

基于色氨酸本征荧光测量的生物气溶胶检测技术研究

蔡舒窈^{1,2} 张 佩^{1,2} 朱玲琳^{1,2} 谢承科¹ 孙征宇¹ 程伟林¹ 赵永凯¹ 黄惠杰¹

(¹ 中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800)
² 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要 生物气溶胶与环境质量和人类健康密切相关。基于光学测量的气溶胶检测技术具有快速、无损和灵敏的优点,是目前的研究主流。而对检测系统的标定技术及其评价方法尚无国家标准可依。基于本征荧光测量技术,研制完成了一套针对包括病毒气溶胶在内的生物气溶胶检测装置。并在此基础上,以色氨酸气溶胶作为被检物,提出了一种生物气溶胶检测与标定方法。实验结果表明,研制的检测装置对色氨酸气溶胶具有良好的线性响应特性,线性相关系数 $R^2 \geq 0.99$,灵敏度达到 4000 L^{-1} 。证明了通过测量气溶胶中色氨酸含量检测生物气溶胶技术的可行性与可靠性。还探讨了利用多通道本征荧光检测技术实现对生物粒子种类进行预判别的可行性。

关键词 测量;生物气溶胶检测;本征荧光;标定;色氨酸

中图分类号 TN247 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201232.0512009

Research on Detection Technology of Bio-Aerosols with Tryptophan Intrinsic Fluorescence Measurement

Cai Shuyao^{1,2} Zhang Pei^{1,2} Zhu Linglin^{1,2} Xie Chengke¹
Sun Zhengyu¹ Cheng Weilin¹ Zhao Yongkai¹ Huang Huijie¹

(¹ Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)
² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Bio-aerosols are closely related to environment quality and human health. Aerosol detection technology with optical measurement method, which is rapid, nondestructive and sensitive, becomes to the mainstream of research. So far, there is no national standard about the evaluation and calibration method to the detection system. Based on the measurement of intrinsic fluorescence, a set of bio-aerosol detection equipment including virus aerosols is developed, with which a method of calibration is proposed using tryptophan as the target. The experimental results show a good linear response between the detection equipment to tryptophan aerosol with an excellent correlation ($R^2 \geq 0.99$), the sensitivity of 4000 L^{-1} . The research demonstrates the reliability of the bio-aerosol fluorescence detection by measuring the content of tryptophan. Further more, the feasibility of prejudgment to the species of bio-aerosol particles with the multi-channel fluorescence detection technology is discussed.

Key words measurement; bio-aerosol detection; intrinsic fluorescence; calibration; tryptophan

OCIS codes 280.1100; 300.2530; 120.1880; 260.2510

1 引 言

生物气溶胶是指大气与悬浮于其中的生物颗粒共同组成的多相体系,生物颗粒的粒径范围为

$10^{-3} \sim 10^2 \mu\text{m}$,包括细菌、真菌、病毒、花粉和孢子等微生物。生物气溶胶的组成与浓度直接影响环境质量与人类健康。因此,生物气溶胶检测技术的研究

收稿日期: 2011-10-14; 收到修改稿日期: 2011-12-28

基金项目: 上海市自然科学基金(11ZR1441700)资助课题。

作者简介: 蔡舒窈(1987—),女,硕士研究生,主要从事生物气溶胶检测技术方面的研究。

E-mail: caishuyao_1987@163.com

导师简介: 赵永凯(1978—),男,博士,副研究员,主要从事生物气溶胶监测技术与光电检测技术等方面的研究。

E-mail: darkskyhaha@siom.ac.cn(通信联系人)

有着重要意义,已得到了广泛的关注^[1]。基于光学测量的生物气溶胶检测技术具有快速、无损和灵敏等优点,是当前生物气溶胶检测技术的研究主流与热点。该技术一般基于光学原理对气溶胶粒子的形状、尺寸和本征荧光三个方面进行检测与分析,从而对其生物属性进行预判别^[2~4]。

本征荧光是指生物物质中含有的氨基酸(酪氨酸、色氨酸等)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)和核黄素等有机分子在特定波长光激发下发出的特有荧光^[5]。本征荧光是生物属性判别的重要依据之一。同时,由于不同微生物体中各种有机分子的比例不同,表现出的吸收光谱与发射光谱也有较大差异。通过对不同本征荧光波段的光谱强度的检测,利用标定与分析的手段得到各种有机分子的相对含量,可实现对生物气溶胶种类的预分类^[6]。

对含有微生物体(细菌、病毒等)的生物气溶胶进行检测需要在具有严格标准的生物学实验室中进行,而且检测系统的标定技术及其评价方法尚无国家标准可依。由此,寻求在普通实验室内能够对光学生物气溶胶检测装置进行标定与评价的方法就显得很重要。氨基酸存在于包括病毒在内的几乎所有生命体中,通过对其检测和分析,可以对气溶胶中的生物粒子进行较为精确的探测,但对其检测与标定涉及更多技术难点。氨基酸的吸收峰波长在300 nm以下,发射峰位于300~420 nm之间,斯托克斯位移相对较小,因此对荧光检测系统的信噪比要求较高,设计加工难度大^[7]。本文旨在研究生物气溶胶检测与标定技术,在研制的生物气溶胶检测装置的基础上,选取色氨酸为被检物,建立了一套标定系统,对该检测装置进行了标定与分析。并通过实验探讨利用多通道荧光检测方法分析被检生物粒子中不同组成物质含量的可行性。

2 生物气溶胶检测装置

本文所提出的生物气溶胶检测装置包括气溶胶粒子富集单元与荧光检测单元两个部分。粒子富集单元将被采样气溶胶中一定粒径范围内的粒子富集到粒子采集板上。荧光检测单元对富集到粒子采集板上的粒子进行紫外光诱导下的荧光检测,通过探测荧光强度分析计算相应生物物质的含量。这种利用富集粒子作为被检物的设计方案提高了荧光检测单元的检测灵敏度,降低了对激发光源功率的要求。

2.1 荧光检测原理

不同的有机分子本征荧光特性各不相同,美国的 Pinnick 等^[2]对此开展了非常深入的研究,在使用266 nm激光器作为激发光源条件下,检测出了几种有机分子的荧光光谱及其吸收峰和发射峰的波长,如图1与表1所示。可以看出,这几种物质中色氨酸的发光效率最高,且斯托克斯位移相对最大。色氨酸广泛存在于包括病毒在内的生物体中,且较其他种类氨基酸更易于光学系统的设计与实现。因此选取色氨酸作为被检测对象。

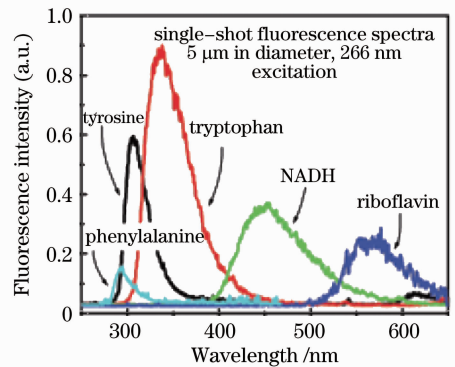


图1 266 nm 波长紫外光激发下一些有机分子的发射光谱

Fig. 1 Emission spectra of some organic molecules excited by UV laser of 266 nm

表1 有机分子吸收峰和发射峰

Table 1 Absorption peaks and emission peaks of some organic molecules

Organic molecules	Wavelength of absorption peak / nm	Wavelength of emission peak / nm
Tyrosine	275	300
Tryptophan	295	353
NADH	380	460
Riboflavin	260, 350, 450	525

2.2 荧光检测单元设计

图2为实验中采用的紫外光(UV)诱导荧光检测单元。荧光检测单元包括紫外光激发光路和荧光收集光路。激发光路由紫外光源、光源滤光片、准直透镜、分色镜与聚光镜组构成。荧光收集光路由聚光镜组(与激发光路共用)、分色镜、荧光滤光片、后聚光镜组、光阑和光电转换器件组成。其中分色镜对紫外激发光有较高反射率,而对荧光全波段有较高透射率。光路中设置有光电二极管,用以接收透过分色镜的激发光强度,此信号用于修正荧光信号随激发光的波动,以提高荧光信号的稳定性。

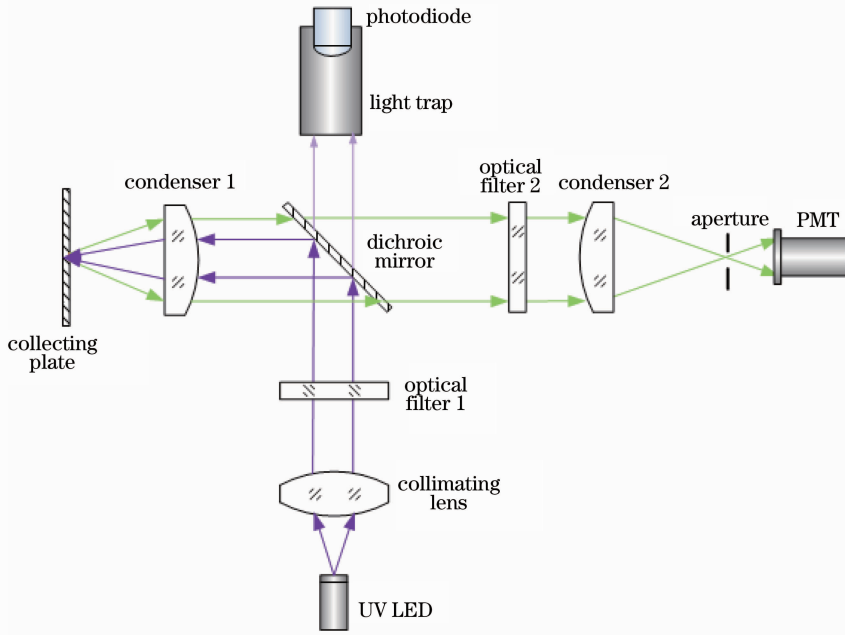


图 2 紫外光诱导荧光检测单元光路图

Fig. 2 Optical layout of UV light induced fluorescence detection unit

荧光检测单元中的光源采用 UVTOP280 型 LED(美国 Sensor Electronic Technology, Inc.), 输出光功率为 $500 \mu\text{W}$, 峰值波长为 285 nm , 半峰全宽为 10 nm , 其发射光谱如图 3(a)所示。为提高检测灵敏度, 选择光电倍增管(PMT)作为光电转换器件^[8]。荧光接收光路的数值孔径约为 0.4 。另外, 因为波长较短的紫外光易激发大部分物质产生荧光, 所以该设计对光学材料和镀膜工艺等要求较为严格。

发光光谱。由图中可见在 330 nm 波长后仍有部分杂散光, 其波段与荧光波段有交叠, 会通过反射进入荧光接收光路中, 直接影响荧光检测单元的信噪比, 所以需要首先滤除来自光源的噪声。在设计中, 一般采用紫外波段滤光片以滤除光源的噪声, 但其制作难度大, 且透射率较低(一般的峰值透射率小于 24%)。本课题组设计并制作了多片反射式滤光器替代激发光滤光片, 在抑制噪声的情况下可以将透射率提高到 70% 以上。

图 3(b)是采用 QE65000 型光谱仪测得的 LED

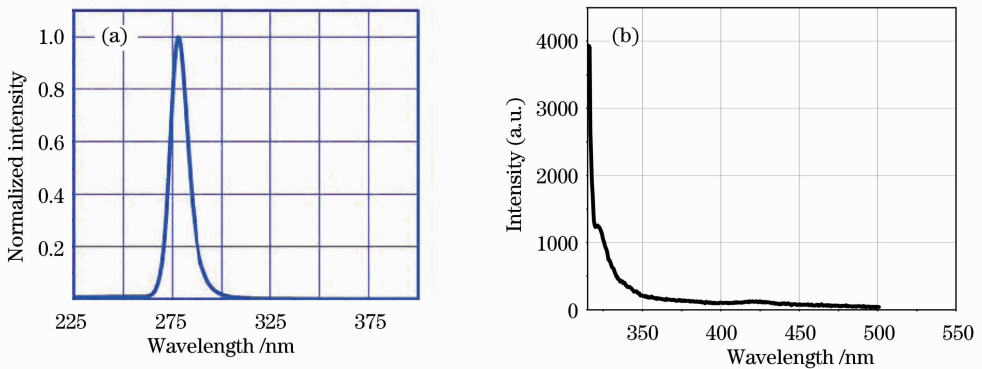


图 3 (a)UVTOP280 发光光谱图和(b)实测的荧光波段杂散光光谱图

Fig. 3 Emission spectrum of UVTOP280 (a) and stray light spectrum of fluorescence measured (b)

2.3 荧光检测单元定性测试

为对设计的荧光检测单元进行定性测试, 选用了一定浓度的色氨酸溶液和 B800 型标准荧光微球悬浊液(美国 Thermo Scientific 公司)作为待检物

均匀滴在采集板上, 用 QE65000 型光谱仪替换 PMT 进行检测。B800 型标准荧光微球标称粒径为 $0.8 \mu\text{m}$, 发光介质为荧光染料, 官方网站给出的吸收和发射光谱测试结果如图 4 所示^[9]。该染料的发

射光谱与 NADH 的受激发射光谱较为相近,可作为 NADH 的代替物进行标定,但对 280 nm 波长激发的吸收效率很低。

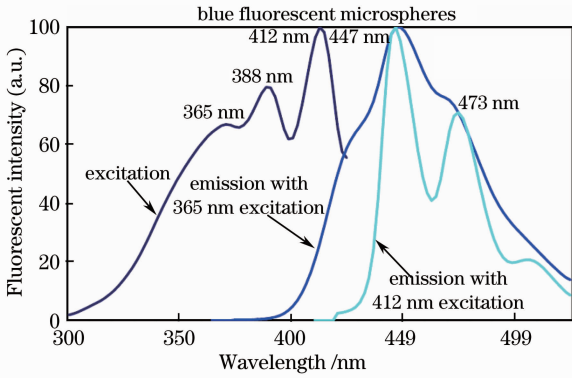


图 4 B800 荧光微球的吸收和激发光谱
Fig. 4 Absorption and emission spectra of B800 fluorescent microspheres

图 5 是对色氨酸样品检测得到的光谱曲线。与图 1 中色氨酸的荧光光谱相比,波长短于 350nm 的荧光由于受到荧光接收光路中荧光滤光片的条件限制而被衰减,其余部分相吻合。

对 B800 荧光微球样品检测到的荧光电压值近似为零,即 B800 荧光微球在波长为 280nm 波长激发下不发荧光。上述定性实验结果表明,所设计的荧光检测单元对色氨酸物质有效。

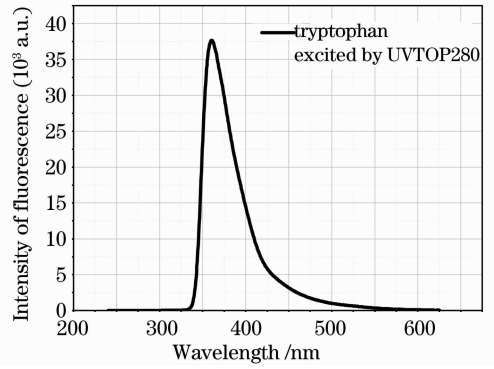


图 5 280 nm 波长激发下色氨酸荧光光谱
Fig. 5 Fluorescence spectrum of tryptophan excited by laser of wavelength 280 nm

3 标定方法研究

为模拟对包括病毒气溶胶在内的生物气溶胶的检测,并对研制的气溶胶检测装置进行性能考核,本文采用色氨酸气溶胶作为被检物,提出了一套标定方法,并结合标准荧光微球的检测结果进行进一步讨论。

3.1 标定系统

标定系统如图 6 所示,由气溶胶发生器、缓冲瓶和生物气溶胶检测装置组成。气溶胶发生器可导出含有标定物的气溶胶,并在缓冲瓶中获得均匀稳定的气源。

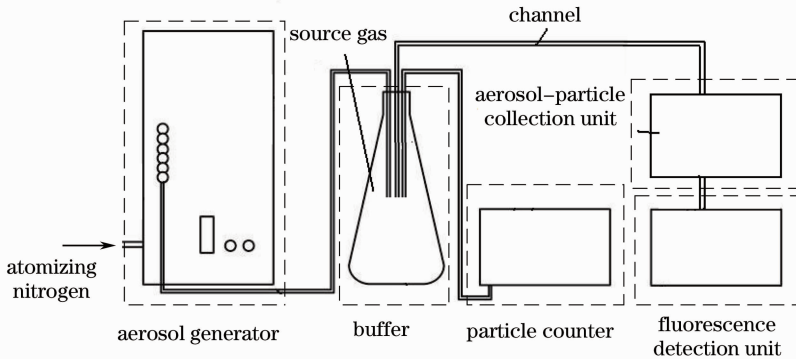


图 6 标定系统示意图
Fig. 6 Schematic of calibration system

生物气溶胶检测装置中的气溶胶粒子富集单元采用惯性冲击器,实现对粒径为 0.5 μm 以上粒子的富集^[10]。惯性冲击器将气溶胶中的粒子均匀富集到粒子采集板上。在标定系统中使用了已商业化的粒子计数器,对气溶胶中 0.5 μm 以上光学粒径的粒子进行计数,以实时测量气溶胶的浓度^[11,12]。

3.2 标定溶液的制备

采用气溶胶发生器利用 Venturi 效应将配制的

色氨酸溶液雾化以获得稳定的气溶胶源。色氨酸标定实验所使用的溶液配制方法如下:在 100 mL 纯水中放入 500 mg 色氨酸粉末并充分混合,其质量浓度为 5 mg/mL,放入 6 $^{\circ}\text{C}$ 的环境中密封保存。

利用所配制溶液制备的气溶胶,其浓度会随着雾化氮气压力的变化而变化。为了观察不同浓度气溶胶的粒径分布情况,通过调整氮气的气压,得到不同气溶胶浓度条件下 0.3、0.5、0.7、1.0、2.0 μm 以

上粒径粒子数。表 2 为测得的 3 组气源的粒子数分布数据。以 $0.3 \mu\text{m}$ 以上粒径粒子数为归一化值对数据各组进行处理,得到了不同粒径区间粒子数的比例。由表中可知,色氨酸气溶胶粒子粒径主要集中在 $1 \mu\text{m}$ 及以下区间内,且在不同条件下各粒径区间内的粒子数相对于总粒子数的比例基本不变。

表 2 各粒径的粒子数的相对比例

Table 2 Particle distribution of tryptophan aerosols

Particle diameter / μm	Group 1		Group 2		Group 3	
	Concentration / L^{-1}	Percentage /%	Concentration / L^{-1}	Percentage /%	Concentration / L^{-1}	Percentage /%
0.3	75920	1	99085	1	20548	1
0.5	51245	0.60	67786	0.68	13320	0.64
0.7	13926	0.18	18251	0.18	3345	0.16
1.0	1125	0.01	1507	0.02	277	0.01
2.0	0	0	0	0	0	0

3.3 标定实验

图 7 是采用本装置分别对色氨酸气溶胶进行检测得到的结果(彩图见电子版)。其中纵坐标为 PMT 测得的荧光电压,横坐标为粒子计数器测得的在该荧光电压下的 $0.5 \mu\text{m}$ 以上的气溶胶粒子浓度,单位为颗/升(L^{-1})。图中红色的点表示用本检测装置测得的结果,黑色点为采用激发光波长为 365 nm 的检测装置测得的结果,装置中荧光接收波段为 $420 \sim 650 \text{ nm}$,对应 NADH 的荧光光谱范围。

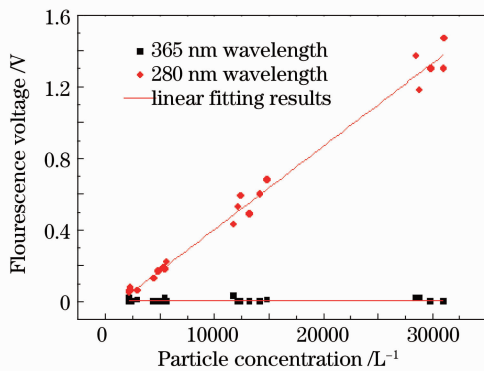


图 7 色氨酸气溶胶在 280 nm 与 365 nm 波长激发光下的检测结果

Fig. 7 Detection results of tryptophan aerosol excited by laser of wavelength 290 nm and 365 nm respectively

图中可以看出,色氨酸在 365 nm 波长激发光下没有荧光,而在 280 nm 波长激发光下可以发出与粒子浓度成正比的荧光,且拟合直线的线性相关系数为 0.995 。结果表明,本文所研制的生物气溶胶检测装置对色氨酸气溶胶有良好的线性响应关系。如设定荧光电压灵敏度下限为 0.1 V ,则所研制的生物气溶胶检测装置对色氨酸气溶胶的检测灵

即在不同压力条件下,富集到粒子采集板上的各种粒径的色氨酸气溶胶粒子的粒度分布相同。因此,采用各粒径档的粒子数都可以表征整体粒子浓度^[13]。基于冲击器的设计切割粒径,将粒子计数器的计数档粒径设定为 $0.5 \mu\text{m}$ 。

敏度约为 4000 L^{-1} 。

为了进一步分析色氨酸的荧光特性,对放置了不同时间的同一溶液进行了三次重复性试验,每两次实验的时间间隔约 48 h ,测得的结果如图 8 所示。可以看出,荧光幅值与粒子浓度的比值随时间的变化呈逐渐下降的趋势,但是两者仍保持良好的线性关系,线性相关系数分别是 0.995 、 0.996 和 0.990 。另外,用该系统进行生物粒子探测的灵敏度及荧光效率降低可能是因为部分色氨酸随时间而分解,失去生物活性,不能产生荧光。

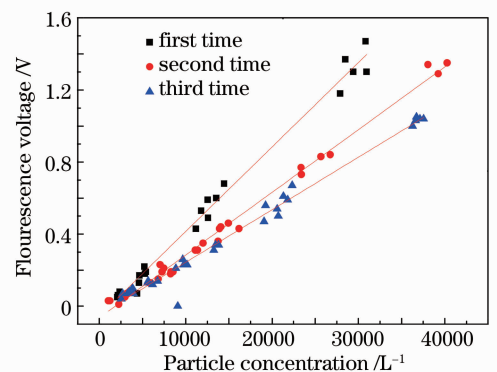


图 8 不同配置时间的色氨酸气溶胶在 280 nm 波长激发光下的检测结果

Fig. 8 Detection results of tryptophan aerosol prepared in different time excited by laser of wavelength 280 nm

3.4 实验结果分析

从采用 B800 标准荧光微球与色氨酸作为气溶胶被检物对研制的气溶胶检测装置的标定实验结果可见,荧光检测幅值与气溶胶粒子浓度具有良好的线性相关特性,线性相关系数优于 0.99 。荧光检测灵敏度达到 4000 L^{-1} 。

B800 荧光微球可以作为 365 nm 波长激发光检测时 NADH 的替代物,但在 280 nm 波长激发光下荧光极其微弱。在实际情况下,采用 280 nm 波长激发光可以使绝大部分生物体(包括病毒在内)中的荧光物质产生荧光,在图 1 中也可看出,NADH 也可以在 280 nm 波长下受激产生与色氨酸相比较弱的荧光。所以,若色氨酸与 NADH 两者同时存在时,可通过进一步深入研究,以一定的算法处理,将各自的荧光值分别算出,从而分析两种物质的相对含量,对生物物质种类进行初步的判别。

4 结 论

色氨酸作为氨基酸的一种,广泛存在于包括病毒在内的生命物质中,本文提出了一种以色氨酸为标定物的生物气溶胶检测方法,并完成了检测与标定系统的设计。通过对色氨酸与 B800 荧光微球两种物质的标定实验,并与 365 nm 波长激发波长的生物气溶胶监测系统的实验结果作对比,证明了用本文设计的光学系统实现色氨酸荧光检测的可行性。

另外,根据色氨酸的荧光强度可以标定出生物气溶胶中该物质的含量,由于色氨酸、NADH 等物质在各种生物粒子中的含量各不相同,采用 280 nm 和 365 nm 波长激发光的荧光检测系统各自的检测标定结果做一定的处理后,可以分析出被测物质的构成,结合生物粒子的粒径等参数的分析,可以对生物粒子的种类进行预判别。

参 考 文 献

- 1 Richard DeFreez. LIF bio-aerosol threat triggers; then and now [C]. *SPIE*, 2009, **7484**: 74840H
- 2 Ronald G. Pinnick, Steven C. Hill, Stanley Niles *et al.*. Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles [J]. *Field Anal. Chem. & Technol.*, 1999, **3**(4-5): 221~239

- 3 Chunxia Feng, Lihua Huang, Jianbo Wang *et al.*. Theoretical studies on bioaerosol particle size and shape measurement from spatial scattering profiles [J]. *Chin. Opt. Lett.*, 2011, **9**(9): 092901
- 4 Lan Tiange, Xiong Wei, Fang Yonghua *et al.*. Study on passive detection of biological aerosol with Fourier-transform infrared spectroscopic technique [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(6): 1656~1661
兰天鸽,熊伟,方勇华等.应用被动傅里叶变换红外光谱技术探测生物气溶胶研究[J].*光学学报*, 2010, **30**(6): 1656~1661
- 5 Sylvie Butieau, Jean-Robert Simard, Susan Rowsell *et al.*. Bioaerosol standoff detection and correlation assessment with concentration and viability point sensors [C]. *SPIE*, 2010, **7838**: 78380J
- 6 Chang Guanqin, Song Cunyi, Wang Li. Evaluation of biological activity of psychrophilic bacteria with fluorescence spectroscopy [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, **30**(s1): s100503
常冠钦,宋存义,汪莉.耐冷菌生物活性的荧光光谱特性评价[J].*光学学报*, 2010, **30**(s1): s100503
- 7 Charles A. Primmerman. Detection of biological agents [J]. *Lincoln Laboratory Journal*, 2000, **12**(1): 3~32
- 8 Yan Yan, Luo Shan. Weak light detection lead by photomultiplier tube [J]. *Laser & Optoelectronics Progress*, 2000, **37**(2): 38~40
颜严,罗山.光电倍增管引导弱光探测[J].*激光与光电子学进展*, 2000, **37**(2): 38~40
- 9 Particle Technology [OL]. [2012-02-23]. <http://www.thermoscientific.com/particletechnology>
- 10 Zhou Guangchao, Zhao Yongkai, Han Jie *et al.*. Research on submicron particle sampler based on inertial impactor [J]. *Chinese J. Scientific Instrument*, 2010, **31**(6): 1381~1386
周光超,赵永凯,韩杰等.一种基于惯性冲击原理的亚微米粒子采样器研究[J].*仪器仪表学报*, 2010, **31**(6): 1381~1386
- 11 Liang Chunlei, Huang Huijie, Zhao Yongkai *et al.*. Study of miniature optical sensor for laser particle counter [J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(9): 1260~1264
梁春雷,黄惠杰,赵永凯等.激光尘埃粒子计数器微型光学传感器的研究[J].*光学学报*, 2005, **25**(9): 1260~1264
- 12 Feng Chunxia, Huang Lihua, Zhou Guangchao *et al.*. Computation and analysis of light scattering by monodisperse biological aerosols [J]. *Chinese J. Lasers*, 2010, **37**(10): 2592~2598
冯春霞,黄立华,周光超等.单分散生物气溶胶光散射特性的计算与分析[J].*中国激光*, 2010, **37**(10): 2592~2598
- 13 Xu Pingping, Ye Weiping, Yuan Qiakuang. Size measurement of particles vaporized in different media [J]. *Chinese J. Public Health*, 2001, **17**(3): 265
许苹苹,叶卫平,袁洽助.不同介质雾化气溶胶粒子大小的测定[J].*中国公共卫生*, 2001, **17**(3): 265

栏目编辑:何卓铭