

# 毛细管阵列电泳检测过程中的杂散光分析\*

汪洁<sup>1,2</sup>, 王立强<sup>1,\*\*</sup>, 石岩<sup>1</sup>, 郑华<sup>1,3</sup>, 陆祖康<sup>1</sup>

(1 浙江大学 光电系 国家光学仪器工程技术研究中心, 杭州 310027)

(2 广东技术师范学院 电子与信息学院, 广州 510665)

(3 福建师范大学 物理与光电技术学院, 福州 350007)

**摘 要:**建立了激光诱导荧光检测系统. 采用光学仿真方法, 建立与实际光学系统相同的模型. 模拟表明: 聚焦光束扫描毛细管阵列, 轴上光束入射到毛细管内径中心时产生的杂散光最大, 在两边逐渐减小. 由毛细管产生的杂散光的平均光强是无毛细管时的 2.725 倍, 说明由它产生的杂散光比较严重. 对不同大小的内径产生的杂散光影响进行了分析比较, 增大毛细管的内径, 杂散光增大, 但毛细管内径减小会使进样量少, 检测困难, 同时还会加大清洗与灌胶的难度. 综合考虑, 选取内径为 50  $\mu\text{m}$  的毛细管较为合适. 利用自行设计的激光诱导荧光检测系统扫描毛细管阵列, 进行了杂散光检测实验, 光电倍增管记录所收集到的信号, 作出了激光束扫描毛细管的不同位置时的杂散光信号强度分布图, 实验与模拟结果相一致.

**关键词:**激光诱导荧光检测; 杂散光; 毛细管阵列

**中图分类号:** TH742

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1004-4213(2008)02-0360-4

## 0 引言

在人类基因组计划和不断增长的测序应用的需求下, 高速 DNA 序列测定方法的发展日新月异. 毛细管电泳技术作为一种高效的分离手段使分析科学得以从微升水平进入纳升水平, 也使单细胞分析, 乃至单分子分析成为可能, 并已经成功地应用到各种不同的 DNA 分析研究中, 包括: DNA 序列测定、对限制性片断、合成核苷酸以及 PCR 产物的分离. 激光诱导荧光检测是灵敏度较高的检测技术之一<sup>[1-3]</sup>, 与其他现有的检测方式相比, 其灵敏度比紫外可见吸收检测高 2~3 个数量级, 能达到单分子的检测水平.

近年来, 毛细管阵列电泳<sup>[4]</sup>技术由于其快速、自动化、高效率的特点, 在临床、法医鉴定和普通的分子生物学中都有极其广阔的应用前景. 目前已经有多种不同类型的毛细管阵列检测系统如: 共焦荧光扫描检测系统、多点激发系统和多鞘流槽系统. 随着毛细管数量的增加, 关键的技术是如何减小背景噪声并成功地检测到排列的所有毛细管电泳信号, 完成高灵敏度检测.

利用自行设计的激光诱导荧光检测平台<sup>[5-8]</sup>进行毛细管电泳实验, 激光束垂直毛细管阵列平面入射进行扫描检测. 由于毛细管是圆柱体, 激发光束照射在毛细管的不同位置, 入射角度会发生变化, 在管壁及凝胶中由反射和折射产生的杂散光也不相同.

凝胶毛细管外壁和填充物分别是熔融石英 (fused silica) 和聚丙烯酰胺凝胶, 有不同的光学性质. 用会聚激光扫描, 光束照射在毛细管内外径和不同毛细管之间及边缘部分, 杂散光的强度和方向都会有不同, 观察不同位置时在收集物镜中的杂散光大小, 这对扫描方式十分有意义. 本文在光学模拟软件中建立了与实际系统相同的模型, 就这一问题进行了模拟与实验研究.

## 1 实验原理

自行设计的激光诱导荧光检测系统, 实验原理如图 1.

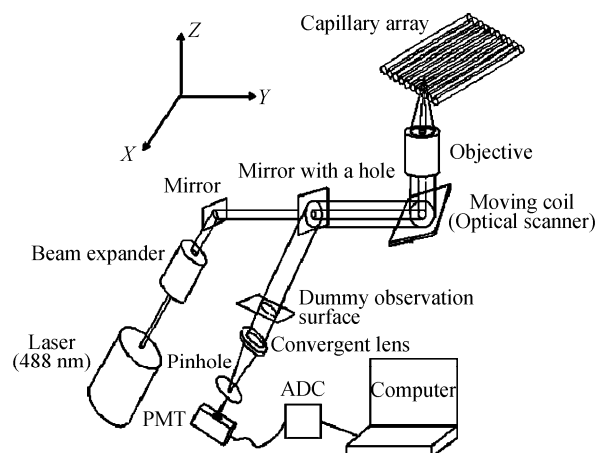


图 1 激光诱导荧光检测装置

Fig. 1 LIFD system

将激光光源、反射镜、带小孔反射镜、振镜、物镜、会聚镜以及毛细管按照图 1 中的实验光路尺寸在光学软件中建立一个系统模型. 在此模型中, 激光

\* 国家自然科学基金(60378042)资助

\*\* Tel: 0571-87187795-612 Email: wangliqiang@zju.edu.cn

收稿日期: 2006-10-26

器发出的激光经扩束镜扩束,经过反射镜和带小孔的反射镜,照射到振镜表面,由物镜将光束聚焦在毛细管的检测窗口上,荧光信号以及由毛细管管壁和凝胶产生的杂散光返回,再由物镜收集.通过振镜和带小孔的反射镜,由会聚镜聚焦,经过共焦小孔被光电倍增管探测,由振镜的摆动完成扫描过程.在会聚镜前,靠近光电倍增管的区域,建立一个虚拟平面,以此平面作为观察面(如图1).在软件中调整毛细管阵列在不同位置,保持光束位置不变(这相当于会聚激光的扫描).改变毛细管阵列的位置就会改变会聚光束照射在毛细管阵列的不同部位,如毛细管内径、外径、两毛细管之间等,假设毛细管之间紧密排列,中间没有空隙.将观察面上收集到的散射光,作为光电倍增管前的接收信号进行分析.

实验中经物镜会聚后的激光最小光斑为 $10\ \mu\text{m}$ ,考虑一定的误差,定义会聚激光垂直射入毛细管内径时,在毛细管内径中部光斑大小为 $20\ \mu\text{m}$ .分析分几个步骤:首先将会聚光束调节到一固定位置,比如聚焦光束正好照射到毛细管阵列中间一根管的外径中,由管壁和凝胶反射、折射的杂散光经物镜收集.然后将整个毛细管阵列顺序朝着一个方向移动,毛细管阵列每移动一步就在此位置进行一次追迹,观察面上得到不同的光强度分布.根据观察面所获得的平均光照度变化作一曲线,这样实际上得出了激光束扫描毛细管阵列的不同位置时杂散光的影响.在模拟过程中,还可以直接去除毛细管阵列,消除毛细管产生的杂散光,可以更清楚地对比出毛细管阵列产生的杂散光影响.

## 2 仿真结果

### 2.1 聚焦光束照射在阵列中间一根毛细管内径中心

聚焦光束照射在阵列的中间一根毛细管内径中心,得到观察面上的光斑图像.此时激发光束直接照射到毛细管的内径中心,假设毛细管内的聚丙烯酰胺凝胶均匀,没有加入荧光染料,大部分光束按原方向传播,由于毛细管管壁、凝胶和透镜材料的反射,会有部分光束返回,经带小孔反射镜反射到观察面,见图2.

在模型中将毛细管阵列去掉,其它参数不变,得到观察面的光斑图像,如图3.此时由于没有了毛细管管壁和凝胶杂散干扰,大部分光束按原方向传播,只是由于透镜材料的反射,会有部分光束返回到观察面上,由于经过带小孔的反射镜,所以图像是一个圆环.

比较图2和图3可以看出,毛细管管壁和凝胶产生的杂散光与去除毛细管的情况相比,两者的光

强度之比为2.725:1.可见光束扫描经过两个毛细管内径中心时杂散光比较严重,不过要探测的荧光信号也在此处.

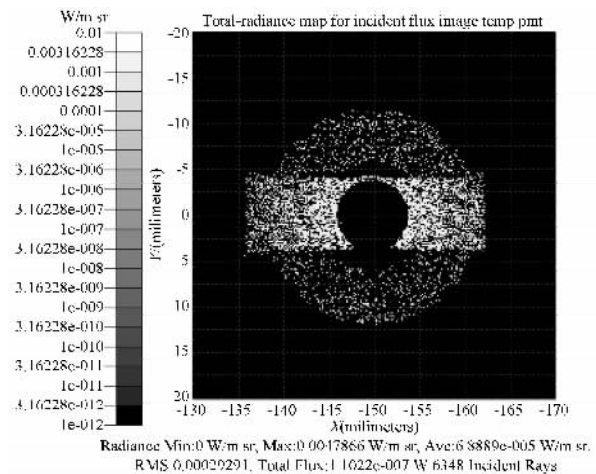


图2 聚焦光束照射在毛细管内径中心时观察面上光强度分布

Fig. 2 The distribution of stray light on the observation surface (focused laser beams illuminating the ID center of the capillary)

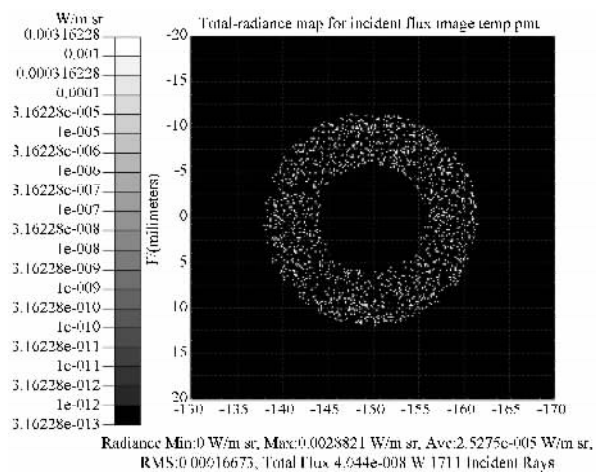


图3 聚焦光束位置不变,去掉毛细管阵列时观察面上光强度分布

Fig. 3 The distribution of stray light on the observation surface (taking out the capillary array)

### 2.2 激光束扫描一根毛细管不同位置时观察面的光强分布

当光束聚焦在阵列中的一根毛细管的外径中,此时激发光与毛细管外径的法面成一角度入射.由于毛细管外径与外面空气的折射率不匹配就会发生折射.移动毛细管阵列,相当于激光束扫描.激光束照射在毛细管的不同位置,由于反射和折射,物镜中有杂散光收集,在观察面上可以看到不同的光斑图像.

由上述模型阵列中,将整个毛细管阵列从左到右移动,商用毛细管的内径一般有25、50、75和 $100\ \mu\text{m}$ 等几个规格,外径一般是 $375\ \mu\text{m}$ .激光束扫描一根毛细管的不同位置,物镜中有不同的杂散光收集,记

录这些不同位置处的观察面收集平均光强度,并作图.由图4可见,激光扫描到毛细管内径中心时返回的杂散光最大.随着位置的移动,入射激光与毛细管之间的角度增大,大部分入射光束以一定的折射角折射出毛细管,小部分也按一定角度反射,观察面上收集到的杂散光慢慢减少,快到外径边缘部分时,由于角度变化及相邻毛细管间的相互干扰增加,杂散光又慢慢增大.

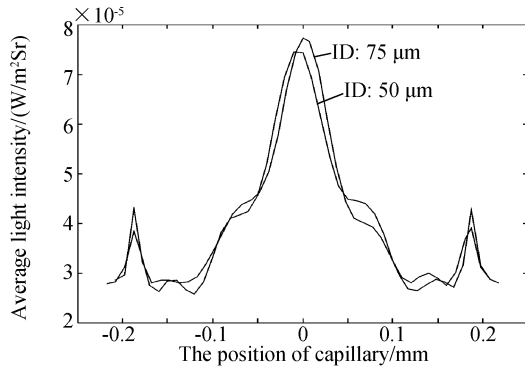


图4 激光束扫描阵列中毛细管时观察面上所得的光强分布

Fig. 4 The average intensity of the stray light when laser beams scan a capillary in simulation

如果除去像差影响,观察面上的杂散光分布以毛细管的内径中心为对称轴对称.对比上图,可以看出内径为75  $\mu\text{m}$ 的毛细管产生的杂散光比内径为50  $\mu\text{m}$ 的毛细管总体来说要大一些.

### 2.3 不同内径对杂散光的影响

为分析不同内径大小对毛细管产生杂散光的影响,选取聚焦光束照射到毛细管的内径中心处这一点来分析,因为此处毛细管产生的杂散光最大,这里也是光电倍增管要探测的信号位置.在软件中改变毛细管的内径,进行光线追迹,杂散光的分布如图5.

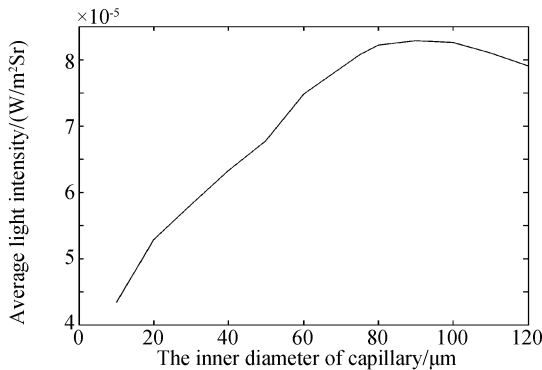


图5 不同内径的毛细管观察面上的杂散光强度

Fig. 5 Different ID effect the stray light on the observation surface

从图5可看出,增大毛细管的内径,杂散光是增大的,但是当内径增大到90  $\mu\text{m}$ 以上时,杂散光又有略微下降.增大毛细管内径,会使毛细管电泳的分辨率迅速下降,内径小的毛细管分辨率高且由毛细

管产生的杂散光小.但减小内径,又会使进样量少检测困难,同时还会加大清洗与灌胶的难度.因此,综合考虑,选取内径为50  $\mu\text{m}$ 的毛细管较为合适.

## 3 实验结果

为验证模拟结果的正确性,利用自行设计的激光诱导荧光检测系统(图1),在毛细管中灌入线性丙烯酰胺凝胶(与实际电泳环境一致,只是没有进样),聚焦光束照射到毛细管的某一部分,记录此时光电倍增管收集到的杂散光信号,将毛细管以10  $\mu\text{m}$ 的步长移动,重复记录,获得杂散光分布图如图6.

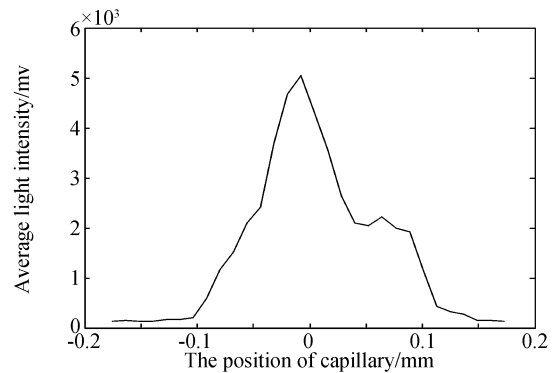


图6 扫描毛细管杂散光光强分布(毛细管内径为50  $\mu\text{m}$ )

Fig. 6 The intensity of the stray light when laser beams scan a capillary in experiment (ID of the capillary is 50  $\mu\text{m}$ )

图4和图6都显示了激光扫描毛细管不同部位时杂散光的变化,它们有着相同的趋势,只是图6的对称性稍差,这是由于实际光学系统的像差造成.以上两图说明模拟结果与实验比较一致.

## 4 结论

利用自行设计激光诱导荧光检测系统进行阵列毛细管电泳实验,采用光学分时扫描的方式进行检测.利用光学软件模拟了本检测系统,为毛细管管壁及凝胶设置一定参量,并在光电倍增管前建立一虚拟观察面.当激光束扫描阵列毛细管的不同位置,也就是激光束照射到阵列毛细管的不同位置,在虚拟观察面获得不同的光强分布,得到光强的分布特性:1)聚焦光束扫描毛细管阵列,轴上光束入射到毛细管内径中心,此时产生的杂散光最大,在两边边缘处逐渐减小.由毛细管产生的杂散光的平均光强是无毛细管时的2.725倍,说明毛细管产生的杂散光比较严重.2)分析了不同内径对杂散光的影响,对选取适当内径进行了综合分析;具体对内径为50  $\mu\text{m}$ 和75  $\mu\text{m}$ 的毛细管产生的杂散光进行分析比较.3)利用激光诱导荧光检测系统对毛细管杂散光进行了实验分析,光电倍增管记录所收集到的信号,作出了激光束扫描毛细管的不同位置时所得的杂散光信号强度分

布图,实验与模拟结果相一致。

#### 参考文献

- [1] SWINNEY K, BORNHOP D J. Detection in capillary electrophoresis[J]. *Electrophoresis*, 2000, **21**(7):1239-1250.
- [2] MARIE C R, JAN B, ALEXEI B, *et al.* DNA sequencing by capillary electrophoresis with replaceable linear polyacrylamide and laser-induced fluorescence detection[J]. *Anal Chem*, 1993, **65**(20):2851-2858.
- [3] FU Jing-lin, FANG Qun, ZHANG Ting, *et al.* Laser-induced fluorescence detection system for microfluidic chips based on an orthogonal optical arrangement[J]. *Anal Chem*, 2006, **78**(11):3827-3834.
- [4] LIU Shao-rong, REN Hong-ji, GAO Qiu-feng, *et al.* Automated parallel DNA sequencing on multiple channel microchips[J]. *PNAS*, 2000, **97**(10):5369-5374.
- [5] WANG Li-qiang, LU Zu-kang, NI Xu-xiang, *et al.* Auto gain control of the PMT used in confocal biochip scanner[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(3):314-317.
- [6] WANG Li-qiang, NI Xu-xiang, LU Zu-kang, *et al.* Research on laser confocal biochip scanner [J]. *Journal of Zhejiang University: Engineering Science*, 2005, (4):565-568.
- 王立强,倪旭翔,陆祖康,等. 激光共聚焦生物芯片扫描仪的研究[J]. *浙江大学学报(工学版)*, 2005, (4):565-568.
- [7] XU Guo-xiong, HUANG Zhen, NI Xu-xiang, *et al.* Analysis of fluorescence signal intensity and system sensitivity of biochip detection system[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(10):1192-1195.
- 徐国雄,黄震,倪旭翔,等. 生物芯片检测系统中荧光信号强度及系统灵敏度分析[J]. *光子学报*, 2004, **33**(10):1192-1195.
- [8] GU Huai-min, XING Da. Laser induced fluorescence spectroscopy analysis identifies atherosclerotic plaque[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2003, **32**(6):649-652.
- 谷怀民,邢达. 激光诱导荧光光谱识别动脉粥样硬化斑块的研究[J]. *光子学报*, 2003, **32**(6):649-652.

## Analysis of Stray Light in Capillary Array Electrophoresis with Laser Induced Fluorescence Detection

WANG Jie<sup>1,2</sup>, WANG Li-qiang<sup>1</sup>, SHI Yan<sup>1</sup>, ZHENG Hua<sup>1,3</sup>, LU Zu-kang<sup>1</sup>

(1 National Engineering & Technology Research Center for Optical Instrument, Zhejiang University, Hangzhou 310027, China)

(2 School of Electronic and Information, Guangdong Polytechnic Normal University, Guangzhou 510665, China)

(3 School of Physics & Optoelectronics Technology, Fujian Normal University, Fuzhou 350007, China)

Received date: 2006-10-26

**Abstract:** The laser induced fluorescence detection (LIFD) system was built. The same model as the detection system was simulated in emulation software of optics. The stray light is the strongest when the laser illuminates the inner diameter (ID) center of the capillary and it is gradually decreased along two edges. The stray light caused by capillary is 2.725 times larger than the case without capillary. The capillaries of different inner diameters were compared in simulation. The ID of capillary is larger, the stray light is stronger. It is difficult to inject the sample, gel and clean when decrease the ID of capillary. Integrating various factors, the 50  $\mu\text{m}$  ID of the capillary is appropriate. The Scanning the capillary was experimented with LIFD designed by ourselves; the stray light signals received by photomultiplier tube (PMT) are recorded. The stray light distribution figure is obtained. The experiment result is in agreement with the simulation.

**Key words:** Laser induced fluorescence detection; Stray light; Capillary array



**WANG Jie** was born in 1973, Now she is a lecturer and pursuing Doctorial degree in Zhejiang University. Her research interests focus on the optical instrument with fluorescence detection.