

共焦生物芯片扫描仪光束分离器设计探讨*

李映笙 倪旭翔 陆祖康 王立强

(浙江大学现代光学仪器国家重点实验室, 浙江大学国家光学仪器工程技术研究中心, 杭州玉泉 310027)

摘要 指出激光共焦生物芯片扫描仪的光束分离器设计最终影响系统分辨率, 简要给出了采用波长光束分离器和几何光束分离器的优缺点. 为满足仪器扫描分辨率和灵敏度这对互相受牵制的因素, 系统地分析了几何光束分离器中, 采用的反射镜孔径的定量分析计算方法. 所得的结果对几何光束分离器的设计和性能的评价有重要的意义, 最后给出实验结果.

关键词 共焦扫描; 光束分离器; 分辨率; 灵敏度

中图分类号 TN247 **文献标识码** A

0 引言

生物芯片技术是 90 年代中期以来发展的重大科技进展之一, 在生物医学、生命科学研究中应用很多, 而生物芯片扫描仪是生物芯片能否广泛应用的关键仪器^[1]. 目前, 随着生物芯片集成度的提高, 所用反应物的量的减少, 其激发所产生的荧光信号越来越微弱, 因此, 获取高准确度, 高分辨率的生物芯片检测设备至关重要. 激光共聚焦扫描是生物芯片扫描仪中最常用的一种技术, 因能有效的抑制背景提高信号的特点, 可比其他类型的扫描仪获得更高分辨率的图像信号^[2].

在共焦扫描中, 影响分辨率的因素很多, 激发光光斑尺寸、探测器、针孔尺寸和位置、荧光收集物镜的数值孔径等等都会产生影响, 因此扫描仪设计中存在许多关键特性. 本文从保证系统分辨率和灵敏度因素出发, 分析了共焦扫描仪中光束分离器的设计.

1 激光共焦扫描仪结构原理

实验的原理如图 1 所示, 平行的激光束经过光束分离器后进入物镜 3, 聚焦的激光光斑激发芯片荧光发光, 物镜采集到部分球状散射的荧光释放光, 并使得这些光成为平行光, 同时采集被反射的激光, 再次到达光束分离器, 光束分离器将大部分激光反射回激光光源处, 并使得大部分荧光通过, 经窄带滤色片后由物镜 2 收集, 最后由 PMT(光电倍增管)接受. 由于激光光束与释放光束同路径, 为区分开样品上反射和散射的光与荧光, 选择合适的光束分离器至关重要, 一般采用两种类型^[3], 一种光束过滤

器是色彩二向或多向过滤器, 它将激发光束反射并把释放光束以一较长的波长传输, 这种滤光器一般是用二向式滤光片, 由于系统中激光功率大于荧光功率有 10^6 数量级, 要将激光反射光和荧光释放光很好分离, 难度较大, 成本高, 在对三、四种或以上的混和光束分离, 则有很大困难. 另外一种称为几何光线分离器, 如图 2 所示, 采用一块小反射镜将芯片上反射回的激光反射到光源处, 余下的环行荧光释放光通过, 或者如图 1 示, 采用一块大反射镜, 中心开孔让激光返回到光源处的方法, 两种方法原理相同, 他们的分离效果可达到与前者光束分离器近似, 但制作简单许多, 并且降低成本. 我们研制的扫描仪采用图 1 所示的反射镜开孔的方法, 孔尺寸的设计受系统分辨率要求的限制, 并进而影响系统的扫描灵敏度.

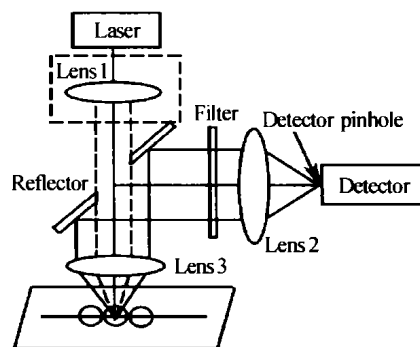


图 1 实验原理图

Fig. 1 Schematic diagram of the experiment

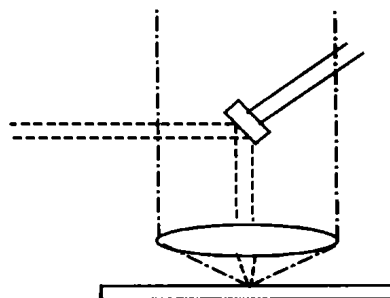


图 2 几何光束分离器示意图

Fig. 2 Schematic diagram of geometric beamsplitter

*国家重点自然科学基金项目

Tel: 0571-87951213 Email: jessie_lee@163.com

收稿日期: 2003-10-13

2 光束分离器 - 反射镜孔尺寸的设计

反射镜孔大小要受激光光束尺寸制约, 根据高斯光束的透镜变换性质, 因透镜孔径的衍射作用, 高斯光束通过透镜聚焦的光斑尺寸极限值由夫琅和费衍射决定. 系统为了得到 δ 的扫描分辨率, 根据瑞利判断, 扫描光斑的爱里斑半径 r 至多为 δ , 衍射像斑的爱里斑半径计算式为

$$r = 1.22 \frac{\lambda}{d} \quad (1)$$

可得高斯光束的直径 $d = 1.22\lambda/r$, 激光光束的直径与系统要求的分辨率成反比函数. 系统为达到更高的分辨率, 务必对激光束进行扩束, 才能达到所要求的分辨率. 经过扩束的激光束进入光束分离器, 要求其分离器上的反射镜的几何尺寸适合分光. 由于采集物镜的孔径一定, 使得采集到的荧光范围一定, 当分离器上反射镜的孔直径越大, 经过分离器后的荧光释放光就损失越多, 影响仪器的灵敏度检测范围, 使之无法适应各种荧光强度样品的读取. 因此, 设计反射镜上的孔尺寸需要根据分辨率和灵敏度间作出协调决定.

为研究分析孔径值, 引入激光作为扫描仪光源. 激光为扩束后直径达到 d 的高斯光束, 则其光强分布为

$$I_0(r) = \frac{4}{d^2} \exp\left(-\pi \frac{4r^2}{d^2}\right) \quad (2)$$

在到达光束分离器上的反射激光经过两次透镜成像, 荧光释放光经过一次成像. 为简化分析, 不考虑透镜的放大倍数, 激光在生物芯片上的光强分布为

$$I_L(r) = I_0(r) \otimes_2 |h(r)|^2 \quad (3)$$

式中 $|h(r)|^2$ 是物镜的点光强扩散函数^[4,5]

$$|h(r)|^2 = \left| \frac{J_1(r)}{r} \right| \quad (4)$$

根据傅里叶 - 贝塞尔变换, 写为

$$I_L(r) = \int_0^\infty F_2\{I_0(r)\} F_2\{|h(r)|^2\} \cdot J_0(2\pi r \rho / \lambda f) \rho d\rho \quad (5)$$

F_n 表示 n 维傅里叶变换, 经变换即为

$$I_L(r) = \int_0^{d/\lambda f} \exp\left(-\pi \frac{d^2}{4} \rho^2\right) \left[\cos^{-1}\left(\frac{\rho}{d/\lambda f}\right) - \frac{\rho}{d/\lambda f} \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{d/\lambda f}\right)^2} \right] J_0(2\pi r \rho / \lambda f) \rho d\rho \quad (6)$$

图 3 表示了此函数的分布曲线. 可知, 此光束仍为高斯光束, 光强分布又可表示为

$$I_0(r') = \frac{4}{d'^2} \exp\left(-\pi \frac{4r'^2}{d'^2}\right) \quad (7)$$

激光激发生物芯片上荧光发光, 若荧光与扫描激光

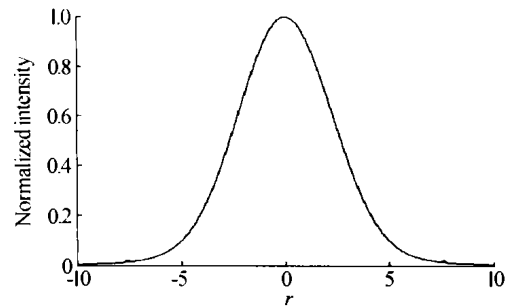


图 3 生物芯片上激光强度分布

Fig. 3 Intensity of the laser on biochip

的光强成线性关系, 到达光束分离器上荧光光强的分布为

$$I_F(r') = K I_0(r') \otimes_2 |h(r')|^2 \quad (8)$$

反射回的激光光强分布为

$$I_L(r') = I_0(r') \otimes_2 |h(r')|^2 \quad (9)$$

分别对式(8)、(9)傅里叶变换, 得到

$$I_F(r') = K \int_0^{D/\lambda f} \exp\left(-\pi \frac{d^2}{4} \rho^2\right) \left[\cos^{-1}\left(\frac{\rho}{D/\lambda f}\right) - \frac{\rho}{D/\lambda f} \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{D/\lambda f}\right)^2} \right] \quad (10)$$

式中 D 为采集物镜的出瞳孔径直径值.

$$I_L(r') = \int_0^{d'/\lambda f} \exp\left(-\pi \frac{d'^2}{4} \rho^2\right) \left[\cos^{-1}\left(\frac{\rho}{d'/\lambda f}\right) - \frac{\rho}{d'/\lambda f} \sqrt{1 - \left(\frac{\rho}{d'/\lambda f}\right)^2} \right] \quad (11)$$

图 4 表示了光束分离器的反射镜上荧光与激光的归一化强度分布. 图中表明, 激光、荧光强度分布半径尺寸不同, 所以必定存在一个最佳的孔尺寸, 使得生物芯片返回的激光和荧光经光束分离器后, 余下的荧光强度保持一定的强度, 而大部分激光返回到光源. 衡量其最优值则跟 PMT 探测器探测的信号有关. 系统为提高检测弱信号的能力, 即提高检

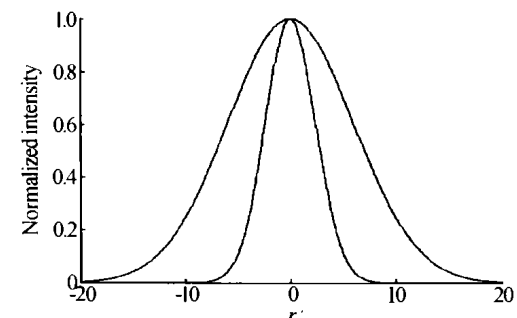


图 4 反射镜上荧光与激光的归一化强度分布

Fig. 4 Intensity of the fluorescence and laser on the reflector

测灵敏度, 需要提高探测器的信噪比. 生物芯片扫描系统的噪音主要为散粒噪音 $N^{[6]}$, N 定义为探测器测到的总光子数的平方根, 即 $N = \sqrt{I_S + I_B}$, 其中 I_S 为信号, I_B 为背景, 则信噪比为

$$SNR = I_S / \sqrt{I_S + I_B} \quad (12)$$

经过分离器的荧光强度即为探测器探测的信号

$$I_s = \int_{d'/2}^{D/2} I_F(r') dr' \quad (13)$$

背景为反射的激光和光学器件本身漫反射产生的杂散光,后者扫描过程中始终存在,设为 B ,背景可以表示为

$$I_B = \int_{d'/2}^{D/2} (I_L(r') + B) dr' \quad (14)$$

则 SNR 随 d'' 的函数变化

$$SNR = \frac{\int_{d'/2}^{D/2} I_F(r') dr'}{\sqrt{\int_{d'/2}^{D/2} I_F(r') dr' + \int_{d'/2}^{D/2} (I_L(r') + B) dr'}} \quad (15)$$

曲线由图 5 所示. 由图可见,存在一个值 d'' ,使得 SNR 为最优. 此 d'' 即为光分离器上反射镜的孔直径的最优值,此时,可得到在相同激光强度照明和相同的 PMT 增益下最高的灵敏度.

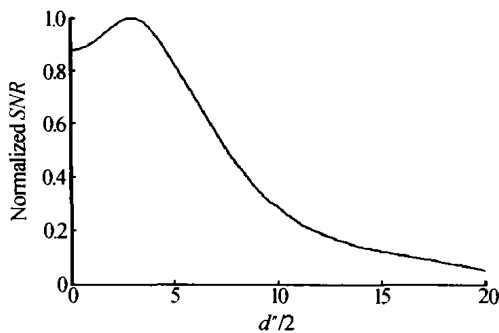


图 5 随反射镜孔半径的 SNR 变化曲线

Fig. 5 Normalized SNR as a function of reflector radius $d'/2$

3 实验结果

采用以上所述的设计方法进行扫描仪研制,为保证系统分辨率达到 $10 \mu\text{m}$,激光束直径至少为 3 mm (物镜 $f = 47 \text{ mm}$, $\lambda = 532 \text{ nm}$),实验中光束分离器的反射镜孔采用了 3.5 mm ,对 $10 \mu\text{m}$ 分辨率板进行扫描,如图 6 所示, $10 \mu\text{m}$ 的线对清晰可辨(数字 10 表示黑线宽度为 $10 \mu\text{m}$),表明系统已经达到了 $10 \mu\text{m}$ 的分辨率. 同时对灵敏度测试板进行了扫描,图 7 即为微阵列扫描仪校准片的灵敏度测试伪彩图^[7],根据灵敏度板的说明,圆靶点的信噪比大于 3 认为是可检测的灵敏度,扫描图经过分析,可以检测出从右到左第 17、18 行,对照说明书图表,

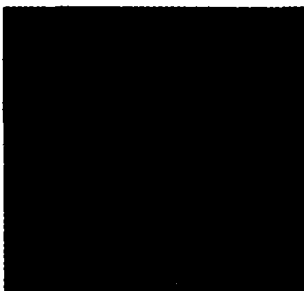


图 6 $10 \mu\text{m}$ 分辨率扫描图

Fig. 6 The scanned image of $10 \mu\text{m}$ resolution

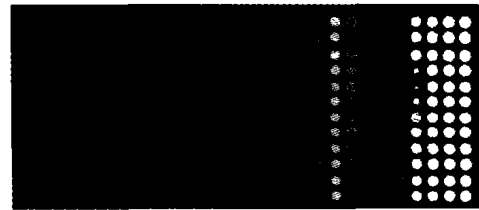


图 7 灵敏度板扫描图

Fig. 7 The scanned image of sensitivity

即接近达到 $1 \text{ 荧光分子}/\mu\text{m}^2$,图像与 Genepix4000B 的仪器扫描结果进行了比较分析,图像近似. 光束分离器反射镜孔的设计满足了系统分辨率和灵敏度的要求.

图 8 给出了我们研制的的扫描仪所采集的丙型肝炎病毒片段抗体的蛋白芯片扫描图(未经图像处理). 图像背景均匀,信噪比高,通过数据分析处理,与 Genspix4000B 扫描仪得的图像分析结果比较,所得分析结果无甚差异.

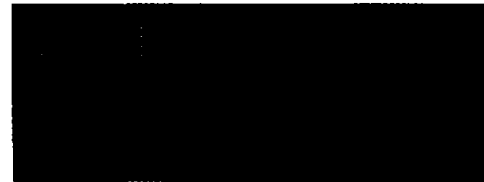


图 8 蛋白芯片扫描成像图

Fig. 8 The scanned image of the protein-chip

4 结论

由以上分析与实验可知,采用几何光线分离器能简单有效的实现光束分离,并且能保证达到良好的系统扫描分辨率和灵敏度,设计远比波长光束分离器简单. 以上也可见,若系统要达到更高分辨率,则需对激光进行更高倍扩束,分离器的反射镜孔径也相应增大,为了保证系统灵敏度,物镜的数值孔径要增大,这样就势必增大系统的设计尺寸;另外今后的扫描仪有向多种波长激发光发展的趋势,简单的几何光线分离器满足不了多种要求,所以设计一个良好的光束分离器还是有很大的研究意义的.

参考文献

- 1 Fodor S P A, Rava R P, Huang X C, *et al.* Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, 1993, **364** (6437): 555 ~ 556
- 2 张天浩, 张春平, 张光寅. DNA 芯片制作原理及其杂交信号检测方法. *生物工程进展*, 2000, **20**(2): 61 ~ 68
Zhang T H, Zhang C P, Zhang G Y. *Journal of Chinese Biotechnology*, 2000, **20**(2): 61 ~ 68
- 3 吴岚君. 生物芯片(DNA 微阵列)荧光扫描仪中的激光共聚焦扫描技术. *基因快讯*, 2001, (3)
Wu L J. *Gene News*, 2001, (3)
- 4 Gu M, Sheppard C J R. Effects of a finite-sized detector on the OTF of Confocal Fluorescent Microscopy. *Optik*, 1991, **89** (2): 65 ~ 69

- 5 Wilson T, Carlini A R. Three-dimensional imaging in confocal imaging systems with finite sized detectors. *J Microsc*, 1988, **149**(1): 51 ~ 66
- 6 高万荣, 陶纯堪, 杨晓春. 共焦扫描显微成像的光学断层平面分辨率与信噪比之间的关系. *光子学报*, 2002, **31**(6): 730 ~ 735
- 7 Gao W R, Tao C K, Yang X C. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(6): 730 ~ 735
- 7 Full Moon Biosystems. Inc. . Microarray Scanner Calibration Slide User's Guide. Part Number: FMB DS 01, 2 ~ 9

Research on Design of Beamsplitter in Confocal Biochip Scanner

Li Yingsheng, Ni Xuxiang, Lu Zukang, Wang Liqiang

State Key Laboratory for Modern Optical Instrumentation, CNERC for Optical Instrument, Zhejiang University, Hangzhou 310027

Received date: 2003-10-13

Abstract The influence of the design of beamsplitter in confocal biochip scanner upon system's resolution is pointed out, then the two designs adapting dichroic or multichroic beamsplitter and geometric beamsplitter are listed and compared with each other briefly. A quantitative calculative method of the hole diameter of reflector in geometric beamsplitter, according with the demand of the scanning resolution and sensitivity—a pair of counteractive factors, is analysed mainly. The result is very useful for the design and characteristic evaluation of geometric beamsplitter, and the experiment results are given.

Keywords Confocal scan; Beamsplitter; Resolution; Sensitivity



Li Yingsheng was born on April 29, 1977, in Zhejiang Province. She received her B. S. degree in Mechanical and Electrical Department, from Ningbo University, in 1999. Now she is pursuing her M. S. degree at CNERC for Optical Instrument, Zhejiang University. Her main research interest lies on optoelectronic detecting technology.