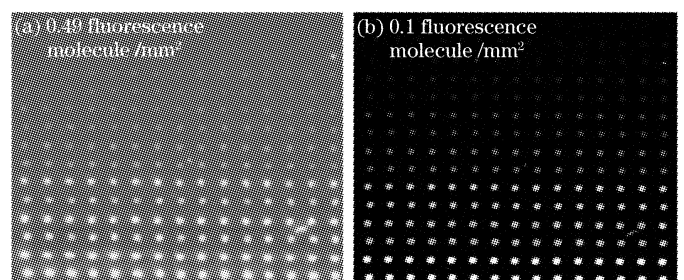


图 7 系统的灵敏度检测实验

Fig. 7 Sensitivity of CCD scanning system

4 实验研究与结果分析

利用上面设计的微生物芯片和微阵列芯片扫描

仪进行 2 种微生物的检测鉴定实验研究。首先对被检测样品进行分离纯化处理,提取出基因组 DNA;然后使用前面设计的标记有荧光染料 Cy3 的引物,以被测样品基因组 DNA 为模板,在多聚酶链式反应扩增仪中进行多聚酶链式反应,被测样品的基因组 DNA 特异性序列片段将被复制 10^6 倍以上,作为杂交样品。

在杂交仪中将被测样品的基因组 DNA 特异性序列片段与芯片上的探针进行杂交反应,杂交反应的基本实验条件与过程如下。

1) 配制一个 $12\mu\text{l}$ 的杂交液体系(表 1)。

表 1 $12\mu\text{l}$ 体系杂交液的配制

Table 1 $12\mu\text{l}$ hybrid solution system

Original molar ratio / %	End molar ratio / %	Inject samples / μl
Formamide 100	Formamide 50	6
10 SDS	0.2 SDS	0.24
$20\times\text{SSC}$	$3\times\text{SSC}$	1.8
Sample genome DNA	—	4

SSC: Standard saline citrate/Sodium citrate, 柠檬酸钠

SDS: Sodium dodecyl sulfate, 十二烷基磺酸钠

2) 将以上杂交液用移液器混匀后 3000 r/min 离心 30 s, $95\text{ }^\circ\text{C}$ 热变性 3 min(在多聚酶链式反应仪

中),冰浴骤冷 1 min,然后注入芯片反应腔中,放入 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴锅中杂交 2 h,使样品与探针充分反应。

3) 依次用洗液 I、II 清洗杂交后的芯片,然后将芯片取出进行风干处理。

洗液 I : $2\times\text{SSC}$, 0.2% SDS, 温度 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 。

洗液 II : $0.2\times\text{SSC}$ (洗去残留的 SDS), 温度 $42\text{ }^\circ\text{C}$ 。

4) 利用微阵列芯片扫描仪扫描反应后的芯片,就能检测出待测样品中是否含有大肠杆菌和黄单胞菌。如图 8 所示,是黄单胞菌被检测出来的实验结果,可以看到椭圆圈勾勒出的是芯片上黄单胞菌的检测行(第 4 行),结果分析栏中黄单胞菌显示“阳性”。参看由系统对图 8 所示的扫描检测结果自动进行的数据提取与分析处理,输出的信号去除背景并进行阈值处理后的数据矩阵如表 2 所示,由此可以看出第 1、第 3 和第 6 行的阳性探针显示高亮信号(大于判断阈值 15),第 5 行的阴性探针显示零(低亮)信号,所以整个芯片反应检测过程是正常的,第 2 行大肠杆菌特异性探针的识别信号也是低亮信号(小于判断阈值 15)呈阴性,第 4 行黄单胞菌特异性探针的识别信号是高亮信号(大于判断阈值 15)呈阳性,因此图 8 给出的参考判定是正确的。

表 2 图 8 中扫描图像对应的数据矩阵输出结果

Table 2 Data matrix of xanthomonas campestris tested in Fig. 8

Column Row	1	2	3	4	5	6
1.00	134.00	134.00	148.00	140.00	128.00	143.00
2.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
3.00	152.00	150.00	133.00	150.00	146.00	147.00
4.00	76.00	82.00	74.00	79.00	83.00	85.00
5.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
6.00	147.00	140.00	139.00	135.00	145.00	140.00

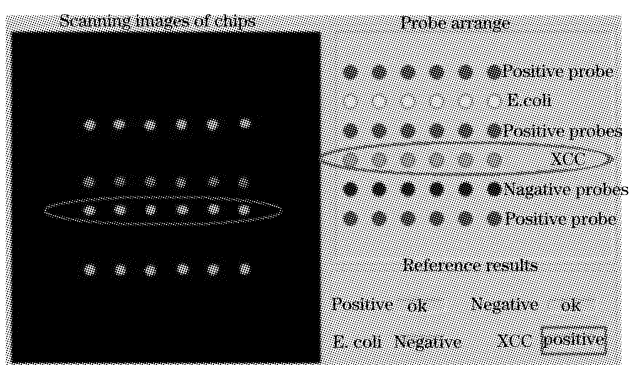


图 8 黄单胞菌的检测结果

Fig. 8 Experimental result of xanthomonas campestris tested

根据添加含不同种类微生物多聚酶链式反应扩增产物的杂交液,微阵列芯片扫描仪扫描后会给出不同的检测结果,通常有以下 4 种情况出现,如图 9 所示,其中(a)~(d)是微阵列芯片扫描仪的扫描检测实验结果,(e)~(h)是同一张微生物芯片用 Scanarray Express 共焦扫描仪进行扫描后的检测结果。在图 9 中,(a) 为杂交液中含有大肠杆菌的检测结果,(b) 为杂交液中含有黄单胞菌的检测结果,(c) 为杂交液中同时含有大肠杆菌和黄单胞菌的检测结果,(d) 为杂交液中没有含大肠杆菌和黄单胞菌的检测结果。第 1、第 3 和第 6 行的阳性探针显示高亮信号,第 5 行的阴性探针显示零(低亮)信号,

这些质控参照说明整个芯片反应与检测过程是正常的,实验结果正确、有效。Scanarray Express 共焦扫描仪的检测结果(e)~(h)依次对应大肠杆菌、黄

单胞菌、大肠杆菌和黄单胞菌、没有含大肠杆菌和黄单胞菌等四种情况。

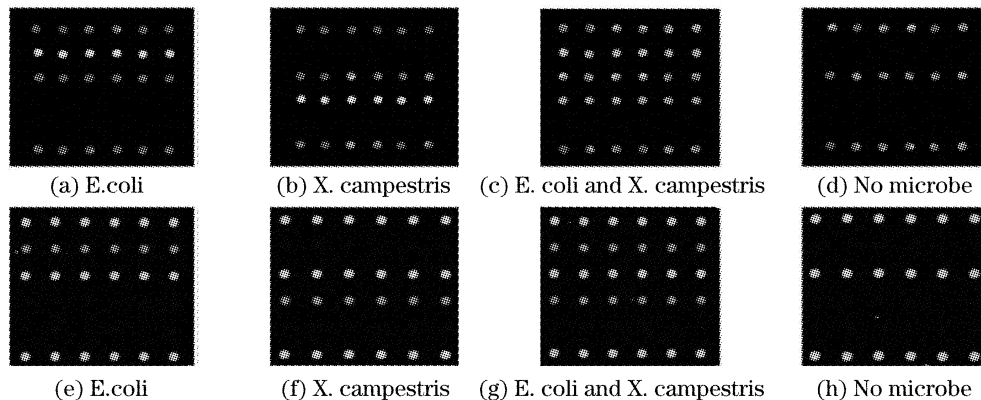


图 9 多种微生物的鉴定检测结果

Fig. 9 Experimental results for different microbe tested

从以上结果可以看出,两种扫描仪的扫描软件在伪彩色处理方面存在一定的差异,但微生物的识别鉴定结果是完全一致的。

5 结 论

本文以两种微生物检测为例系统地介绍了生物芯片的检测方法与激光诱导荧光检测系统的构建方案,通过理论分析与实验验证表明构建的微阵列芯片扫描仪和设计制作的微生物芯片工作是正常的,所得实验结果是正确的。同时,与常规显微成像和共焦扫描方法相比,设计的 CCD 扫描检测系统具有大数值孔径($NA=0.72$)、长工作距离(3.22 mm)、面成像与扫描相结合等先进特点。分析表明生物芯片检测系统所接收的荧光信号强度与物镜数值孔径的 2 次幂成正比的变化关系,数值孔径越大荧光信号越强,由此可见文中检测系统的结构方案对提高生物芯片的检测灵敏度是非常有效的,通过实验研究也证明了在系统中采用普通低照度 CCD 进行光电接收依然可以保证仪器的检测灵敏度达到小于每平方微米 1 个荧光分子,而在常规的显微成像检测当中需要采用制冷 CCD 进行长时间曝光积分才能达到这种检测灵敏度水平。论文最后以微生物大肠杆菌和黄单胞菌检测为对象,详细介绍了生物芯片检测技术的应用,给出了两种微生物的芯片检测实验结果,让读者对生物芯片技术、激光诱导荧光检测方法

构建等有一个完整的了解。

参 考 文 献

- 1 Cheng Jin, Huang Guoliang. *Biochip: Life Information CPU* [M]. Shanghai: Juvenile & Children's Publishing House, 2005. 1~150 (in Chinese)
程 京,黄国亮. 生物芯片:生命信息 CPU[M]. 上海:少年儿童出版社,2005. 1~150
- 2 Gu Zhengtian, Feng Shimen, Liang Peihui *et al.*. Sol-gel film sensor based on surface plasmon resonance [J]. *Acta Optica Sinica*, 2001, **21**(1): 83~87 (in Chinese)
顾铮天,冯仕猛,梁培辉等. 表面等离子体激元共振溶胶-凝胶薄膜传感器[J]. 光学学报, 2001, **21**(1): 83~87
- 3 Zhuo Ning, Sun Huayan, Zhang Haijiang. A new approach for improvement of CCD imaging resolution [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(6): 777~780 (in Chinese)
卓 宁,孙华燕,张海江. 一种新的提高 CCD 成像分辨力的方法 [J]. 光学学报, 2005, **25**(6): 777~780
- 4 Zhu Kongfeng, Jiang Wei, Gao Zhan *et al.*. Focusing window choice and parameters determination in automatic focusing system [J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(6): 836~840 (in Chinese)
朱孔凤,姜 威,高 赞等. 自动聚焦系统中聚焦窗口的选择及参量的确定 [J]. 光学学报, 2006, **26**(6): 836~840
- 5 Wu Shifa, Yao Junen, Jian Guoshu *et al.*. The progress in PSTM [J]. *Acta Optica Sinica*, 1998, **18**(2): 191~198 (in Chinese)
吴世法,姚俊恩,简国树等. 光子扫描隧道显微镜的进展 [J]. 光学学报, 1998, **18**(2): 191~198
- 6 Guangshun Yi, Baoquan Sun, Fengzhen Yang *et al.*. Synthesis and characterization of high-efficiency nanocrystal up-conversion phosphors; ytterbium and erbium codoped lanthanum molybdate [J]. *Chemistry of Materials*, 2002, **14**: 2910~2914
- 7 Sheng-Ce Tao, Di Jiang, Hong-Li Lu *et al.*. One-tube nested RT-PCR enabled by using a plastic film and its application for the rapid detection of SARS-virus [J]. *Biotechnology Letters*, 2004, **26**(3): 179~183