

基于本征荧光测量的双通道生物气溶胶检测技术研究

徐 傲^{1,2} 熊 超^{1,2} 张 佩^{1,2} 廖小情¹ 杨 巍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 中国科学院大学, 北京 100049

摘要 近年来,大气生物气溶胶的实时监测技术已经成为研究领域的热点。在已有技术的基础上,研发出了含有 280 nm 和 365 nm 两种激发光波长的双通道生物气溶胶检测系统。利用该检测系统,分别测量了色氨酸、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)的荧光光谱和强度,确定了对该系统两个通道进行标定的方法,并结合对牛血清蛋白(BSA)以及易引起误判的香烟烟雾等物质的测量结果进行了分析与探讨。实验结果证明了通过多通道紫外光诱导生物气溶胶粒子产生本征荧光,并对荧光光谱与强度等信息进行分析可以较为准确地实现对粒子种类的预判。这种技术具有较强的应用价值与发展空间。

关键词 测量;光学测量;生物气溶胶检测;本征荧光;双通道

中图分类号 TN247 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/AOS201333.0812005

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

Xu Ao^{1,2} Xiong Chao^{1,2} Zhang Pei^{1,2} Liao Xiaqing¹
Yang Wei¹ Zhao Yongkai¹ Huang Huijie¹

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

Abstract Real-time detection of bio-aerosol has become the focus of research in recent years. Based on the existing technology, the dual-channel bio-aerosol detection method which includes 280 nm and 365 nm channel is developed. With the dual-channel bio-aerosol detection system, the intrinsic fluorescence spectra and intensity of tryptophan and nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) are detected respectively by deploying the ultraviolet source at 280 nm and 365 nm. On the basis of the result, the calibration method is determined, and then the analysis of bull serum albumin (BSA) and cigarette particles' results are researched. The results demonstrate that it can improve the accuracy of particles pre-discrimination by using the dual-channel bio-aerosol detection technology. The technology has strong application value and development space.

Key words measurement; optical measurement; bio-aerosol detection; intrinsic fluorescence; dual-channel

OCIS codes 280.1100; 300.2530; 120.1880; 260.2510

1 引 言

近年来,由于公众对环境大气质量的关注,大气气溶胶,尤其是大气生物气溶胶的探测技术已经成为当今热点研究领域之一^[1-2]。大气气溶胶是均匀

分散于大气中的固体微粒和液体微粒所构成的稳定混合体系,其中的微粒统称为气溶胶粒子,其颗粒的粒径介于 0.001~100 μm 之间。其中,有生命活性的生物物种或粒子统称为生物气溶胶颗粒,包括诸

收稿日期: 2013-01-14; 收到修改稿日期: 2013-04-10

基金项目: 上海市自然科学基金(11ZR1441700)

作者简介: 徐 傲(1989—),男,硕士研究生,主要从事生物气溶胶光电检测技术方面的研究。

E-mail: xuao20060793@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检测技术与光电检测技术等方面的研究。

E-mail: darkskyhaha@siom.ac.cn

如病毒、细菌、真菌、花粉、孢子等微生物。如果气溶胶的浓度过高,将对人类健康造成威胁。尤其空气中的生物气溶胶可引发人类的急慢性疾病以及动植物疾病^[3]。因此研究和开发能够实时、灵敏地监测空气中气溶胶浓度的生物气溶胶探测技术,具有重要的学术意义与价值。

目前,世界各国十分重视实时大气生物气溶胶探测技术与仪器的研究。现代生物气溶胶检测方法越来越多地引入了光学手段。基于光学测量的生物气溶胶检测技术具有快速、无损、灵敏等优点。生物气溶胶粒子的形状、尺寸与本征荧光值,是区分生物气溶胶与非生物气溶胶的主要依据^[4-8]。

本征荧光是生物粒子所含的有机分子[如氨基酸、核黄素、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NADH)]在紫外光激发下产生的特有荧光,也是判别是否具有生物属性的最重要条件。由于不同种类生物粒子的构成不同,可以利用其吸收与发射光谱的不同对一些生物气溶胶的种类进行预判别^[9-10]。另外,一些气溶胶如油烟尾气等,在某些紫外光激发条件下也产生特定波段的荧光,从而干扰判别。

本文利用波长分别为 280 nm 和 365 nm 两路紫外光诱导不同生物物质产生本征荧光,通过对本征荧光强度、光谱等信息的分析达到检测生物气溶胶的目的。实验结果证明了利用双通道生物气溶胶检测技术可以实现对粒子的种类较为准确的预判别,从而扩大气溶胶粒子的检测范围,提高检测结果的准确性。

2 生物气溶胶荧光检测系统

2.1 荧光检测原理

不同的生命物质具有自身特有的吸收光谱与发射光谱。生物粒子所含的有机分子(如氨基酸、核黄素、NADH 等)在紫外光激发下会产生荧光,这是一种本征荧光。美国的 Pinnick 等^[11]对酪氨酸、色氨酸、NADH、核黄素这几种主要生命物质的本征紫外吸收峰值与荧光发射峰值进行了深入的研究。

色氨酸是一种重要的氨基酸,在包括病毒在内的各种生物体中普遍存在,在 280 nm 左右的紫外光激发条件下产生的荧光光谱主要集中在 350~650 nm 波段,且荧光激发效率比酪氨酸和苯丙氨酸等高。NADH 是一种还原性辅酶,主要作用于新陈代谢的氧化还原反应中,其紫外吸收峰在 380 nm 附近。在被波长为 365 nm 的紫外光激发时,产生的荧光光谱主要集中在 450~650 nm 波段,而且荧光激发效率也比较高^[12]。

2.2 生物气溶胶荧光检测系统

基于已有技术,分别针对色氨酸与 NADH 两种生物物质的荧光光谱设计了一套由 280 nm 紫外光诱导荧光检测系统和 365 nm 紫外光诱导荧光检测系统组成的双通道荧光检测系统。每个通道的荧光检测系统包括紫外光激发光路和荧光收集光路。对该荧光检测系统更具体的描述可以参考文献^[13]。本研究采用粒子富集的方式,形成多粒子样本,而后对该样本进行紫外光诱导荧光检测与分析,

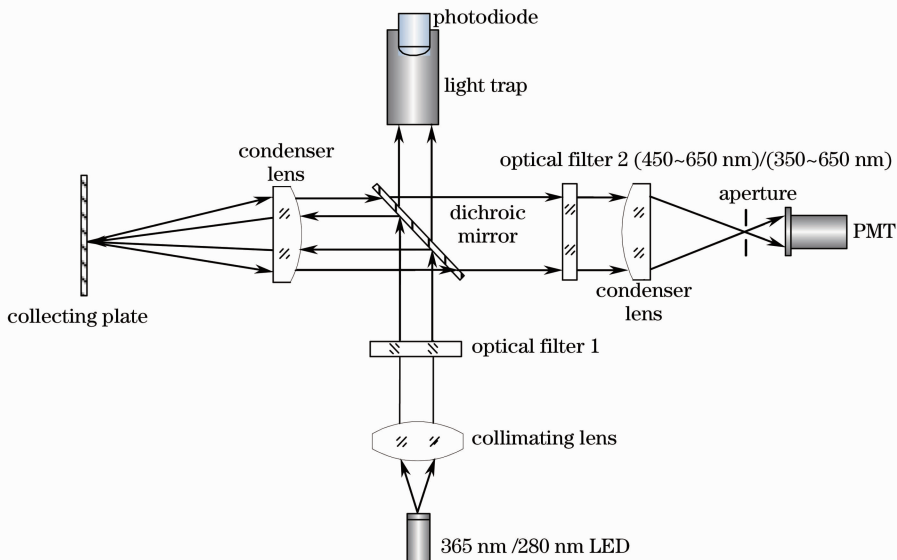


图 1 双通道生物气溶胶检测系统示意图

Fig. 1 Optical layout of dual-channel bio-aerosols detection system

以提高检测灵敏度^[14]。

两套荧光检测系统均采用共光路设计方案,其原理类似,故把两个荧光检测系统合并到一张图中,仅在激发光源处标注出 365 nm/280 nm LED 以示区别,并且对于荧光滤光片也做出了标注,如图 1 所示。在 365 nm 荧光检测系统中,分色镜对 365 nm 波段的光具有较高的反射率,对 420~650 nm 之间的光具有较高的透射率,荧光滤光片的截止波长为 450 nm,针对的物质是 NADH。在 280 nm 荧光检测系统中,分色镜对 280 nm 波段的光具有较高的反射率,对 350~650 nm 之间的光具有较高的透射率,荧光滤光片的截止波长为 350 nm,针对的物质是色氨酸。

3 双通道荧光检测系统的标定

由于两个通道的荧光检测系统采用的光源功率、激发效率、光学元件、光电接收器件转换效率等参数均不同,两者对于同一种物质产生的荧光存在差异。因此,首先需寻求一种生物物质对两个通道荧光检测系统进行标定,以建立两个通道荧光强度等信息的对应关系。

在实验中,由于 280 nm 通道荧光检测光路中将存在 350~420 nm 和 420~650 nm 两个波段的荧光信号,为便于对比和标定,分别使用了截止波长为 350 nm 和 450 nm 两种荧光滤光片进行测量并对结果进行分析,其分别对应的荧光波段为 350~650 nm 与 450~650 nm。

3.1 色氨酸与 NADH 荧光光谱测试

首先利用光谱仪对色氨酸、NADH 两种待测样品进行荧光光谱分析,分别如图 2、3 所示。从图 2 可知,色氨酸在 280 nm 紫外光与 365 nm 紫外光激发下都有较强的荧光强度。从图 3 中可知,当利用 280 nm 紫外光激发 NADH 时,无论荧光滤光片的截止频率是 350 nm 还是 450 nm,荧光光谱强度都非常低。由此可见 NADH 在 365 nm 紫外光激发下荧光效率较高,而对于 280 nm 紫外光几乎没有响应。

表 1 PMT 测量的色氨酸和 NADH 荧光强度值

Table 1 Fluorescence intensity of tryptophan and NADH measured by PMT

Measured sample	Fluorescence intensity excited by 365 nm light / V^{-1}	Fluorescence intensity excited by 280 nm light / V^{-1}		Ratio of fluorescence intensity excited by 365 nm light (spectrum in 450~650 nm) to excited by 280 nm light (spectrum in 350~650 nm)
	Spectrum in 450~650 nm	Spectrum in 350~650 nm	Spectrum in 450~650 nm	
Tryptophan	0.64	3.8	0.3	0.168
NADH	2.8	0.6	0.1	4.67

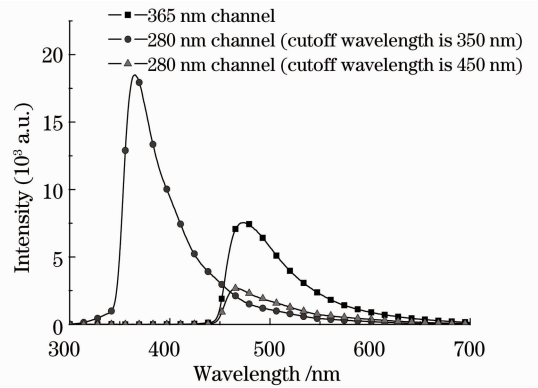


图 2 色氨酸荧光光谱图

Fig. 2 Fluorescence spectra of tryptophan

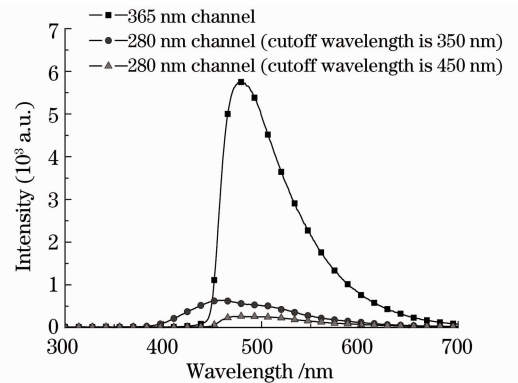


图 3 NADH 荧光光谱图

Fig. 3 Fluorescence spectra of NADH

3.2 标定方法

为建立两个通道荧光强度的对应关系,需选取一种标定物质对两个通道进行标定。从上述结果看,色氨酸对 280 nm 紫外光和 365 nm 紫外光都有较高的荧光效率,而 NADH 对 365 nm 紫外光的荧光效率远高于对 280 nm 紫外光的荧光效率。所以,采用色氨酸为标定物质。

在实际检测时,一般使用光电倍增管(PMT)与光电二极管(PD)等光电转换器件检测某一荧光波段的光强作为判定信息。因此用同一 PMT 作为两个通道的光电接收器分别检测富集到粒子富集板上的色氨酸与 NADH 样品的荧光光强进行对比,测量结果如表 1 所示。

由上述结果可知,当选择色氨酸作为标定物时,所设计的 365 nm 通道荧光检测系统在 450~650 nm 波段的荧光强度是 280 nm 通道在此波段荧光强度的 2.1 倍。当两个荧光检测通道的各元件有变化时,通过微量调节 PMT 的灵敏度以保持两个通道检测结果为上述的比值对应关系。

4 双通道荧光检测系统的模拟检测

通过对色氨酸和 NADH 的测试结果可以看出,365 nm 激发光诱导色氨酸和 NADH 时荧光效率都较高,而 280 nm 激发光诱导 NADH 时荧光效率不高。所以在单通道生物气溶胶检测系统中,常用 365 nm 激发光作为诱导光源。

365 nm 激发光诱导 BSA-油烟和尾气等物质时,都会产生荧光,因此仅选用一种激发光诱导样品,可能对样品的物质产生误判,而得不到正确的结果。利用 280nm 和 365nm 激发光诱导待测样品产生本征荧光,便可以得到更加全面、准确的实验结果,实现生物气溶胶的预判别,甄别出危害最大的气溶胶,排除非生物气溶胶粒子。标定完成后,利用设计的检测系统对牛血清蛋白和烟雾等物质开展实验与分析。

4.1 牛血清蛋白光谱测试结果

牛血清蛋白(BSA)是一种多聚物,在生化实验

表 2 PMT 测量的 BSA 荧光光强值

Table 2 Fluorescence intensity of BSA measured by PMT

Measured sample	Fluorescence intensity excited by 365 nm light /V ⁻¹	Fluorescence intensity excited by 280 nm light /V ⁻¹		Ratio of fluorescence intensity excited by 365 nm light (spectrum in 450~650 nm) to excited by 280 nm light (spectrum in 350~650 nm)
	Spectrum in 450~650 nm	Spectrum in 350~650 nm	Spectrum in 450~650 nm	
BSA	1.8	0.56	0.12	3.2

4.2 香烟烟雾的测试结果

在自然界中,有一些气溶胶比如油烟和尾气等也可产生特定波段的荧光,与生物气溶胶产生的荧光类似,干扰判断结果。在此,选择香烟烟雾进行检测。

图 5 为香烟烟雾粒子的荧光光谱从图 5 可知香烟烟雾粒子的荧光光谱图与 NADH 的荧光光谱图有些接近,对 365 nm 激发光敏感,其荧光波段为 450~750 nm,对 280 nm 激发光较不敏感。

表 3 为 PMT 测量的香烟粒子荧光强度值。从表 3 可知,280 nm 紫外光激发香烟烟雾粒子在 350~650 nm 波段的荧光强度与 450~650 nm 波段产生的荧光光强数值接近,说明 280 nm 紫外光激发香烟烟

中有广泛的应用。采用相同方法得到 BSA 的荧光光谱图,如图 4 所示。用 365 nm 的激发光诱导激发 BSA,得到的荧光光谱图与 365 nm 激发光激发 NADH 的荧光光谱图形状相近,因此可以推断出 BSA 中含有 NADH。用 280 nm 的激发光诱导激发 BSA,得到的荧光光谱图是 280 nm 激发光激发色氨酸和 NADH 得到的荧光光谱图的叠加,因此可以推断出 BSA 中既含有色氨酸也含有 NADH。

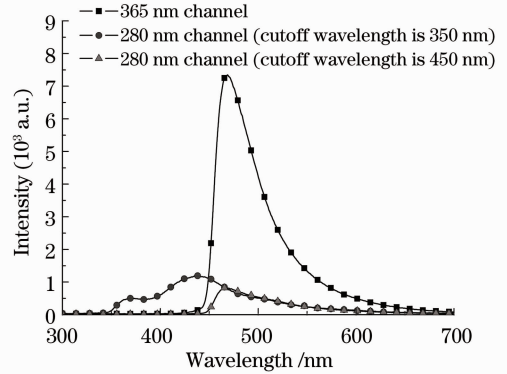


图 4 BSA 荧光光谱图

Fig. 4 Fluorescence spectra of BSA

表 2 为 PMT 测量的 BSA 荧光强度值,对比表 2 中 365 nm 紫外光激发 BSA 产生的荧光强度与 280 nm 紫外光激发 BSA 产生的荧光强度(荧光滤光片截止波长为 350 nm)的比值,低于 NADH 的比值。

雾粒子时,荧光主要集中在 450 nm 以上波段。

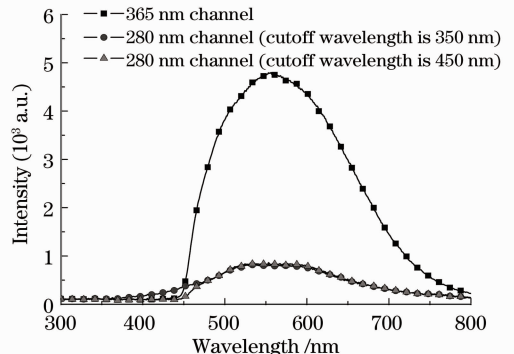


图 5 香烟粒子荧光光谱图

Fig. 5 Fluorescence spectra of cigarette particles

表 3 PMT 测量的香烟粒子荧光光强值

Table 3 Fluorescence intensity of cigarette particles measured by PMT

Measured sample	Fluorescence intensity excited by 365 nm light /V ⁻¹	Fluorescence intensity excited by 280 nm light /V ⁻¹		Ratio of fluorescence intensity excited by 365 nm light (spectrum in 450~650 nm) to excited by 280 nm light (spectrum in 350~650 nm)
	Spectrum in 450~650 nm	Spectrum in 350~650 nm	Spectrum in 450~650 nm	
Cigarette particles	3.1	0.52	0.48	4.02

通过对 BSA 和易引起误判的香烟烟尘等物质进行荧光光谱分析和荧光光强测量可知,BSA 和香烟都可在 365 nm 激发光下产生荧光,可通过 280 nm 通道的荧光强度值来识别出香烟等非生物气溶胶粒子,提高检测的精确度。

5 结果分析

由上述 4 种物质检测结果来看,每种物质的双通道荧光光谱具备较为显著的不同。而对比 4 种物

表 4 PMT 测量的 4 种物质的归一化荧光光强值

Table 4 Fluorescence normalized intensity of four particles measured by PMT

Measured sample	Fluorescence normalized intensity excited by 365 nm light	Fluorescence normalized intensity excited by 280 nm light		Ratio of fluorescence intensity excited by 365 nm light (spectrum in 450~650 nm) to excited by 280 nm light (spectrum in 350~650 nm)
	Spectrum in 450~650 nm	Spectrum in 350~650 nm	Spectrum in 450~650 nm	
Tryptophan	0.168	1	0.079	0.168
NADH	0.737	0.158	0.026	4.67
BSA	0.474	0.147	0.032	3.2
Cigarette particles	0.816	0.203	0.137	4.02

在检测的 4 种物质结果对比中,色氨酸对 280 nm 紫外光敏感,色氨酸的 β 值较低,为 0.168; 而 NADH 对 365 nm 紫外光敏感,NADH 的 β 值为 4.67,是上述 4 种物质中最大的。对于同时含有对 280 nm 紫外光敏感的色氨酸和对 365 nm 紫外光敏感的 NADH 的 BSA 来说, β 值为 3.2。香烟粒子 2 个通道的比值为 4.02。而在自然界中,NADH 作为新陈代谢物质一般不单独存在,所以如果探测出 2 个通道的比值 β 高于特定阈值,可以推断此物质是引起误判的类似于香烟烟雾的粒子。而对于只含有色氨酸和同时包含色氨酸、NADH 的物质则可通过 β 值实现预判别。

6 结 论

通过所设计的双通道生物气溶胶荧光检测系统对色氨酸、NADH、BSA 和香烟烟雾粒子等物质进行了荧光测试,确定了该系统的标定方法,证明了利用多通道生物气溶胶检测系统可以提高检测的准确

质荧光强度检测结果,通过 2 个通道的 3 个波段的荧光光强的相互比值,可以较容易地区分出 4 种物质。

但是,280nm 通道荧光接收光路较难实现两个荧光波段的细分,在实际应用中更直接的方法是可以 365 nm 激发光(荧光波段 450~650 nm)与 280 nm 激发光(荧光波段 350~650 nm)两个通道荧光强度的比值系数 β 来进行预判别。

性。并进行了生物气溶胶的预判别,讨论了利用两个通道荧光强度的比值来对几种物质实现预判别的可行性,从而可以扩大对气溶胶粒子的检测范围,提高检测的准确度,降低了误判率。

生物气溶胶检测是当前研究的热点领域,如何能够对生物气溶胶进行实时、准确的检测成为研究的重点。本课题组目前定性地研究了生物气溶胶在紫外光激发下的荧光特性。作为气溶胶粒子生物属性的判别依据之一,结合粒子的尺寸与形状可以实现更为深入的判别。

致谢 感谢浙江大学光电信息工程学系的邱蒙、何思聪以及郑州大学物理工程学院的张方对本项目的帮助。

参 考 文 献

- 1 Richard DeFreez. LIF bio-aerosol threat triggers: then and now [C]. SPIE, 2009, 7484: 74840H.
- 2 F L Reyes, T H Jeys, N R Newbury, *et al.*. Bio-aerosol fluorescence sensor [J]. Field Analytical Chemistry and

- Technology, 1999, 3(4-5): 240-248.
- 3 R Despres Viviane, Huffman J Alex, M Burrows Susannah, *et al.*. Primary biological aerosol particles in the atmosphere: a review [J]. Tellus Series B-Chemical and Physical Meteorology, 2012, 64: 015598.
 - 4 P H Kaye, W R Stanley, E Hirst, *et al.*. Single particle multichannel bio-aerosol fluorescence sensor [J]. Opt Express, 2005, 59(8): 1016-1023.
 - 5 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.
 - 6 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.
 - 7 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.
 - 8 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.
 - 9 Pan Yong-Le, C Hill Steven, G Pinnick Ronald, *et al.*. Fluorescence spectra of atmospheric aerosol particles measured using one or two excitation wavelengths: comparison of classification schemes employing different emission and scattering results [J]. Opt Express, 2010, 18(12): 12436-12457.
 - 10 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.
 - 11 Ronald G Pinnick, Steven C Hill, Stanley Niles, *et al.*. Real-time measurement of fluorescence spectra from single airborne biological particles [J]. Field Analytical Chemistry and Technology, 1999, 3(4-5): 221-239.
 - 12 K Davitt, Y K Song, W R Patterson, *et al.*. 290 and 340 nm UVLED arrays for fluorescence detection from single airborne particles [J]. Opt Express, 2005, 13(10): 3583-3593.
 - 13 Cai Shuyao, Zhang Pei, Zhu Linglin, *et al.*. Research on detection technology of bio-aerosols with tryptophan intrinsic fluorescence measurement [J]. Acta Optica Sinica, 2012, 32(5): 0512009.
蔡舒窈, 张 佩, 朱玲琳, 等. 基于色氨酸本征荧光测量的生物气溶胶检测技术研究[J]. 光学学报, 2012, 32(5): 0512009.
 - 14 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.

栏目编辑: 何卓铭