

文章编号: 1002-2082(2008)03-0339-04

用于探测生物芯片的制冷型 ICCD 系统

王红球, 蒋 硕

(清华大学 物理系, 北京 100084)

摘 要: 利用光锥耦合的 ICCD 系统探测荧光染料标记的生物芯片, 并对 CCD 芯片和像增强器制冷, 以提高探测灵敏度。基于实验分析结果, 指出背景噪声的主要来源为杂散光和生物芯片基底所发的荧光, 指出用镜头成像限制了系统探测灵敏度的提高, 可采用低荧光物质作为生物芯片的基底对系统加以改进。

关键词: 光学仪器; 生物芯片; ICCD; 背景噪声

中图分类号: TN386.5; Q819

文献标志码: A

Cooled ICCD system for biochip detection

WANG Hong-qiu, JIANG Shuo

(Department of Physics, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: An optical cone-coupled ICCD system was developed to detect the biochips labeled with fluorescent molecules. The CCD chip and image intensifier were cooled to increase the sensitivity of the system. Based on the analyzed results of the experiment, it is determined that the major background noise comes from the stray light and the fluorescence from the substrate impurities of the biochip, and the sensitivity of the system is limited by the objective lens for imaging. The background noise can be effectively reduced and the detection sensitivity can be improved by using a substrate with less fluorescent impurities, such as a quartz substrate.

Key words: optical instrument; biochip; ICCD; background noise

引言

生物芯片技术是指采用光导原位合成法或机械点样等方法, 将大量的生物样品有序地固化于支持物的表面, 然后与已经过染料分子标记的待测样品中的靶分子进行杂交反应, 通过检测标记信号的强度来判断样品中靶分子数量^[1]的技术。生物芯片技术已经广泛应用于基因测序、基因表达数据分析研究^[2]等领域。生物芯片技术包括芯片的制备和探测^[3]。随着芯片集成度的不断提高, 使用的反应样品量越来越少, 产生的信号越来越微弱, 这就要求信号探测系统有很高的灵敏度。

生物芯片探测主要分为扫描检测法和固定检测法 2 种^[4]。采用扫描检测法的激光共聚焦生物芯片扫描仪的探测灵敏度和分辨率高, 但扫描所需时间较长, 结构复杂, 价格昂贵, 很难在中小医院和科研单位得到应用。采用固定检测法的 CCD 生物芯片扫描仪结构简单, 曝光时间短, 减少了激发光对生物芯片的漂白, 并且价格较低。

1 ICCD 生物芯片扫描仪系统

1.1 CCD 生物芯片扫描仪

CCD 生物芯片扫描仪一般用激光或高强度氩

收稿日期: 2007-05-09; 修回日期: 2007-07-10

基金项目: 清华大学基础研究基金(052205006)

作者简介: 王红球(1981—), 男, 湖南桃源人, 硕士研究生, 主要从事光学仪器研究。

E-mail: wanghq00@mails. tsinghua. edu. cn

灯作为激发光源,光束滤光后照射经荧光染料标记的生物芯片,产生的荧光信号经过窄带滤光片,由镜头成像在 CCD 芯片上,然后将 CCD 产生的图像信号经过 A/D 转换后由计算机保存。选用半导体制冷后,可以降低 CCD 的噪声水平,这样可以延长曝光时间,提高信噪比。CCD 生物芯片扫描仪不需要对生物芯片逐点激发,而是一次获得整个芯片的谱图,所以不需要二维移动平台,提高了获取荧光图像的速度。

1.2 像增强器

由于 CCD 探测灵敏度相对较低,因此对 CCD 进行制冷并在 CCD 前面加入制冷的像增强器,可以提高其探测灵敏度,并能进一步缩短曝光时间。

像增强器由入射窗光阴极、微通道板(MCP)以及出射荧光屏组成。入射光照射光阴极后产生的电子到达 MCP, MCP 上的电子经倍增后打到出射荧光屏上产生图像信号,即形成了增强的图像^[5-7]。像增强器的主要参数有光阴极灵敏度、增益、等效背景照度、分辨率和信噪比等。像增强器噪声的来源主要是:暗背景引起的固定背景噪声,光子、光电子的量子特性引起的涨落随机噪声,微通道板等增益机构引起的增益噪声和荧光屏颗粒结构引起的颗粒噪声^[7]。其中固定背景噪声和增益噪声可以通过制冷的方式降低,随机噪声可以通过多次探测取平均值的方法降低。

1.3 光锥耦合型 ICCD 系统

由于生物芯片产生的荧光非常弱,因此 CCD 制冷以后所需要的曝光时间较长。笔者采用在 CCD 前面加光锥耦合像增强器,并对像增强器制冷的方法来提高其探测灵敏度,以缩短曝光时间。

探测系统原理和实验装置如图1所示。激发光经过扩束整形后,侧向照射用 Cy3 染料标记的生物芯片。Cy3 染料能吸收激光并发出荧光,发光量子

效率为 0.15^[9],吸收峰为 550 nm,发射峰为 570 nm。生物芯片受激发后产生荧光信号,经过滤光片后由镜头成像在像增强器的入射面上,图像再经像增强器倍增,由光锥传到 CCD 感光芯片上,最后通过计算机控制 CCD 采集并读出图像信号,完成一次对整个激发区域的探测,从而获得生物芯片的相关信息。

实验采用功率 30 mW,波长 532 nm 的半导体激光器,生物芯片固定于三维可移动夹持架上,滤光片采用 Semrock 公司的 Cy3 染料专用滤光片,在 570 nm 至 620 nm 之间透过率大于 90%,其他波长透过率接近零。成像镜头为 50 mm 标准镜头,330 万像素制冷型彩色 CCD 像素尺寸为 3.45 μm × 3.45 μm。选用北方夜视生产的 Φ18 mm 高性能近贴式像增强器 1XZ18/18WHS,入射面和出射面直径均为 18 mm,亮度增益 6800 cd/m²/lx,分辨率为 60 lp/mm,等效背景照度 0.12 μlx,信噪比为 25。使用山西太原长城微光公司生产的光锥,大端直径 18 mm,锥度比 2:1。选用以上仪器时考虑了成像质量及价格,虽然这会带来耦合效率有损失,但以上部件均已满足使用要求。由西安光机所王耀祥等协助将像增强器与 CCD 用光锥耦合,采用半导体制冷方式将像增强器制冷,做成制冷型 ICCD。

1.4 ICCD 探测微弱信号的灵敏度

灵敏度指系统能探测最弱信号的能力。探测生物芯片的灵敏度定义为信噪比大于 3 时能测定的荧光强度,通常用荧光分子数/μm²来表示^[8]。

研究 ICCD 系统探测微弱信号的灵敏度时,首先将激光耦合到光纤中做成点光源,再用镜头对点光源成像,逐步衰减激光,直到测出 ICCD 的探测下限为止。用光纤耦合的目的在于可以完全屏蔽杂散光。在探测时充分屏蔽杂散光,所测值为 ICCD 对 532 nm 光的探测下限。此时噪声主要是 CCD 以及像增强器的电子噪声和读出噪声,因而采用制冷后长时间曝光的方式,曝光时间 300 s,像增强器温度为 4 °C,CCD 芯片温度为 -20 °C,测得 ICCD 的可探测灵敏度为 2 × 10⁻¹⁵ W(镜头收集光的效率为 1/7,每秒钟到达每个 ICCD 像素上的光子为 10~20 个)。由于仪器结构的限制,无法进一步加大对像增强器的制冷功率,使得像增强器远未达到其最佳工作温度(约 -20 °C)。如果改变制冷方式,对像增强器进一步制冷,那么将使 ICCD 的探测灵敏度进一步提高。

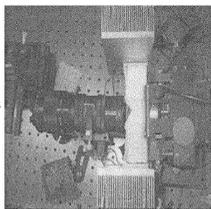
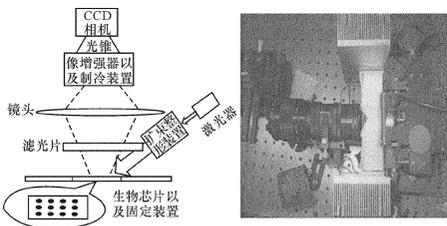


图1 生物芯片探测示意图和实际装置图

Fig.1 Sketch and photo of actual device for biochip detection

2 生物芯片探测及分析

2.1 实际芯片探测

用上述ICCD探测生物芯片时,像增强器温度为4℃,CCD芯片温度为-20℃,激发光经过扩束整形后功率约为8 mW,照射面积约为2 cm²。镜头距离芯片约10 cm,像的放大率为1。拍摄时CCD增益为36 dB,曝光时间823 ms,拍摄环境中除了激发光外已经屏蔽其他光源,拍摄的Cy3染料梯度片图样如图2所示。图中最右边L列的浓度为 7.7×10^4 fluor/ μm^2 ,A列所对应浓度为1 500 fluor/ μm^2 。图2中线框a所包含区域(A列)的强度分布如图3所示,线框b所包含区域强度分布如图4所示。图3和图4中本底噪声已由软件处理部分消除。由图3可知,该列样点的信噪比大于3。由于A列左边有些部分无法探测到,因此,我们认为仪器最低能探测到A列,对应浓度为1500 fluor/ μm^2 。

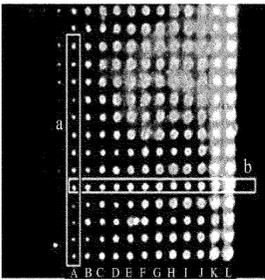


图2 生物芯片拍摄图

Fig. 2 A biochip picture detected by ICCD

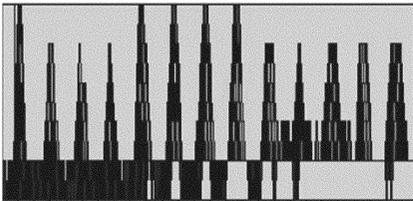


图3 图2线框a中各点相对强度

Fig. 3 Relative intensity of spots in frame a in Figure 2

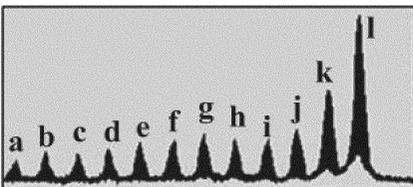


图4 图2线框b中各点相对强度

Fig. 4 Relative intensity of spots in frame b in Figure 2

而仪器自身探测微弱信号的灵敏度换算成生物芯片的浓度时最小为13 fluor/ μm^2 。

2.2 背景噪声来源分析

探测过程中产生的背景噪声很强,影响了ICCD对生物芯片的探测灵敏度。背景噪声的来源主要有:激光照射生物芯片的基底(玻璃)所产生的荧光,激光照射室内物体后的散射及其激发的荧光散射后进入镜头的杂散光(包括激光照射玻璃产生的荧光),CCD和像增强器的电子噪声与读出噪声所产生的背景。

下面采用不同的实验装置测量不同噪声所占的比例。

首先在相同拍摄条件(CCD增益为36 dB,曝光时间823 ms,像增强器温度4℃,CCD芯片温度-20℃)下,遮住部分激发光,使激发光只照射芯片的部分区域,拍摄结果如图5所示。图中左下方亮区为光照区域,右上为无光照区域。光照区域亮点为芯片上的样品点(其中部分样品点已经使CCD饱和)。在图5中选定线框a(a中样品点浓度为1 500 fluor/ μm^2),分析图中沿y轴方向的信号强度分布,其归一化的强度分布图如图6所示。其中AB段在无光照区的信号强度为各种杂散背景进入镜头产生的;BC段为光照空白区域,其强度为杂散背景和玻璃被激发后产生的荧光之和;CD段为样品点区域,尖峰为染料样品所发出的荧光。由图6可知,杂散光(相对强度值约为50)和本底荧光(强度值约为30)已经远大于染料样品所发的荧光(强度值约为20)。对激发光整形使照射光均匀,并多次拍摄取平均值,然后利用软件减去均匀的背景噪声可以提高信噪比。但由于玻璃被激发所产生的荧光不均匀,因而使得仪器探测生物芯片的灵敏度受到限制。

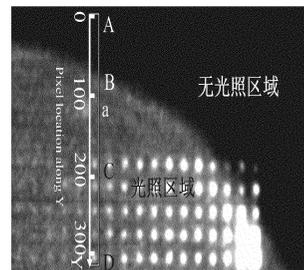


图5 局部照射样品图

Fig. 5 Photo of a part of biochip

在相同条件下遮住镜头进行拍摄,得到全黑的

背景图像,此背景图像即为 CCD 和像增强器级联后的电子噪声和读出噪声之和。此噪声相对图 6 的值约为 1,可以忽略。

将玻璃本底换成石英片本底,重复上述实验,发现荧光强度有所降低。由此可知,玻璃产生的荧光的确存在。实验中由于所换石英片并不纯,因此荧光依然存在。

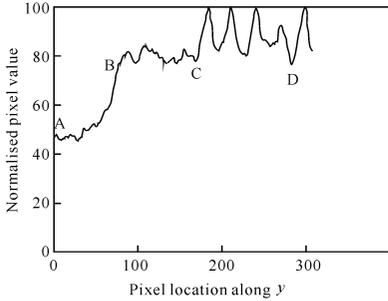


图 6 沿 y 方向强度分布

Fig. 6 Normalized intensity distribution along y direction

3 结论

笔者设计并制作出一套用于探测生物芯片的制冷型ICCD系统。该系统采用光锥将像增强器与 CCD 耦合,并对像增强器和 CCD 进行制冷以提高仪器性能,有效地提高了仪器的探测灵敏度。在去除背景光噪声的情况下,该仪器可以探测 2×10^{-15} W 的弱光信号。本系统结构简单,扫描时间短,在 1 s 以内即可完成对一张标准生物芯片的扫描,同时其成本仅为 5 万元人民币左右。

在实际生物芯片的检测中,本系统能满足生物芯片探测的实际需求。由于本系统采用普通镜头成像,对整个生物芯片曝光的方式引入了较强的背景噪声。经实验分析,背景噪声主要包括生物芯片基底所发荧光以及室内杂散光。这些背景噪声限制了本系统对生物芯片的探测下限。

该系统对微弱光信号的探测具有很高的灵敏度,也可以用于其他微光成像。

参考文献:

[1] 王立强,陆祖康,林斌. 生物芯片及其荧光信号检测[J]. 光学仪器,2002,24(Z1):7-13.

WANG Li-qiang, LU Zu-kang, LIN Bin. Biochip and fluorescence detection[J]. Optical Instruments, 2002,24(Suppl 1):7-13. (in Chinese)

[2] BROWN P O, BOTSTEIN D. Exploring the new world of the genome with DNA microarrays [J]. Nature Genet,1999, 21(Suppl):33-37.

[3] CHEUNG V G, MORLEY M, AGUILAR F, et al. Making and reading microarrays[J]. Nature Genet, 1999, 21(Suppl): 15-19.

[4] 马平,唐小萍,罗正全. 生物芯片扫描仪弱信号检测方法[J]. 微纳电子技术,2002,39(7):35-38. MA Ping, TANG Xiao-ping, LUO Zheng-quan. Weak signal detection technique of biochip scanner [J]. Micronanoelectronic Technology,2002,39(7): 35-38. (in Chinese)

[5] 赵文锦. 微通道板及其真空处理工艺研究[J]. 真空电子技术,1999(2):53-56. ZHAO Wen-jin. Micro-channel plates and their vacuum processing technology [J]. Vacuum Electronics, 1999(2):53-56. (in Chinese)

[6] 潘京生. 微通道板及其主要特征性能[J]. 应用光学,2004,25(5):25-29. PAN Jing-sheng. Microchannel plates and its main characteristics[J]. Journal of Applied Optics. 2004, 25(5):25-29. (in Chinese)

[7] 刘术林,李翔,邓广绪,潘京生,等. 低噪声、高增益微通道板的研制[J]. 应用光学,2006,27(6):552-557. LIU Shu-lin, LI Xiang, DENG Guang-xu, PAN Jing-sheng, et al. Development of low-noise, high-gain microchannel plate [J]. Journal of Applied Optics. 2006,27(6):552-557. (in Chinese)

[8] 安毓英,刘继芳,李庆辉. 光电子技术[M]. 北京:电子工业出版社,2002. AN Yu-ying, LIU Ji-fang, LI Qing-hui. Optoelectronic Technology [M]. Beijing: Publish House of Electronics Industry,2002. (in Chinese)

[9] 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. 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. (in Chinese)