

使用光纤实现荧光定量 PCR 检测

刘志华

(杭州博日科技有限公司, 浙江 杭州 310053)

摘要:阐述了光纤在荧光定量 PCR 检测中的应用特点和荧光产生机理,给出了光纤耦合效率的计算公式。介绍了试验装置的构成和工作原理,列举了限制荧光检测的实际问题并提供了消除模块背景的方法。试剂检测的结果证实了使用光纤的检测系统具有很高的检测分辨率和 8 个数量级以上的动态线性范围,完全满足荧光定量 PCR 检测的要求。

关键词:光纤;荧光定量 PCR 检测

中图分类号: TN818

文献标识码: A

文章编号: 1672-4984(2006)03-0059-03

Fluorescent quantitative detection by optical fiber technology

LIU Zhi-hua

(Hangzhou Bori Science Ltd., Hangzhou 310053, China)

Abstract: This paper expounded the application, feature and calculation formula of optical fiber used in fluorescent quantitative detection system. It also introduced the structure and working principle and listed the real question of confinement fluorescence check-out and provided the method to eliminate the module background. The actual reagent examination result was confirmed systematically which having very tall examination response and dynamic examination limit. It meets the demand of fluorescent quantitative detection completely.

Key words: Optical fiber; Fluorescent quantitative detection

1 引言

聚合酶链反应 (Polymerase Chain Reaction 简称 PCR) 技术是一种在体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术,亦称无细胞分子克隆技术。它是以待扩增的两条 DNA 链为模板,在一对人工合成的寡核苷酸引物的介导下,通过耐高温 DNA 聚合酶的酶促作用,快速、特异地扩增出特定的 DNA 片段。

PCR 的荧光定量检测 (Real time-PCR),即通过荧光染料或荧光标记的特异性探针,对 PCR 过程中的产物量进行标记跟踪监控,利用荧光信号变化来计算分子初始模板量。

采用光纤和光电倍增管,可满足高样本密度、小体积、多色荧光实时检测的需要。

2 光纤应用的分析和计算

2.1 光纤应用的特点分析

(a) 石英光纤传输损耗小、可以弯曲、体积纤细、易于分配和组合、成本低廉,使得多色荧光实时定量 PCR 检测系统的结构设计变得简单。

(b) 将成千上万的细石英光纤组合成光线束,既能保证良好的光学性能,又能提供很强的信号量。光纤可以灵活组合、分配。

(c) 光纤端面对入射光角度有严格要求,入射角应小于光纤的数值孔径 (NA),否则无法传输。

(d) 当用光源激发光纤时,激发的效率和光纤在该点的数值孔径的平方成正比。

(e) 只有当光源的发射面积乘以发射的立体角小于光纤的光芯截面积乘以光纤的数值孔径时,使用透镜才能改善耦合效率,改善的倍数近似地和光源放大的面积成正比^[1]。使用锥形光纤过渡器,可使 NA = 0.26 的光纤的耦合效率从 17% 提高到 83%。

(f) 弯曲的光纤会使光的传播路径改变,使光能渗透过包层向外泄漏而损失^[2],光纤的最小容许曲率半径公式见式 1:

$$R_{\min} = \frac{2}{\quad} \quad (1)$$

其中 \quad 是由光纤折射率分布给定的常数, \quad 是光纤半径。

2.2 荧光机理和检测信号最大化

荧光定量 PCR 检测^[3] 采用了荧光能量传递技

术 (fluorescence resonance energy transfer, FRET)。FRET 是指通过供受体发色团之间偶极-偶极相互作用,能量从供体发色团转移至受体发色团,转移效率与两个发色团之间距离的 6 次幂倒数成比例^[4]。

荧光定量 PCR 检测中,如 FAM, VIC, 等荧光素,其使用活性是有时间限制的,在连续强光刺激下,其发光是会逐步衰退的。保持检测活性的途径就是仅在需要检测时才用激发光照射试剂。

激发光的强度与荧光信号强度成正相关。一般,激发光的强度是荧光信号强度的 1000 倍以上,因此荧光检测属于强背景条件下的弱信号检测。基于信号最大化的考虑,应提高激发光强度,降低光纤的耦合损耗,提高荧光信号的收集率,优化滤光片参数设计,降低信号“本底”背景。

2.3 光纤耦合效率的近似计算^[5]

为简化计算,假设光功率在光纤截面上是均匀分布的,光强的角分布和偏振也是均匀的,光纤为均匀折射率的多模光纤。

设 N 为光纤芯折射率与环境折射率之比(当空气环境时, $N = 1.46$); x 为偏移距离; r 为光纤半径;

L 为端面距离; Δn 为光纤芯包折射率差(均匀芯光纤 $\Delta n = 0.007$)。则两光纤的偏移耦合有关系式 2,两光纤的距离耦合有关系式 3。

实际系统中当光电倍增管窗口直径远大于光纤直径时光纤轴偏移的影响基本可忽略。而耦合距离间隙的影响因素较多,可能导致检测准确性下降:

$$\left(\frac{x}{r}, N \right) = \frac{16 \cdot N^2}{(1 + N)^4} \cdot 2 \cdot \arccos \frac{x}{2r} \cdot \left(1 - \frac{x^2}{2r^2} \right) \quad (2)$$

$$\left(\frac{L}{r}, N \right) = \frac{16 \cdot N^2}{(1 + N)^4} \cdot \left(1 - \frac{L^2}{4r^2} \right) \cdot \left(2 \cdot \frac{L}{r} \right) \cdot N \quad (3)$$

2.4 反射型光强调制的特征

两光纤并排,一根发射一根接收,在光纤端面存在反射体,其端面距离发生变化时,接收到的光功率发生变化,如图 1。当利用同一根光纤发射和接收时,其曲线中没有前沿。在同一光纤束内发射和接收光纤呈同心圆分布时,端面距离变化时,接收到的发射光也具有类似特征。

3 基于光纤的荧光定量 PCR 检测技术

3.1 试验装置

针对被测试管底部呈锥形的特点,光传导采用

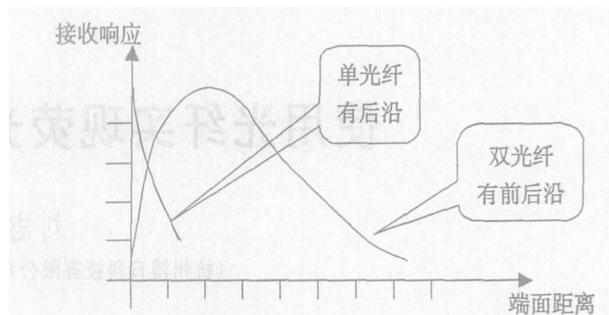


图 1 光纤端面反射情况

了同心圆方式的光纤束,系统见图 2。光纤束外圈传导激发光,单独引出接至激发光(LED);内圈传导荧光,单独引出接至光电倍增管(PMT)。

系统使用了步进电机旋转切换滤光片来选择检测所需的激发光谱和荧光光谱。典型的窄带激发滤光片中心波长是 470nm,窄带荧光滤光片中心波长是 525nm,适用于采用 FAM 荧光素的试剂。

系统通过单片机及驱动系统控制半导体制冷器的电流及方向,模块上设有温度传感器以实现 PCR 模块的闭环温度精确控制。系统实现多点温度智能循环,以使 DNA 获得有效聚合酶链反应扩增。

每次温度循环之后,检测头带动光线束直线移动对被测试管进行匀速扫描,激发光射入试管底部,试剂中荧光素与特定分子片段结合后发出荧光,信号经光纤束传到 PMT,再经过有源低通滤波电路、信号放大电路和 A/D 转换将数据传送到 PC 机,通过专用软件进行数据处理和定量分析。

为保证定量检测的准确性,采用了相对标准参照。即:在同次实验中,放入三个以上已知浓度等级的标准品,与被测品一起反应。扩增结束时,先对标准品计算相关系数,只有相关系数达到 0.98 以上才能认为实验结果可信,此时再以标准品为参照,计算被测品的初始分子片段数量。

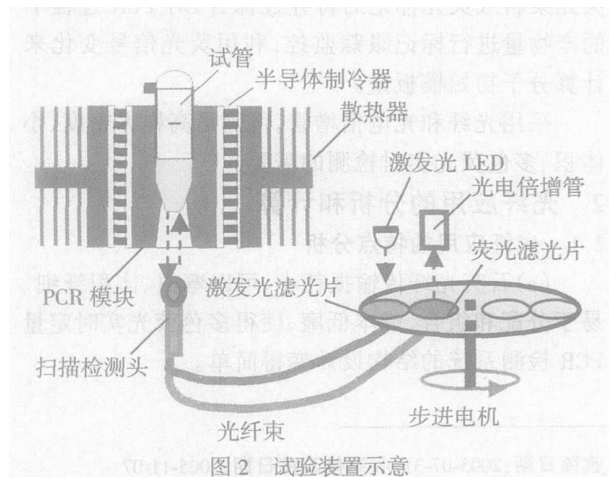


图 2 试验装置示意

3.2 限制检测性能提高的实际问题

(a) 受被测试管尺寸限制和结构限制,光纤束芯径有限,光纤的荧光信号收集率较低。

(b) 滤光片存在一定的厚度,LED 光源发出的光有一定角度,使得激发光无法直接全部射入光纤。PMT 接收到的荧光信号经过此空间也有较大衰减。

(c) 经光纤导出的荧光实际上并不是平行地入射到荧光滤光片,入射角的偏移使实际的滤光片带宽变的比设计值宽,从而容易扩大背景信号。

(d) 荧光检测对光学元件的对准角度、耦合间隙比较敏感,运动机构的任何摆动都能被检测出。要求光学系统严密遮光并且保证足够的零件加工、装配精度。

(e) 实际的荧光信号包含了各种频率的噪声(杂散环境光、电磁干扰信号),并与倍增管增益相关,在使用高增益光电倍增管时,需要在权衡各项利弊才能获得足够的信噪比。采用有源低通滤波技术,可使噪声降低到 0.5 %FS 以下。

(f) 实际的检测系统其温度循环变化时散热器热胀冷缩,导致光纤束与模块底部的距离有 0.035mm 以上的同步变化,并引起荧光信号出现周期为 3~5min、变化量为 1~3 %FS 的同步波动。通过改变模块横梁支点和降低散热器变形量,可以将此波动降低到 0.5 %FS 以下。

3.3 模块背景信号的消除

模块底部黑色材料的吸光能力有限,激发光照射到底部时存在反射,加上滤光片截止性能不理想,此反射的残余被光电倍增管测出,造成“本底”背景。当“本底”值比空孔信号大时,就影响了荧光的检测。

不恰当的滤光片参数设计可能使荧光信号完全淹没在“本底”背景之中。实际测试表明,激发光滤光片与荧光滤光片的通带响应交叉区应在 OD6 以下系统方能使用。

激发光反射值大小与检测头到模块的距离非常相关。当两者间相当接近时,由于激发光光纤与荧光光纤是同心圆分布,反射光无法进入荧光光纤,故模块底部反射值几乎为零;当两者距离为 0.01~1mm 内时,反射值逐步增大并出现峰值,即出现反射型光强调制的特征。

为获得足够大的荧光信号,并使运动系统有活动间隙,实际试验装置将距离控制在 0.2mm,且模块底部形状设计成 90°角槽型(见图 3),使激发光的反射经过二次衰减,有效消除了“本底”。

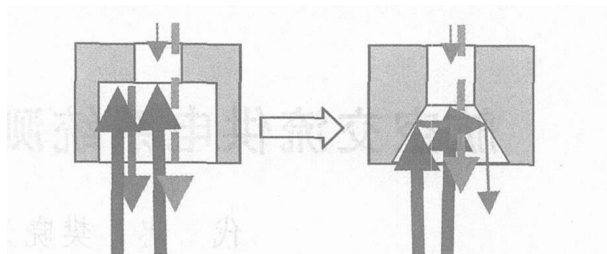


图 3 模块背景反射的降低

4 试验结果

4.1 检测分辨率

图 4 为试验装置的 HBV 试剂 10000/5000 copys 的扩增分辨情况,置信度达到 99.7 %,图形显示检测系统的分辨率、一致性、稳定性完全符合使用要求。

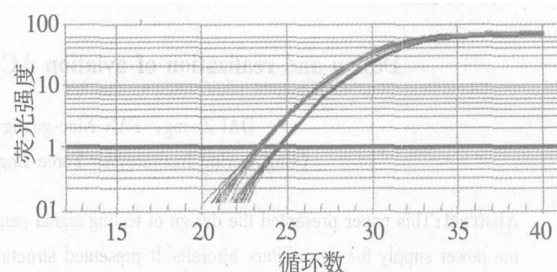


图 4 检测分辨率

4.2 动态线性范围

图 5 为 HBV 试剂 $10^1 \sim 10^8$ copys 的动态扩增结果,8 个浓度梯度的相关系数达到 0.999。满足 > 0.98 的数据可信度要求。

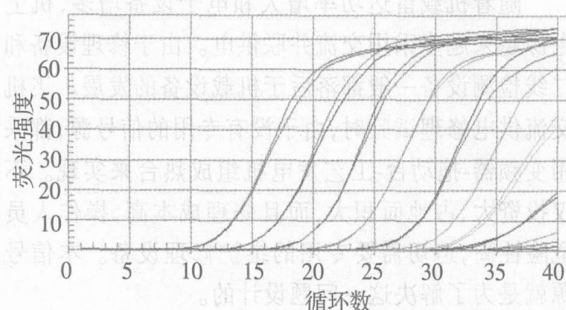


图 5 检测动态线性范围

5 结论

采用光纤的荧光定量 PCR 的检测,满足 1 %FS 信噪比要求,经过试剂试验,证实其性能达到了当前国际同类仪器的水平。

参考文献

- [1] 周树同,编译. 光纤理论与测量[M]. 上海:复旦大学出版社,1988.
- [2] 安毓英,曾小东. 光学传感与测量[M]. 北京:电子工业出版社,1995.
- [3] Szollosi J et al. Cytometry, 1998, 34: 159.
- [4] Ozaki H et al. Nucleic Acids Res, 1992, 20: 5205.
- [5] 吴坚,曹文祺. 聚合酶链式反应(PCR)荧光检测研究[J]. 计量学报, 2002, 23(2): 73 - 78.