

文章编号 1004-924X(2014)08-2159-07

微流控细胞芯片 LED 诱导透射式荧光检测微系统

顾雯雯^{1,2*}

(1. 西南大学 工程技术学院, 重庆 400715;
2. 重庆大学 新型微纳器件与系统技术国家重点学科实验室, 重庆 400030)

摘要: 构建了用于微流控细胞分析芯片的发光二极管(LED)诱导透射式荧光检测微系统, 以克服现有荧光检测系统体积大、能耗高, 以及激发光光路、检测区域和荧光收集光路间光学耦合效率低等问题。该系统的激发光光路和荧光收集光路互成 135° , LED 发出的激发光经透镜聚焦和激发光滤色片滤光后, 经直径为 $200\ \mu\text{m}$ 的小孔光阑限束, 然后投射到微流控芯片通道末端的检测区域; 产生的荧光及杂散光经加工后置于微流控芯片底部的发射光高通干涉滤色薄膜后, 被光电倍增管收集。以 HepG2 肝癌细胞为测试样本对该荧光检测微系统的有效性进行了评测, 结果显示: 当 LED 工作电流为 200 mA, PMT 控制电压为 3.5 V 时, 可产生与背景噪声明显区分的峰值信号; 用 250 s 观测时间得到了 8 个平均峰高为 0.7 V 的峰值信号, 与荧光显微镜观察结果一致, 实现了细胞的在线计数检测功能。提出的系统为新型微全细胞分析提供了一种新的技术途径。

关键词: 荧光检测; 发光二极管(LED); 透射式光路; 微流控芯片; 细胞计数检测

中图分类号: TH744.5; TN312.8 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20142208.2159

LED induced transmitted fluorescence detector integrated in microfluidic cell chip

GU Wen-wen^{1,2*}

(1. College of Engineering and Technology, Southwest University, Chongqing 400715, China;
2. National Key Laboratory of Fundamental Science of Micro/Nano Device
and System Technology, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

* Corresponding author, E-mail: guww1983@163.com

Abstract: A transmitted fluorescence detector induced by a Light Emitting Diode(LED) was established for integrating in a microfluidic cell chip. The detector overcomes the problems of system bulky in larger size, higher energy consumption and low coupling efficiency for inducing optical path, detection zone and fluorescence optical path. The angle for induced fluorescence optical path was designed to be 135° . The exciting light produced by the LED passed through an optical lens, an exciting light filter and a diaphragm aperture with a diameter of $200\ \mu\text{m}$, and then reached the detection zone of microfluidic chip. The induced fluorescence light and stray light passed through emitting high pass interference thin film filter fabricated at the back of the microfluidic chip, and finally was collected by a

收稿日期: 2014-01-05; 修订日期: 2014-02-30.

基金项目: 中央高校基本科研业务费专项基金资助项目(No. XDJK2013C011); 西南大学科研基金博士基金资助项目(No. SWU112050); 重庆大学新型微纳器件与系统技术国家重点学科实验室访问学者基金资助项目(No. 2013MS05)

photomultiplier(PMT). The performance of the fluorescence detection micro system was verified by using HepG2 hepatoma carcinoma cells as samples. The experimental results show when the working current for LED and the control voltage for PMT are respectively set to be 200 mA and 3.5 V, the output is a peak signal which is obviously distinguished from background noise. 8 peak signals with an average value of 0.7 V are obtained within 250 s, which agrees with that from a fluorescence microscope. It shows the detection system realizes the function of cell counting detection, and is a new technological approach to micro total cell analysis systems.

Key words: fluorescence detection; Light Emitting Diode(LED); transmitted optical path; microfluidic chip; cell counting detection

1 引言

自微流控芯片问世以来,相关检测器的研究成为了人们关注的热点。迄今为止,已经发展出十几种微流控芯片检测技术。荧光检测器是检测灵敏度最高的检测器之一^[1]。目前激光诱导荧光(Laser Induced Fluorescence, LIF)的检测限可达皮摩尔每升至纳摩尔每升^[2]。但该检测器也有自身难以克服的缺点^[3]:其一,该系统体积较大、能耗和维护成本高且寿命短;其二,虽然激光光源单色性较好,但是每个特定波长的激光器所发出的光谱为数个或单个离散峰值^[4],不仅存在与荧光试剂最佳激发光谱匹配不佳的问题,而且当更换荧光试剂时,往往需要更换其它波长的激光器,使LIF检测器的成本进一步提高。虽然LED凭借其低功耗、小体积、宽光谱范围、长寿命、低成本等优点为替代荧光检测器中的激光光源提供了一种可能方案^[5],但是由于LED光谱范围较宽,当采用斯托克斯位移较小的荧光试剂时,与诱导产生的荧光光谱存在较大重叠,造成背景噪声较大,限制了系统检出限^[6,7];其三,考虑到微流控芯片荧光检测的特点,存在将微流控芯片重新安装、定位和检测,因此需要确保激发光光路、微流控芯片微通道检测区域、荧光收集光路间的光学耦合效率。虽然国外厂商(如安捷伦公司)通过采用标准化的高精度微流控芯片保证重复安装对准精度,但是由于对微流控芯片加工精度要求较高,因此加工成本也相应提高;国内大部分研究人员采用自行搭建手动调节平移台,在显微镜下观察聚焦光斑和微通道的对准情况来保证微流控芯片的重复安装对准精度,但是由于外部光学元件的引入,增加了荧光检测器的复杂性,不利于微流控芯片检测

器的集成化。

为了克服正交型荧光检测器中光源、检测区域、荧光信号难以实现最佳耦合带来的系统检出限较高,以及共线型荧光检测器存在的杂散光干扰等问题,本文提出激发光光路和荧光收集光路互成 135° 的LED诱导透射式光路结构;为了满足检测器小型化、便携化的要求,通过对各模块的合理布局和结构优化,获得了集成于微流控芯片的荧光检测微系统原理样机。

2 LED诱导透射式荧光检测微系统

2.1 系统构成

图1所示为应用于微流控芯片的小型LED诱导透射式荧光检测微系统结构示意图。激发光光路和荧光收集光路互成 135° ,可抑制杂散光干扰,实现荧光检测器中光源、检测区域、荧光信号的最佳耦合。其中,激发光单元由LED、聚光透镜、激发光滤色片和小孔光阑等组成。LED发出的激发光经聚光透镜聚焦后,由激发光滤色片滤除其它波长范围的入射光,仅使所需波长的入射光通过,入射光经小孔光阑限束后,投射到微流控芯片微通道末端的检测区域以激发荧光标记的待测样品发出荧光。产生的荧光及杂散光经加工于微流控芯片底部的发射光高通干涉滤色薄膜滤除杂散光,仅使荧光信号最大程度地通过小孔光阑,最后由光电探测器将荧光转换为电流信号,经信号处理电路放大、滤波处理后,送计算机显示输出。

以荧光试剂荧光素异硫氰酸^[8](Fluorecein Isothiocyanate, FITC)为例,探讨LED诱导透射式荧光检测微系统的光学器件选型方案。FITC是常用的对细胞中蛋白质进行染色的荧光试剂,其

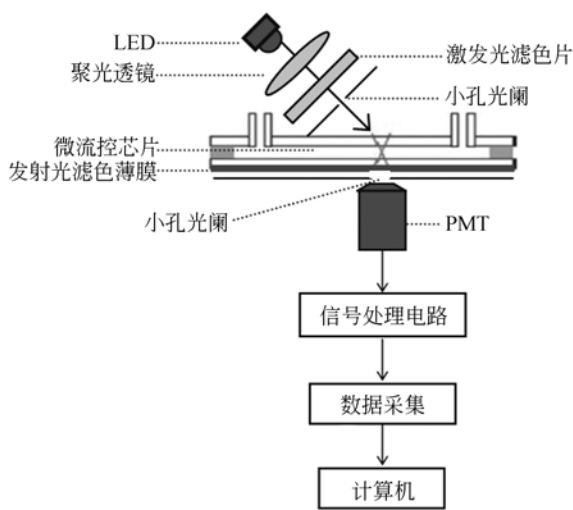


图 1 荧光检测器示意图

Fig. 1 Schematic drawing of fluorescence detection system

激发光谱和发射光谱曲线如图 2 所示。由 FITC 的光谱曲线可知,激发光谱和发射光谱的峰值波长分别为 493 和 518 nm,且两光谱曲线存在交叠。

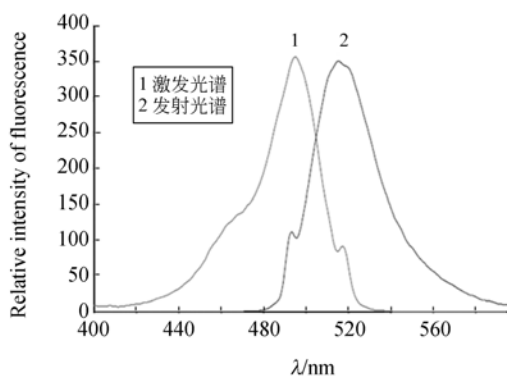


图 2 FITC 光谱曲线

Fig. 2 FITC spectrum curves

2.2 激发光单元的构建

根据荧光检测原理,为了获得较大的荧光激发效率,LED 的光谱曲线应与 FITC 的激发光谱曲线匹配。然而 FITC 的激发光谱和发射光谱的峰值波长存在较小差异($\lambda_{em} - \lambda_{ex} = 518 - 493 = 25$ nm)。因此,如果选择最大峰值波长为 490 或 495 nm 的 LED 作为激发光源,将造成与 FITC 的荧光发射光谱约 35% 的重叠,由此带来较高的背景噪声,从而增加后续检测的难度。进一步对 FITC 激发光谱分析发现在激发光谱 465~475 nm 内存在一个肩峰,选用峰值波长为 475 nm 的

蓝光 LED 激发 FITC 标记的细胞,虽然此处 LED 的光谱强度只有 FITC 激发光谱峰值波长 493 nm 处强度的一半,但是由于低的背景噪声,仍然能获得高的检测灵敏度和检出限。因此,选择峰值波长为 475 nm 的 LED 作为 FITC 荧光试剂的激发光源。

LED 发出的光是发散的,其纵向和横向的发光范围和发散角都不一致,因此,必须对其进行汇聚和准直,将其发散角限定在一定范围内。选用光学微透镜可实现此功能。激发光被聚焦后将形成一个微小光斑,光斑越小,投射到微流控芯片微通道中检测区域的面积就越小,荧光检测器的空间分辨率就越高。为了实现荧光检测器对细胞的计数检测功能,需将光斑大小限定在细胞直径尺寸,即 10~15 μm 内。根据高斯公式^[9]:

$$\omega = \lambda f / \pi \omega_0, \quad (1)$$

其中: ω 为光斑直径, f 为透镜焦距, ω_0 为入射光束直径。在透镜焦距和入射光波长一定的情况下,光斑直径与入射光束直径成正比。将已知参数代入式(1),选取 $\omega = 15 \mu\text{m}$, $\lambda = 475 \text{ nm}$, 得到 f/ω_0 。选择微透镜焦距为 2 cm 时,得到入射光斑直径 $\omega_0 = 200 \mu\text{m}$,即当入射光束直径大小为 200 μm 时,可以得到投射到微通道检测点的光斑大小与细胞直径尺寸相当,结合水力聚焦夹流进样,可实现对单个细胞的荧光激发和检测^[10]。而对入射光束直径的限制可以通过在聚焦透镜后加入孔径为 200 μm 的小孔光阑。

2.3 滤色片组

在 LED 诱导透射式荧光检测微系统的构建过程中,滤色片组由激发光滤色片和发射光滤色薄膜组成。将激发光滤色片的通带范围选择在 FITC 荧光试剂激发光谱的中心波长附近,能够有效抑制杂散光。由于选用了最大发射波长为 475 nm 的 LED 作为激发光源,激发光滤色片选用 Semrock 公司生产的 FF01-480/17-25 窄带带通滤色片,中心波长为 480 nm,半波宽为 22 nm,在 471.5~488.5 nm 内,平均透过率高达 93%,如图 3 中虚线所示。

为了减小微流控芯片微通道检测到光电探测器光敏面的距离,减小荧光的损失,发射光滤色薄膜采用在微流控芯片玻璃基底背部增镀光学干涉薄膜的方式取代传统滤色片,达到集成分离光学元件的目的。根据 FITC 发射光谱曲线的特

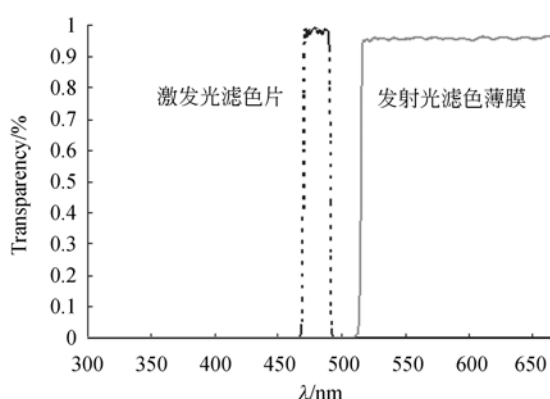


图 3 激发光滤色片和发射光滤色薄膜光谱曲线

Fig. 3 He spectrum curves of excited filter and emitted thin film filter

性,选用高通滤色薄膜,采用外协加工的方式,在成都超纯科技有限公司完成。该高通滤色薄膜由多层 SiO_2 和 TiO_2 薄膜交替组成,膜厚仅为 $2 \mu\text{m}$,其光谱测试曲线如图 3 实线所示,519~700 nm 内,平均透过率高达 90%。配合激发光滤色片的使用,可有效解决 FITC 荧光试剂的激发光谱和发射光谱的交叠问题,从而大大提高荧光检测的灵敏度。

2.4 小孔光阑

小孔光阑孔径的大小不仅决定光学系统层析能力的大小,同时也决定光学系统的荧光收集效率。小孔光阑的孔径越小,共焦系统的轴向分辨能力越高,系统层析能力越好。但是,另一方面,荧光检测的首要目的是对受激产生的荧光光强进行响应,因此,孔径越小,则通过小孔光阑后被光电探测器收集的荧光光强越弱,从而影响系统的信噪比。根据 Wilson 模型,当激发光波长与发射光波长的比例接近 1:1 时,在小孔光阑孔径 100、200、400 和 $600 \mu\text{m}$ 作用下,半峰值宽度 (Full Width at Half Maximum, FWHM) 的理论值分别为 8、14、28 和 $41 \mu\text{m}$ 。当微流控芯片微通道深度尺寸为 $30 \mu\text{m}$ 时,应选择孔径为 $400 \mu\text{m}$ 的小孔光阑放置于光电探测器前实现对微通道深度范围以外的杂散光滤除。综上所述,激发光单元和发射光单元分别选用孔径大小为 200 和 $400 \mu\text{m}$ 的小孔光阑,可实现单个细胞的荧光激发和检测。

2.5 光电探测器

荧光检测器中常用的光电探测器主要有电荷

耦合器件 (Charge-Coupled Device, CCD)、雪崩光电二极管 (Avalanche Photodiode, APD) 以及光电倍增管 (Photomultiplier, PMT)。其中, CCD 的光谱响应范围宽、动态范围大、可同时获取多通道数据信息,且具有成像功能。但普通 CCD 的灵敏度较低,在一定程度上限制了其在微流控芯片荧光检测中的应用。APD 利用载流子的雪崩倍增效应来放大光信号以提高检测的灵敏度,但是典型的 APD 光谱响应范围通常在红外区域,不满足 FITC 荧光试剂发射光谱的响应范围。PMT 具有响应速度快、灵敏度高、暗电流小等优点,是目前荧光检测器中应用最广泛的光电探测器。

在综合分析了微流控细胞分析芯片对 LED 诱导透射式荧光检测微系统的需求以及 PMT 的特性参数之后,选择北京滨松公司 CR-185 端窗式光电倍增管作为光电转换器件,光谱响应在 300~650 nm,最大响应波长为 420 nm。

PMT 的驱动电源采用滨松公司的 CC228-01Y 小型高压输出模块,该模块可以将输入的 12 V 直流电压转换为负高压输出,从而实现对 PMT 的驱动。通过调节高压模块的控制电压 (0~5 V),其输出电压值可在 $-1\ 250\sim 0\ \text{V}$ 之间连续变化。

3 实验与结果

3.1 试剂、仪器与样品制备

实验采用 LED 诱导透射式荧光检测微系统 (自制);微流控芯片 (自制:玻璃衬底,微通道长、宽、深尺寸分别为:30 mm、 $150 \mu\text{m}$ 、 $30 \mu\text{m}$;PDMS 盖片),可实现低浓度细胞悬浮液中荧光标记细胞的定量计数和测试;IX71 型奥林巴斯荧光倒置显微镜 (日本 Olympus 公司);HARVARD 流动注射泵 (美国 Harvard Apparatus 公司);磷酸盐缓冲液 (PBS, $\text{pH} = 7.2$);羟基荧光素二醋酸酯琥珀酰亚胺酯 (CFDA SE, C1031, 碧云天生物技术有限公司,激发波长为 490 nm,发射波长为 530 nm)。

细胞样品的制备:HepG2 肝癌细胞由重庆医科大学第一附属医院提供。取浓度为 8.5×10^5 Cell/mL 的细胞悬浮液,按体积比 3:2 加入浓度为 $50 \mu\text{mol/L}$ 的 CFDA SE 标记试剂,室温下孵

育 15 min,以 1 000 r/min 转速离心重悬 2 次,用 PBS 稀释后得到不同浓度荧光标记的肝癌细胞悬浮液^[11]。

3.2 PMT 工作电压优化

当无激发光照射时系统的输出即为暗噪声,以暗电流形式呈现。通过调节 CC228-01Y 小型高压输出模块的控制电压(0~5 V)可控制 PMT 的输出电压在-1 250~0 V 之间连续变化。通过对不同 PMT 控制电压作用下的 PMT 暗电流进行测试和分析,对 PMT 的工作电压进行优化。实验在 LED 激发光源不工作时,改变 PMT 控制电压,得到的系统输出为暗电流,测试结果如图 4 所示。

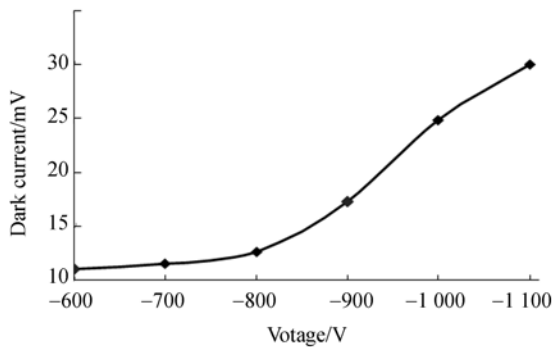


图 4 PMT 在不同工作电压下的暗噪声输出

Fig. 4 Dark noise change with different PMT working voltages

由图 4 可知系统的暗电流输出(以电压形式表示)随工作电压的增大而增加,当 PMT 工作电压在-700~900 V 内变化时,暗电流增加较快。另一方面,根据 PMT 的工作原理,工作电压在影响暗噪声输出的同时还影响光电流增益。综合两方面因素的考虑,选择-900 V 作为 PMT 的工作电压,同时根据 CC228-01Y 高压输出模块控制电压与 PMT 输出电压的关系,将小型荧光检测器的 PMT 控制电压设置为 3.5 V。

3.3 LED 工作电流优化

虽然小孔光阑、发射光滤色薄膜等对噪声具有一定抑制作用,但是不可避免地存在由于杂散光的引入引起的背景噪声。通过对不同工作电流 LED 作用下的系统噪声进行测试和分析,对荧光检测微系统的背景光抑制能力进行评价。

图 5 所示为系统噪声(以电压形式表示)随

LED 工作电流的变化曲线。LED 工作电流在 0~200 mA 内,系统噪声随 LED 工作电流增大而增加,当工作电流大于 200 mA 之后,系统噪声不再随 LED 工作电流的增大而增加,通过 LED 工作电流的增大引起的系统噪声增长率小于 20%,故将 LED 的工作电流设置为 200 mA。

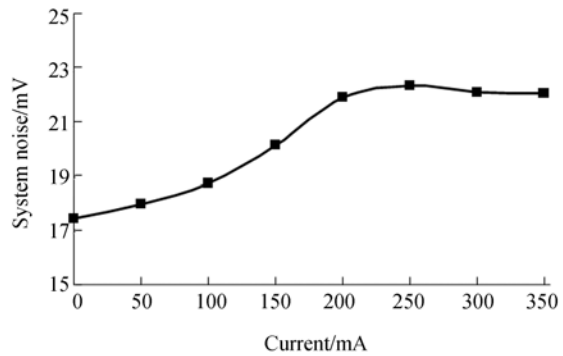


图 5 系统噪声随 LED 工作电流的变化曲线

Fig. 5 System noise changes with different LED working currents

3.4 细胞在线计数检测

图 6 所示为应用于微流控芯片的 LED 诱导透射式荧光检测微系统。微流控细胞芯片装载时通过插槽固定于上层电路板的特定位置,而机壳外侧机械旋钮的设计可对荧光检测系统中的激发光引入单位进行一维调节;芯片装载前,移去机壳顶部的滑动遮光板,顺时针方向扭转机械旋钮使激发光引入单位远离芯片区域,预留出足够空间,方便芯片的装载操作;芯片装载结束后,逆时针方向旋转机械旋钮,使激发光引入单元逼近芯片插槽区域,此时通过肉眼观测到 LED 发出的入射光斑覆盖芯片微通道检测区域。检测时,遮光板复位,

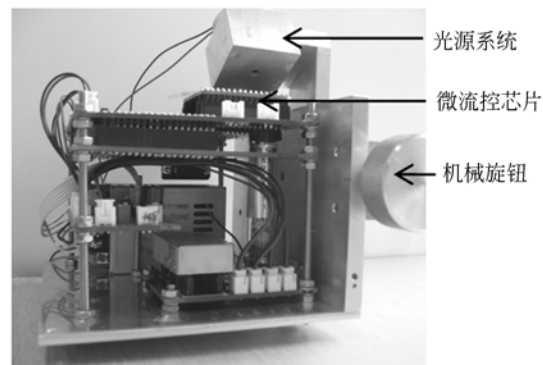


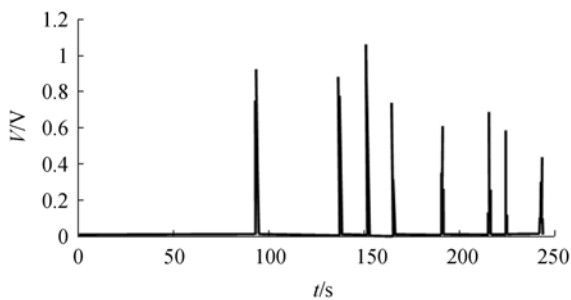
图 6 LED 诱导透射式荧光检测微系统原理样机

Fig. 6 Photo of LED induced transmitted fluorescence detector

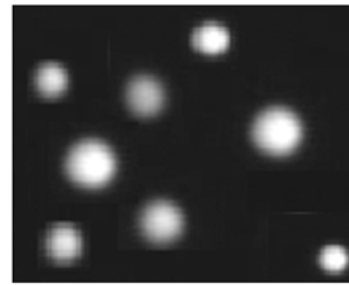
通过其上加工的孔径为 2 mm 的通光孔实现 LED 激发光的引入,完成待测样品的荧光检测。

检测系统顶部滑动遮光板的设计用于外界杂散光的屏蔽,其上加工了孔径为 2 mm 的通光孔,用以实现 LED 激发光的引入。

将自制的微流控芯片装载到荧光检测微系统中,采用重力进样,液差为 3 cm,使 PBS 溶液充满芯片微通道,待基线平稳后在芯片进样口储液池中滴加 CFDA SE 标记 HepG2 肝癌细胞悬浮液(浓度为 1×10^4 Cell/mL)。为了验证细胞个数与荧光检测信号出峰图个数是否一致,实验结束后,抽走进样口储液池中溶液,取出芯片,并立即在荧光显微镜下对废液池中荧光标记的细胞进行计数。荧光检测信号如图 7(a)所示,细胞进样约 95 s 后观察到出峰信号,表明细胞进过检测区域,产生一个明显的可与背景噪声区分的峰值信号,平均峰高为 0.7 V。在 250 s 观察时间范围内共计观察到 8 个峰值信号,与荧光显微镜观察结果一致(如图 7(b)所示),表明该荧光检测微系统可实现细胞的在线计数检测。



(a) 荧光检测信号出峰图
(a) Detection signal of fluorescence



(b) 显微观测图

(b) Microscopic image

图 7 肝癌细胞荧光检测结果图

Fig. 7 Fluorescence detection experiment results for hepatocarcinoma cells

4 结 论

本文以大功率 LED 为激发光源,构建了应用于微流控芯片的 LED 诱导透射式荧光检测微系统;通过设计和制作光路系统,实现了激发光光路、微流控检测区域以及荧光收集光路的最佳耦合。以 HepG2 肝癌细胞为测试样本对该荧光检测微系统的有效性进行评测,结果表明,当 LED 工作电流为 200 mA, PMT 控制电压为 3.5 V 时,在 250 s 观察时间内观察到 8 个平均峰高为 0.7 V 的峰值信号,与荧光显微镜观察结果一致,从而实现了细胞的在线计数检测功能。本文的工作为新型微全细胞分析系统提供了一种新的技术途径。

参考文献:

- [1] 薛巍,姜雯,苏荣国. 微流控芯片检测技术进展[J]. 化学分析计量,2007,3:77-79.
WUE W, JIANG W, SU R G. Development of the detection technique for micro-fluidic chip [J]. *Chemical Analysis*, 2007, 3: 77-79. (in Chinese)
- [2] 曾元儿,张凌. 仪器分析[M]. 北京:科学出版社,2007.
ZENG Y E, ZHANG L. *Instrument Analysis*[M] Beijing: Science press, 2007. (in Chinese)
- [3] 廖锡昌,郑慧斐,袁敏,等. 发光二极管诱导荧光微

芯片分析检测器的研制[J]. 光学精密工程,2009,17(12):2906-2911.

LIAO X CH, ZHENG H F, YUAN M, *et al.*. High-power light-emitting-diode induced fluorescence detector for microfluidic chip analysis [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2009, 12: 2906-2911. (in Chinese)

- [4] 王晟,张振荣,邵瑁,等. 瞬态流场定量测量中平面激光诱导荧光图像的降噪[J]. 光学精密工程,2013,21(7):1858-1863.

WANG SH, ZHANG ZH R, SHAO J, *et al.*. Denoising of PLIF images for flow parameter measure-

- ment[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(7): 1858-1863. (in Chinese)
- [5] 屠大维, 吴仍茂, 杨恒亮, 等. LED 封装光学结构对光强分布的影响[J]. *光学精密工程*, 2008, 16(5): 832-838.
- TU D W, WU R M, YANG H L, *et al.*. Effect of optical structure on output light intensity distribution in LED package[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2008, 16(5): 832-838. (in Chinese)
- [6] XUE SH H, UCHIYAMA K, LIA H F. Determination of ammonium on an integrated microchip with LED-induced fluorescence detection [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2012, 24(3): 564-570.
- [7] FISCHER M, WAHL M, FRIEDRICHS G. Design and field application of a UV-LED based optical fiber biofilm sensor[J]. *Biosensors and Bioelectronics*, 2012, 33(1): 172-178.
- [8] DAN X, ZHAO SH L, YUAN H Y, *et al.*. CE detector based on light-emitting diodes [J]. *Electrophoresis*, 2007, 28: 233-242.
- [9] HILLEBRAND S, SCHOFFEN J, MANDAJI M, *et al.*. Performance of an ultraviolet light-emitting diode-induced fluorescence detector in capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2002, 23(15): 2445-2448.
- [10] BIELER S, MATOVU E, MITASHI P, *et al.*. Improved detection of trypanosoma brucei by lysis of red blood cells, concentration and LED fluorescence microscopy[J]. *Acta Tropica*, 2012, 121(2): 135-140.
- [11] 李栋顺, 徐溢, 彭金兰, 等. 微流控细胞芯片 LED 诱导荧光检测微系统[J]. *高等学校化学学报*, 2012, 1: 49-53.
- LI D SH, XU Y, PENG J L. Microfluidic cell chip analytical system with LED induced fluorescence detector[J]. *Chemical Journal of Chinese Universities*, 2012, 1: 49-53. (in Chinese)

作者简介:



顾雯雯(1983—),女,重庆人,博士,2012年于重庆大学获得博士学位,主要从事生化微系统方面研究。E-mail: guww1983@163.com

(版权所有 未经许可 不得转载)