

生物芯片检测系统中荧光信号强度及系统灵敏度分析*

徐国雄^{1,2} 黄震¹ 倪旭翔¹ 陆祖康¹

(1 浙江大学光电系, 现代光学仪器国家重点实验室, 国家光学仪器工程技术研究中心, 杭州 310027)

(2 安徽工业大学, 马鞍山 243002)

摘要 从生物芯片荧光信号检测系统结构出发, 分析了荧光信号强度与激发光光学系统特性, 荧光收集光学系统特性及构成系统的各元件的参量间的关系. 建立了荧光信号强度与检测系统中各参量间的表达式, 以及对系统灵敏度进行了分析. 建立了系统最少可检测的荧光分子数与各参量的函数关系, 并对所设计的悬浮生物芯片检测装置的系统灵敏度进行了估算, 其灵敏度在曝光时间为 1 s 时可达 7.9 个荧光分子/ μm^2 .

关键词 生物芯片; 荧光强度; 系统灵敏度

中图分类号 Q63 **文献标识码** A

0 引言

荧光标记是生物技术特别是生物芯片信息采集中使用最多也是最成功的一种报告标志^[1,2]. 应用激光作为激发光源的共聚焦扫描装置具有很高的灵敏度. 同时用多种光源作为激发光(激光或氙灯, 金属卤素灯白光光源)的 CCD 成像技术由于采用并行检测(面测量)大大提高了系统的检测速度. 该技术越来越普遍地用于芯片杂交结果判读, 特别是悬浮式生物芯片技术(SAT)中.

光致激发荧光信号很弱, 必须用高灵敏度的探测器(PMT 或 CCD)进行检测. 系统采集到的荧光信号不仅与输入光强、荧光分子浓度有关, 而且与系

统结构及系统中各构件参数有关, 因而对输出信号强度与各参量关系进行全面定量分析十分重要.

灵敏度是系统的一个重要技术指标. 它是指系统能检测到最弱的荧光的能力, 定义为信噪比大于 3 时能测定的荧光强度, 通常用荧光分子数/ μm^2 来表示, 在悬浮式生物芯片中也常用荧光分子的摩尔浓度表示^[3].

1 检测系统荧光信号强度分析

1.1 检测系统

整个分析系统由光源、激发光光学系统、样品、发射光(荧光)光学系统、探测器、信号处理电路及图象处理系统构成. 如图 1 所示.

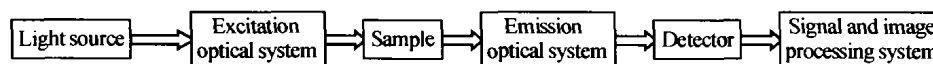


图 1 生物芯片检测系统结构框图

Fig. 1 Biochip detection system

从探测器得到的总信号可表示为

$$S_T = S_F + S_B \quad (1)$$

式中 S_F 是样品发出的荧光经探测器转换得到的电信号, 以下简称荧光信号. S_B 为背景噪声和散射光导致的噪声, 散射光噪声是指激发光入射到样品后, 由样品颗粒的散射引起的, 包括喇曼散射和瑞利散射, 可通过使用窄带滤色片将其从荧光中滤去以降低其影响.

荧光 S_F 与以下因素有关:

1) 入射到样品上的激发光光强. 与光源功率、谱特性及激发光光学系统结构、各构件参数有关.

2) 样品的荧光特性. 包括量子效率、摩尔消光系数、摩尔浓度.

3) 荧光收集效率. 与由发射光光学系统结构, 各构件参数有关.

4) 探测器的特性及信号处理电路增益. 由探测器的谱响应特性、增益 信号处理电路增益决定.

1.2 荧光信号强度的定量分析

对各个因素进一步进行量化分析如下:

1) 入射到样品上的激发光平均照度

$$I_0 = \frac{P_0}{A} T_{exc} C_{exc} \quad (2)$$

式中 P_0 为光源输出光功率, 若其光谱辐射量为 $\phi_{exc}(\lambda_{exc})$ (W/nm), λ_{exc} 为激发光波长, 则 $P_0 = \int_0^{\infty} \phi_{exc}(\lambda_{exc}) d\lambda_{exc}$, T_{exc} 是激发光通过激发滤色片的

*国家自然科学基金资助项目(编号:60378042)

Tel:0571-87951213 Email:xuguoxiong555@hotmail.com

收稿日期:2003-09-08

透过率,与选定的波长有关. $T_{exc} = \int_0^{\infty} R_{exc}(\lambda_{exc}) \cdot \phi_{exc}(\lambda_{exc}) d\lambda_{exc} / \int_0^{\infty} \phi_{exc}(\lambda_{exc}) d\lambda_{exc}$, 其中 $R_{exc}(\lambda_{exc})$ 为滤色片的透过率函数. 对于激光,无需用滤色片认为 $T_{exc} = 1$,而对于白光光源,由于其谱很宽,从 $\lambda_1 = 300 \text{ nm} \sim \lambda_2 = 2000 \text{ nm}$,而所选定的波长宽度 $\Delta\lambda$ 一般为几十 nm , $T_{exc} = \Delta\lambda / (\lambda_2 - \lambda_1)$. 尽管白光光源谱特性并非均匀,但仍可用此法估算. C_{exc} 是激发光光学系统的总效率(包括各种损耗), A 为样品的照射面积.

2) 样品发射的荧光强度为 Nf , f 是每个荧光分子受激发后产生的荧光, N 是被激发光照射的荧光分子数. 每个荧光分子的吸收截面为^[4]

$$\sigma = 3.8 \times 10^{-25} \varepsilon (\text{m}^2) \quad (3)$$

式中 ε 是消光系数,单位是 $\text{Liter} \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 每个处于基态的荧光分子激发率(吸收率)为

$$\alpha = \frac{\sigma I_0}{hc/\lambda_{exc}} \quad (4)$$

式中 h 为普朗克常数, c 为光速.

荧光分子吸收光子从基态跃迁到激发态时间很短,一般在 10^{-15} s 量级,若激发态寿命为 τ , 一个处于激发态的荧光分子的消激发速率为 $\frac{1}{\tau}$, 设处于激发态的荧光分子数为 N_1 , 当荧光过程处于平衡状态时,应有: $(N - N_1)\alpha = \frac{N_1}{\tau}$, 所以处于激发态的荧光分子数目为 $N_1 = \frac{\alpha\tau N}{1 + \alpha\tau}$, 设荧光分子的量子效率为 ϕ , 将产生 $\frac{\phi}{\tau} \cdot \frac{\alpha\tau N}{1 + \alpha\tau}$ 个荧光光子. 所以对于 N 个荧光分子产生的荧光强度为^[5]

$$Nf = \frac{\phi\alpha N}{1 + \alpha\tau} \cdot \frac{hc}{\lambda_{em}} \quad (5)$$

式中 λ_{em} 为荧光波长.

3) 荧光收集效率为 $C_{em} \prod_1^n T_{emi}$. 其中 C_{em} 是发射光光学系统总效率(光从样品到探测器通过透镜、平面镜收集效率). 荧光是朝各个方向发射的,而收集立体角只是 4π 的很小部分. 若不计荧光通过透镜、平面镜的损耗(表面反射及镜的吸收),则 C_{em} 为探测器的收集立体角与 4π 之比. 荧光收集透镜的数值孔径为 $P = \sin \theta$ (一般收集透镜置于空气中其折射率取 1). 则 $C_{em} = \frac{1 - \cos \theta}{2} = \frac{1 - \sqrt{1 - P^2}}{2}$ (P 一般在 0.1 与 1 之间). T_{emi} 是第 i 个发射滤色片的透过率,与波长有关, $T_{emi} = \int_0^{\infty} R_{emi}(\lambda_{emi}) \phi_{emi}(\lambda_{emi}) d\lambda_{emi} / \int_0^{\infty} \phi_{emi}(\lambda_{emi}) d\lambda_{emi}$, R_{emi} 为第 i 个发射滤色片的

谱响应函数.

4) 探测器的特性及信号处理电路增益:探测器的增益用 $G_{det}(\lambda)$ 来表示. 反映探测器对所选波长的荧光的响应,信号处理电路增益用 G_{cir} 表示.

考虑以上各个因素,在采样的时间为 T 时荧光信号强度为

$$S_F = \frac{1}{2} \frac{\phi}{\tau} \frac{\alpha\tau N}{1 + \alpha\tau} \frac{hc}{\lambda_{em}} (1 - \sqrt{1 - P^2}) \cdot \prod_1^n T_{emi} G_{det} G_{cir} T \quad (6)$$

2 荧光检测系统灵敏度分析

设系统中所使用探测器的灵敏度为 S_{det} , 通常对 CCD 都是用给定积分时间 (ΔT) 下的照度 (Lux) 来表示 ($S_{det} \times \Delta T$, 基本为定值), 即所接受到的荧光照度最低限. 但这并非一个直观量, 实验中常常关心的是系统所能检测到的最低荧光分子数 N_{min} 或最低摩尔浓度 M_{min} (对悬浮芯片). 下面对两者间的关系进行分析.

设每个样品每个检测点 (DNA 阵列中点或悬浮芯片中的微球) 对应 N_{pix} 个像素, 每个像素上荧光信号为 S_F/N_{pix} , 因为考虑的是最弱的可检测荧光, 所以应假设这些荧光是从某一个检测点上 (或某一个微球上) 若干荧光分子发出的, 这些荧光信号被 N_{pix} 个像素接收, 每个像素面积为 A_{pix} . 所以

$$S_{det} \Delta T A_{pix} N_{pix} = \frac{1}{2} \frac{\phi\alpha N_{min}}{1 + \alpha\tau} \frac{hc}{\lambda_{em}} (1 - \sqrt{1 - P^2}) \cdot \prod_1^n T_{emi} G_{det} G_{cir} T \quad (7)$$

$$N_{min} = \frac{2(1 + \alpha\tau) \lambda_{em} S_{det} A_{pix} N_{pix} \Delta T}{\alpha\phi hc (1 - \sqrt{1 - P^2}) \prod_1^n T_{emi} G_{det} G_{cir} T}$$

需要注意的是信号处理电路常与探测器芯片集成在一起, 这时给出的探测器灵敏度已经考虑到信号处理电路的增益, 在计算系统灵敏度时, 不应再考虑 G_{cir} .

3 悬浮式生物芯片检测系统灵敏度估算

我们设计的悬浮生物芯片^[6] CCD 成像系统如图 2. 悬浮式生物芯片由许多种不同的微球为主要基质构成, 每种微球上固定有不同的探针分子, 将这些微球探针悬浮于待测试液中, 就构成了一个悬浮式生物芯片系统, 利用这个系统, 可以对同一个待测试液中的多个不同分子同时进行检测.

悬浮式生物芯片的检测原理是使微球探针阵列流过检测区域, 并使用双色激光同时对微球探针上

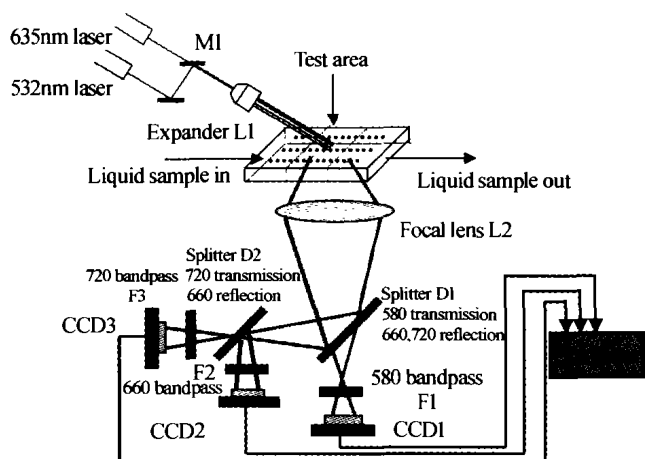


图2 悬浮式生物芯片的并行检测原理图

Fig. 2 Suspension biochip parallel detection system

的红色分类荧光和报告分子上的绿色标记荧光进行检测。红色激光激发微球探针上的红色分类荧光,根据分类荧光信号的不同,可将微球探针进行分类,从而将各个不同的分子反应区分开来。绿色激光激发的是绿色标记荧光,目的是确定微球探针上结合的标记荧光的数量,从而确定微球探针上结合的待测分子的数量。

待测试液中的微球探针中掺入两种不同比例的红色分类荧光,其荧光发射波长分别为 660 nm 和 720 nm,每种荧光浓度分为10个等级,故共有 10^2 种分类。报告分子上的绿色标记荧光波长为 580 nm。激光激发的三种波长荧光通过透镜 L2 将荧光会聚,由分光镜 D1 分开,580 nm 的荧光通过带通滤色片 F1 后由 CCD1 收集。分光镜 D2 将进一步将 660 nm 和 720 nm 的荧光分开,660 nm 的荧光通过带通滤色片 F2 后由 CCD2 收集,720 nm 的荧光通过带通滤色片 F3 后由 CCD3 收集。因此,通过红绿双色激

光的同时检测,可以确定被结合的待测分子的种类和数量。下面对 CY5 的荧光信号检测灵敏度进行估算:

若每个样品点(或悬浮芯片中的微球)对应 100 个象素,一次检测区域为 10^{-6} m^2 ,激光功率 $P_0 = 10^{-2} \text{ W}$,激光波长为 635 nm,CCD 本身无增益, G_{det} 取 0.5 (CCD 的量子效率一般在 0.5 左右),不考虑透镜及反射镜的吸收与反射损失则 C_{exc} 取 1,用激光光源无需用激发滤色片 $T_{\text{exc}} = 1$,所选发射窄带干涉滤色片对所选波长荧光平均透过率为 $T_{\text{em}} = 0.8$,每种波长的荧光经过光学系统的透镜和分光镜的损耗为 20%,所以等效透过率为 0.8×0.8 。透镜 L2 的等效数值孔径 $P = 0.2$ 。CCD 相机灵敏度为 S_{det} (对于积分时间为 ΔT),由于 CCD 相机是 CCD 芯片与信号处理电路的集成,故其灵敏度参数中已考虑到信号处理电路的增益效应,在计算 N_{min} 时,不必再考虑 G_{cir} 。 $\lambda_{\text{em}} = 6.7 \times 10^{-7} \text{ m}$, $\phi = 0.28$, $\tau = 10^{-9} \text{ s}$ (见表 1),则由式(2)、(3)、(4)可得: $\alpha = 9.1 \times 10^3/\text{s}$,由式(7)可得每个微球上携带的最少荧光分子数为

$$N_{\text{min}} = \frac{1.24 \times 10^4 \times S_{\text{det}} \times \Delta T}{T} \quad (8)$$

若采用普通型 CCD 相机,其灵敏度为 0.1 Lux (对积分时间 ΔT 是 1 s),当采样时间 T 是 0.1 s 时,其灵敏度为 1.24×10^4 个荧光分子。每个微球直径为 10 μm 。其照射面积约为 157 μm^2 ,所以其灵敏度又可以表示为:79 个荧光分子/ μm^2 。其灵敏度较低,这里的曝光时间取 0.1 s,如果曝光(采样)时间为 1 s,其灵敏度提高为 7.9 个荧光分子/ μm^2 ,其代价是降低了分析速度。

表 1 荧光分子参数

CyDye fluor	Absorption maximum/nm	Fluorescence maximum/nm	Lifetime/ns	Extinction coefficient/($\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$)	Quantum yield for protein conjugates
cy5	649	670	1.0	250,000	0.28

4 结论

建立荧光信号强度与系统参量的定量关系,分析了生物芯片荧光信号检测系统灵敏度,建立用最少荧光分子数表示灵敏度与系统参量间的定量关系。这些表达式对荧光信号检测系统设计者以及利用该系统进行荧光检测而对样品进行荧光标记的工作者具有参考价值。

在我们设计的悬浮式生物芯片检测系统中由于采用面检测方式,为了保证系统的检测速度,照射面积为 $1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$,导致 I_0 过低,处于激发态的荧光分子数目比例极小,远没有达到饱和状态,所以荧光

信号很弱,必须采用高灵敏度的 CCD 探测器,以满足系统的灵敏度要求。

参考文献

- 马立人,蒋中华. 生物芯片. 北京:化学工业出版社, 2002. 180
Ma L R, Jiang Z H. Biochip. Beijing: Chemical Industry Press, 2002. 180
- 王立新,陆祖康,倪旭翔. 共聚焦生物芯片扫描仪中 PMT 电流增益的自动控制. 光子学报, 2004, 33(3): 314 ~ 317
Wang L Q, Lu Z K, Ni X X. Acta Photonica Sinica, 2004, 33(3): 314 ~ 317
- Ferguson J A, Steermer F J, Walt D R. High-density fiber-optical DNA random microsphere array. Anal Chem,

- 2000, **72**(27): 5618 ~ 5624
- 4 Mathies R A, Peck K. Optimization of high-sensitivity fluorescence detection. *Anal Chem*, 1990, **62**(17): 1786 ~ 1791
- 5 Pawley J. Hand book of confocal Microsphere. 1994, NY, Plenum Press, chapter 16
- 6 Nolan J P, Sklar L A. Suspension array technology: evolution of the flat-array paradigm. *Trends in Biotechnology*, 2002, **20**(1): 9 ~ 12

Analysis of Fluorescence Signal Intensity and System Sensitivity of Biochip Detection System

Xu Guoxiong^{1,2}, Huang Zhen¹, Ni Xuxiang¹, Lu Zukang¹

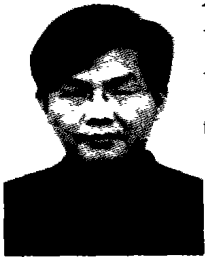
¹ Chinese National Engineering & Technology Research Center for Optical Instrument, State Key Lab of Modern Optical Instrumentation, Department of Optical Engineering, Zhejiang University, Hangzhou 310027

² Anhui University of Technology, Ma'anshan 243002

Received date: 2003-09-08

Abstract The dependence of fluorescent intensity on characters of excitation light optical system and fluorescence collection optical system as well as the parameters of elements system has been analyzed based on system configuration. A formula of fluorescence signal intensity depending on those parameters has been established. System sensitivity is analyzed, also a formula of minimal detectable fluorescent molecule numbers as the function of each parameter is presented. Estimated sensitivity of our suspension bio-chip analyzer is about 7.9 fluorophores/ μm^2 at exposure time 1 s.

Keywords Biochip; Fluorescence intensity; System sensitivity



Xu Guoxiong was born in Anhui Province. He obtained his master's degree of science from University of Science and Technology of China. Now he is a doctoral candidate in Zhejiang University. His main research interests are focused on micro-optics, laser and biochip detection technologies.