

面向核酸现场快速检测的多重实时荧光检测系统

杨佳羽 曾俊添 奚邦朝 刘国镠 黄绍磊 张东旭

Multiple real-time fluorescence detection system for rapid on-site nucleic acid detection

YANG Jiayu, ZENG Juntian, XI Bangchao, LIU Guoqiang, HUANG Shaolei, ZHANG Dongxu

引用本文:

杨佳羽, 曾俊添, 奚邦朝, 等. 面向核酸现场快速检测的多重实时荧光检测系统[J]. 应用光学, 2023, 44(4): 859–867. DOI: 10.5768/JAO202344.0403007

YANG Jiayu, ZENG Juntian, XI Bangchao, et al. Multiple real-time fluorescence detection system for rapid on-site nucleic acid detection[J]. Journal of Applied Optics, 2023, 44(4): 859–867. DOI: 10.5768/JAO202344.0403007

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.5768/JAO202344.0403007>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

考虑太阳辐射影响的飞机实时红外探测成像仿真

Real-time infrared detection imaging simulation of aircraft considering influence of solar radiation

应用光学. 2019, 40(6): 929–936 <https://doi.org/10.5768/JAO201940.0601001>

基于FPGA的雾霾视频图像实时复原系统研究

Research and implementation of real-time fog and haze video image restoration system based on FPGA

应用光学. 2019, 40(5): 812–817 <https://doi.org/10.5768/JAO201940.0502004>

可用于现场快速检测的小型化多通道光谱测量系统

Portable multi-channel spectral measurement system for rapid on-site detection

应用光学. 2021, 42(2): 310–316 <https://doi.org/10.5768/JAO202142.0203004>

基于离焦图像复原的光学设备实时视频对焦方法

Real-time video focusing method for optical equipment based on defocus image restoration

应用光学. 2020, 41(1): 43–54 <https://doi.org/10.5768/JAO202041.0101007>

阵列细丝直径实时快速检测系统设计

Real-time and fast detection system of arrayed filament diameter

应用光学. 2021, 42(6): 1011–1016 <https://doi.org/10.5768/JAO202142.0602001>

基于结构光的植保无人机障碍物在线检测系统

Obstacle detection system of plant protection UAVs based on structural light

应用光学. 2018, 39(3): 343–348 <https://doi.org/10.5768/JAO201839.0301008>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

文章编号: 1002-2082 (2023) 04-0859-09

面向核酸现场快速检测的多重实时荧光检测系统

杨佳羽^{1,2,3,4}, 曾俊添^{1,2,3,4}, 奚邦朝^{1,2,3,4}, 刘国强^{1,2,3,4}, 黄绍磊^{1,2,3,4}, 张东旭^{1,2,3,4}

(1. 厦门大学 公共卫生学院, 福建 厦门 361102; 2. 厦门大学 分子疫苗学和分子诊断学国家重点实验室, 福建 厦门 361102;
3. 厦门大学 国家传染病诊断试剂与疫苗工程技术研究中心, 福建 厦门 361102; 4. 国家药品监督管理局
传染性疾病预防检测技术与评价重点实验室, 福建 厦门 361102)

摘要: 核酸现场快速检测具有便捷、操作简单、无需专用实验室、报告快速等优点, 能在机场、社区医院、海关、野外等各种复杂环境中进行检测。建立了一种可应用于核酸现场快速检测仪器的荧光检测系统, 包括非共聚焦式的正交光路与多通道检测集成结构。前者信噪比高、小型便捷; 后者切换效率高, 能满足多重检测, 其嵌合结构极大降低了通道间的荧光串扰。实验证明, 系统的检测下限低于 1.6 $\mu\text{g/mL}$, 荧光检测梯度性 R^2 值 (确定系数) 均大于 0.99, 重复性测试的 CV (coefficient of variance) 值不超过 1.27%。通道间荧光串扰测试表明, 通道间无串扰问题, 巨细胞病毒培养液的扩增实验准确性与稳定性较好, 表明该系统能够针对多重检测进行有效荧光激发与采集。

关键词: 核酸现场检测; 聚合酶链式反应; 荧光; 实时

中图分类号: TN202

文献标志码: A

DOI: 10.5768/JAO202344.0403007

Multiple real-time fluorescence detection system for rapid on-site nucleic acid detection

YANG Jiayu^{1,2,3,4}, ZENG Juntian^{1,2,3,4}, XI Bangchao^{1,2,3,4}, LIU Guoqiang^{1,2,3,4},
HUANG Shaolei^{1,2,3,4}, ZHANG Dongxu^{1,2,3,4}

(1. School of Public Health, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 2. State Key Laboratory of Molecular Vaccinology and Molecular Diagnostic, Xiamen University, Xiamen 361102, China; 3. National Institute of Diagnostics and Vaccine Development in Infectious Diseases, Xiamen University, Xiamen 361102, China;
4. State Drug Administration Key Laboratory of Infectious Disease Detection Technology Research and Evaluation, Xiamen 361102, China)

Abstract: On-site rapid detection of nucleic acid has the advantages of convenience, simple operation, no need for special laboratories, and rapid reporting, which can be detected in various complex environments such as airports, community hospitals, customs and fields. A fluorescence detection system that can be applied to on-site rapid detection instruments of nucleic acid was established, including non-confocal orthogonal optical path and multi-channel detection integrated structure. The former has the characteristics of high signal-to-noise ratio, small and convenient. The latter has high switching efficiency and can meet multiple detection, and its embedded structure greatly reduces the fluorescence crosstalk between channels. The experimental results show that the detection limit of the system is lower than 1.6 $\mu\text{g/mL}$, the R^2 value (coefficient of determination) of fluorescence detection gradient is greater than 0.99, and the coefficient of variance (CV) value of repeatability test does not exceed 1.27%. The inter-channel fluorescence crosstalk test shows that there is no

收稿日期: 2022-09-29; 修回日期: 2022-12-14

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (62003284); 厦门大学校长基金 (20720210089)

作者简介: 杨佳羽 (1998—), 女, 硕士研究生, 主要从事医疗检测机器人研究。E-mail: yangjiayu@stu.xmu.edu.cn

通信作者: 张东旭 (1986—), 男, 博士, 助理教授, 主要从事医疗检测机器人和医用人工智能研究。

E-mail: zhangdongxu@xmu.edu.cn

crosstalk between channels, and the accuracy and stability of cytomegalovirus culture medium amplification experiment are good, which indicates that the system can effectively stimulate and collect fluorescence for multiple detection.

Key words: on-site nucleic acid detection; polymerase chain reaction; fluorescence; real-time

引言

医学检验技术正逐步从细胞水平向分子水平发展,作为分子诊断领域最为重要技术之一的核酸检测(nucleic acid test, NAT)^[1],其特异性和灵敏度极高,窗口期短,具备多重检测能力且可以实现绝对定量,同时在疾病的后续治疗方案和预后评估方面可作为重要的数据支撑。然而核酸检测当前尚未完成全自动化的蜕变,在临床应用中面临着检测操作繁琐、检测成本高昂、人员要求严格、检测耗时长等挑战。面对新冠疫情肆虐,核酸检测技术壁垒严重阻碍了检测效率,对疫情防控带来很大挑战^[2-3]。为了满足即时即地、随到随检的检测要求,核酸现场快速检测应运而生。现场快速检测具有操作简单、报告快速、节约成本等优点,不但可以用于大型医院检测,在机场、海关、社区医院等也有广泛的应用潜力。

对于核酸扩增产物的检测一般使用实时荧光检测的方法,当前荧光检测系统的研究主要集中在光路搭建与多通道检测装置两个方面。光路搭建包括对光学元件的改进以及对光路结构的设计。许多研究通过对激发光源、透镜、导光元件等进行几何或材料的改进,以提高整体光路的性能与光学系统的检测效率^[4-7];光路结构的设计主要分为共聚焦式与非共聚焦式。MATHIES R A 等于 1992 年提出共聚焦式光路的概念^[8],ZHONG K K 等人在其搭建的核酸检测仪器中即采用这一光路结构^[9],具有良好的信噪比与灵敏度。谢欣茹等设计了激发光路与发射光路共用一个大孔径透镜的共聚焦型光路,实现多通道荧光的同时检测^[10]。但共聚焦式光路为了保证元器件间的共轭关系,通常体积较大,装配时元器件的校准难度大,不利于集成。非共聚焦式光路依据激发光路和荧光接收光路所呈角度的不同,可分为斜射式、透射式和正交式三种结构。SEILER K 等采用 45°斜射式光路^[11],李艳等设计了透射式光路^[12],但这两种光路信噪比较低,而正交式光路可以最大限度避免这一缺陷。YANG H 等设计正交光路,避免高度聚焦的强激发光干扰发射光的收集^[13]。对于多通道荧光检测装置,部分系统利用分光光路进行通道切换。

美国 Cepheid 公司研发的 GeneXpert 核酸现场检测仪器的光学系统使用二向色镜进行激发光与发射光的筛选,实现了四通道荧光检测^[14]。CHENG Z 等通过多个不同二向色镜对发射荧光信号进行分离,实现不同波长的荧光信号收集^[15]。赵子龙等根据光的折射原理设计了结构紧凑的共聚焦式双通道荧光检测系统,无需进行机械切换^[16]。由于使用分光器件,此类光路光损较大,拓展性较差。而另一部分则借助机械结构设计实现通道切换,美国 Biofire 公司设计的光学系统通过多色光源配合装有不同波段滤光片的转盘,实现多通道检测,其检测通道数受限于光源的滤光器频数^[17]。张东旭团队研发的实时荧光检测系统满足了快速、多重检测的需求,但光学元件数量多,直轴式的切换方式效率低,通道切换定位重复性难以保障^[18]。目前,大多数荧光检测系统并不完美,部分检测系统的通道切换方式限制了系统向更多通道检测的拓展^[5,19];部分系统为了实现高精度,不得不增大体积^[10,20-21],或为了追求高通量而牺牲全自动的性能^[22-23],难以完全满足核酸现场快速检测仪器的要求。

为了克服现有荧光检测系统的不足,本文设计了一种基于旋转切换的多通道荧光检测系统,采用全光谱 LED 光源,通过定制光纤将光源与旋转集成结构相连接。旋转结构提高了电机转动效率,设计激发光路与发射光路的径向交错分布与嵌合式的模块支架,大大降低了通道间干扰问题,并提高所采集荧光信号的信噪比。

1 光路搭建

面向现场检测的光路搭建除了满足常规核酸检测要求外,还将面临个性化、多变的检测环境,导致系统的信噪比大幅降低,给系统设计带来了较大挑战。为了满足小型便捷、结构简单、环境适应性强等需求,通常留给荧光检测系统的空间非常狭小,而检测试剂的承载器皿形状各异,与激发光源的距离非标准化,因此本文设计了非共聚焦式的正交光路结构,搭配光纤进行光的传导和收集。

为了提高系统的集成性与可拓展性, 该系统使用型号为 TH-C14141050JH-53 的全光谱 LED 光源, 涵盖当前荧光检测普遍使用的窄带光波段, 搭配相应滤光片进行通道拓展。由于仪器采用双面加热的温控方式, 从芯片侧面进行激发与采集荧光。该系统采用正交式光路, 减少激发光对发射光的干扰, 如图 1 所示。根据芯片扩增腔侧边仅 1 mm×9 mm 大小的线型光通路, 搭配特定的光纤进行光路传导, 提高了光信号的传导效率与信噪比, 也增强了光学系统的可拓展性与通用性, 适用于更多不同材质与形状的检测试剂载体。

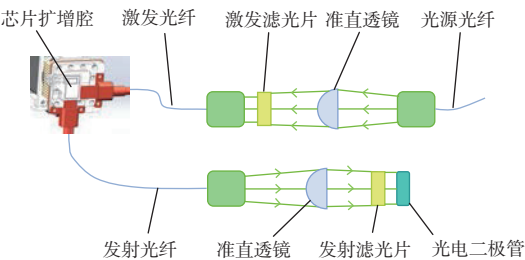


图 1 激发光路与发射光路
Fig. 1 Excitation optical path and emission optical path

激发光路与发射光路均为封闭式光通路。光源由光源光纤传递至激发光路, 激发光路内置平凸透镜与窄带滤光片, 光源通过激发光路后产生带宽 10 nm~30 nm 的窄带激发光, 经由激发光纤传递至芯片端, 对荧光染料或探针进行激发产生发射荧光。接着, 发射光纤接收其数值孔径 65° 内的发射荧光, 传递至发射光路中。发射光路中设置有平凸透镜与相应窄带滤光片, 对发射荧光进行准直与滤波, 收集目标荧光, 传递至光电二极管 (PD) 上进行信号转换。

由于 LED 光源发散角较大, 且光纤传输对准直性造成一定影响。荧光染料与探针发光为朗伯分布, 发射荧光经发射光纤传导至发射光路中的光具有较大发散角, 入射光的发散角越大, 滤光片的透射通带蓝移越明显, 峰值透射率也将随之下降^[24]。为了保证各个光路中具有最大光通量的平行光, 本文搭建了如图 2 所示的半发散角 (θ) 测试装置, 使用 CCD 相机对所得光斑进行等距离拍摄。半发散角的计算公式如下:

$$\theta = \frac{d\Delta r}{d\Delta d} \tag{1}$$

式中: Δr 表示光斑半径差; Δd 表示拍摄距离差。

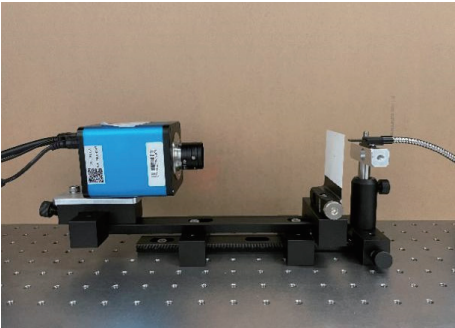


图 2 半发散角测试装置
Fig. 2 Semi-divergence angle test device

由半发散角公式计算可得激发光路前端、芯片激发端以及发射光路前端的半发散角, 如表 1 所示, 分别为 19.03°、13.50°、18.78°。

表 1 光路各端测量的半发散角
Table 1 Semi-divergence angle measured at each end of optical path (°)

位置	激发光路前端	芯片激发端	发射光路前端
发散角	19.03	13.50	18.78

发射荧光极其微弱, 因此发射光路应最大限度收集目标荧光, 一方面提高滤波后有用信号的信噪比, 便于信号采集后的处理工作, 另一方面拓宽系统的检测范围。发射荧光经发射光纤依然可认为是朗伯面光源, 发射光路中光通量为

$$\Phi = \frac{dQ}{dt} = \pi \cdot L \cdot dA \cdot \sin^2 \Omega \tag{2}$$

式中: L 表示光纤亮度; dA 表示光纤出射端面上的微小面积; Ω 表示 dA 发光的立体角大小。

光路中的照度为

$$E = \frac{d\Phi}{dA} = \pi \cdot L \cdot \sin^2 \Omega \tag{3}$$

为了获得最大强度的平行光束, 经计算后得到各光学元件间的距离, 如表 2 所示。

表 2 发射光路各元件间的距离
Table 2 Distance between elements of emission optical path mm

距离	发射光纤-透镜	透镜-发射滤光片	发射滤光片-PD
优化前距离	11.8	3.7	3.1
优化后距离	8.8	5.8	2.5

使用仿真软件 LightTools 对光路中透镜与滤光片间的距离进行验证与优化, 如图 3 所示。在发射光路中距离发射光路前端 8.8 mm 处使用焦距 $f=10$ mm、直径 $\varphi=8$ mm 的平凸透镜, 平凸透镜后

端 5.8 mm 处放置滤光片,可将最多平行与极小发散角的荧光传递至发射滤光片进行滤波,最后目

标荧光由光电二极管转换为电信号。光路优化后,准直性与有效荧光利用率得到提高。

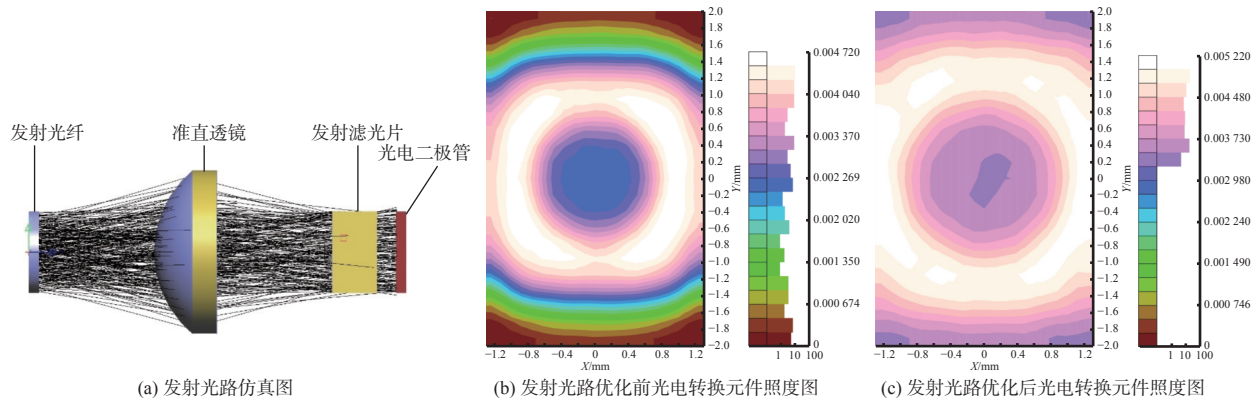


图3 发射光路仿真及照度对比图

Fig. 3 Comparison diagram of emission optical path simulation and illumination

2 多通道旋转集成结构设计及实现

在核酸检测中,根据分型检测、鉴别检测等需求,通常使用多靶标进行检测,来提高检测的灵敏度,而多通道的检测将带来一系列挑战。现场检测往往对检测效率要求较高,通常在温控模块快速升降温的极短间隙进行荧光采集,每个循环的采集时间仅有数秒,同时为了兼顾多通道检测,每个通道的切换与激发、采集时间将根据通道数进行分配,对通道切换结构的切换速率与定位准确性提出了较高的要求。要实现结构小型化与多重检测,通道间距离的缩小是不可避免的,因此通道间荧光串扰成为结构设计的一大难题。

本文设计了多通道旋转集成结构,如图4所示,由固定模块、旋转模块和驱动模块组成。固定模块支撑多通道旋转集成装置,同时用于集成至核酸现场快速检测仪器内部;旋转模块的内、外周分别承载发射光路与激发光路,以避免激发光干扰和荧光串扰;在固定模块的支撑下,旋转模块可做旋转运动用于通道切换。驱动模块则通过步进电机和传动零部件,用于驱动旋转模块旋转。为了配合小体积、窄光路的测试场景,采用定制光纤将激发光传导至生物样本处,并将发射荧光传导至光电检测元件。

要实现多通道快速检测,除了对升降温模块具有较高要求外,每个循环的采集速率也至关重要。旋转模块实现了步进电机在最小工作量下驱动旋转模块大角度旋转,在快速旋转过程中可保持较高同轴度,减小模块的转动惯量,以延长系统

的使用寿命。

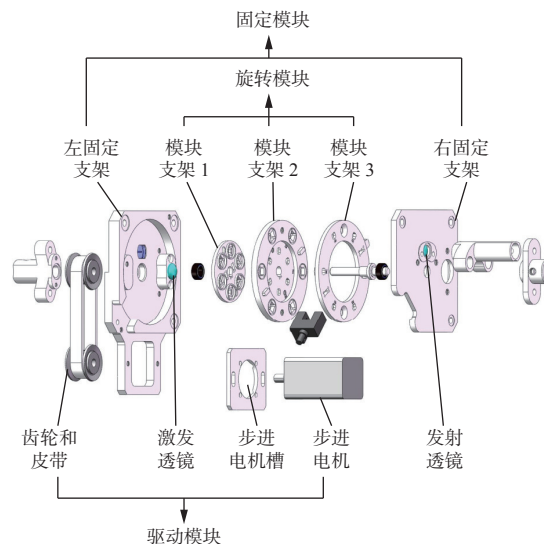


图4 多通道旋转集成结构

Fig. 4 Multi-channel rotation integrated module

核酸检测的分析中,结果的准确性极易受到荧光信号异常的干扰,例如反应中气泡的产生或其他噪声等引起的荧光信号突变。而其中通道间的荧光串扰,是循环阈值定量计算准确性的重要影响因素之一。因此,本文的多通道旋转集成结构通过合理排布通道位置、设计相应嵌合结构来降低荧光串扰。首先,光路布置为径向错开 30° 的内外 2 周,外周为激发光路,内周为发射光路,内、外周分别等间距设置 6 条通道,该空间分配在体积小型化的同时增大通道间的距离;其次,在通道与通道之间、激发光路与发射光路之间设计嵌合结构,

内外周利用前后阶梯相互错开, 切断通道内外的光信号传播。如图 5 所示, 根据光的直线传播特点, 在模块支架 1 的右侧发射光路、模块支架 3 的左侧激发光路外周设计凸起, 在模块支架 2 的左侧发射光路与右侧激发光路外周设计与凸起相适配的凹槽, 装配时凸起与凹槽相互嵌合, 固定光路的同时隔绝环境光与激发光。

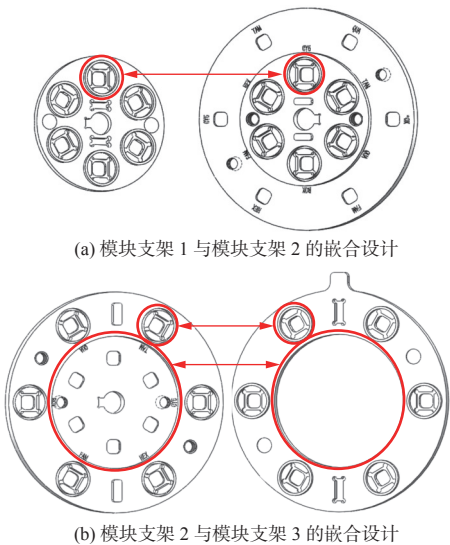


图 5 模块支架之间的嵌合结构设计

Fig. 5 Embedded structure between module brackets

各通道可根据波段需求, 配置不同窄带滤光片。为了减少光学元件的使用, 激发光路与发射光路的通道分别共用平凸透镜, 固定于左、右固定支架, 扩增过程中通过切换模块支架进行不同信号的采集。

3 实验与结果分析

荧光检测系统实物图如图 6 所示, 集成于仪器内部后对该系统的荧光采集性能进行验证。将整个光路组装好并将 PD 后端连接至皮安表进行电信号采集, 更直观地反映荧光值大小。根据《中华人民共和国医药行业标准》——聚合酶链反应分析仪^[25](下文称为“国家行业标准”), 配合本团队自行研发的微流控芯片^[26], 选择常用的 4 个通道对系统整体的检测性能进行分析。首先, 对各通道的检测下限以及荧光梯度进行测试, 探索系统的检测灵敏度, 及其在检测范围内对不同浓度是否具备检测准确性; 其次, 对不同浓度的荧光染料进行重复性测试, 确保系统的稳定性; 接着, 使用荧光染料对每个通道进行荧光采集, 测试通道之间是否存在荧光串扰; 最后, 使用巨细胞病毒(cytomega-

lovirus, CMV, DNA 类病毒) 的病毒培养液进行扩增检测实验, 以评估系统性能。

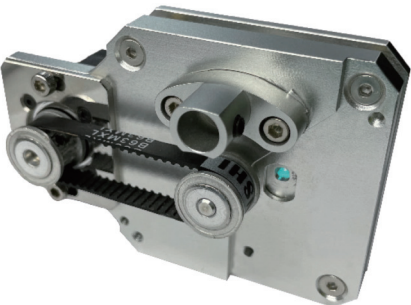


图 6 荧光检测系统实物图

Fig. 6 Physical image of proposed fluorescence detection system

使用有机溶剂二甲基亚砜 DMSO 溶解 FAM、HEX、ROX 及 CY5 荧光染料, 将 ROX、FAM、HEX、CY5 等 4 种荧光染料分别以 2 倍梯度稀释为 5 个梯度浓度, 稀释液为 DEPC(diethyl pyrocarbonate) 水, 稀释浓度如表 3 所示。

表 3 荧光染料稀释浓度

Table 3 Dilution concentration of fluorescent dyes $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$				
荧光染料	FAM	HEX	ROX	CY5
母液(50%DMSO)	2 000	13	200	18
梯度1(DEPC水)	200	1.3	20	1.8
梯度2(DEPC水)	100	0.65	10	0.9
梯度3(DEPC水)	50	0.325	5	0.45
梯度4(DEPC水)	25	0.162 5	2.5	0.225
梯度5(DEPC水)	12.5	0.081 25	1.25	0.112 5

3.1 荧光强度的检测下限与梯度性测试

在进行其他测试前, 首先对系统的检测下限进行摸索, 将 4 种荧光染料以 2 倍梯度稀释为 10 个梯度, 稀释液为 DEPC 水, 并对所有梯度荧光染料及 DEPC 水进行荧光测试, 寻找各通道所测试的荧光值高于 DEPC 水且线性拟合的 R^2 值高于 0.9 的荧光染料浓度。结果如表 4 所示, 各通道能够达到 1.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下的检测下限, 且线性拟合的 R^2 值高于 0.94。

表 4 荧光染料检测下限测试结果

Table 4 Detection limit test results of fluorescent dyes				
检测通道	ROX	FAM	HEX	CY5
检测下限/ $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	0.31	1.56	0.02	0.11
线性度 R^2 值	0.996 1	0.947 2	0.996 8	0.993 5

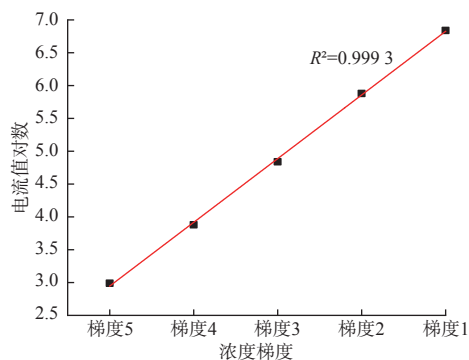
选择各通道检测范围内的 5 个中等浓度分别

使用皮安表进行 5 组荧光采集测试,记录数据后计算 5 组电流值的平均值作为该通道该浓度的电流值。求取对数,拟合线性函数并计算拟合优度 R^2 值。结果如表 5 和图 7 所示,该荧光检测系统测得的电流值对数拟合优度 R^2 值均大于 0.99,说明该系统在检测范围内能够对各浓度的荧光强度进行准确激发与采集。

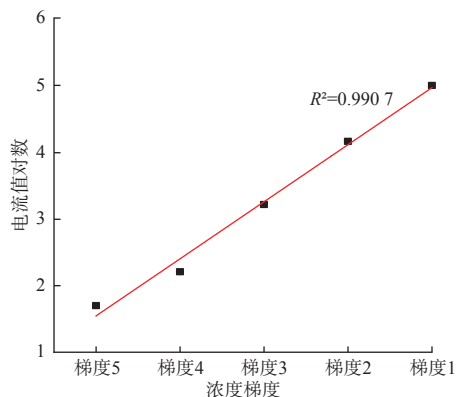
表 5 荧光染料梯度性检测结果

Table 5 Gradient test results of fluorescent dyes

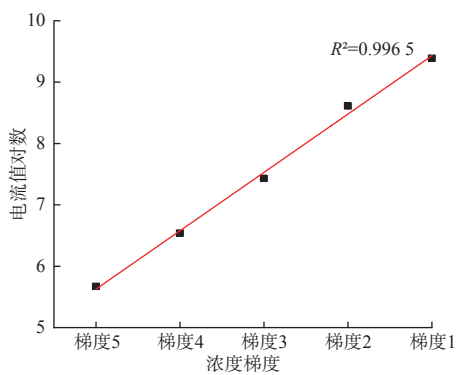
检测通道	电流值对数					线性度 R^2 值
	梯度5	梯度4	梯度3	梯度2	梯度1	
ROX	2.99	3.88	4.84	5.88	6.84	0.999 3
FAM	1.70	2.21	3.22	4.17	5.01	0.990 7
HEX	5.67	6.54	7.43	8.61	9.39	0.996 5
CY5	4.61	5.27	6.10	6.87	7.39	0.994 8



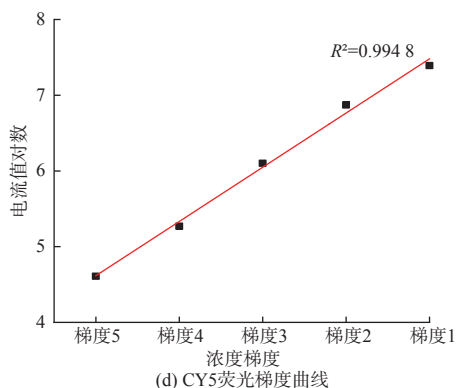
(a) ROX 荧光梯度曲线



(b) FAM 荧光梯度曲线



(c) HEX 荧光梯度曲线



(d) CY5 荧光梯度曲线

图 7 各通道荧光染料梯度测试结果

Fig. 7 Test results of fluorescence dye gradient for each channel

3.2 荧光强度的重复性测试

将各通道对应的梯度 1、梯度 3、梯度 5 分别进行 10 次荧光采集测试,记录皮安表的电流值后计算各通道的 CV 值。结果如表 6 所示,对于不同通道的各梯度浓度荧光染料所检测的 CV 值,均不超过 1.27%,符合国家行业标准,表明系统的检测稳定性较好。

表 6 荧光强度重复性测试结果

Table 6 Repeatability test results of fluorescence intensity

检测通道	CV 值		
	梯度 5/%	梯度 3/%	梯度 1/%
ROX	1.27	0.19	0.16
FAM	1.20	0.89	0.59
HEX	1.01	0.27	0.06
CY5	1.24	0.20	0.29

3.3 通道间荧光干扰测试

选择 HEX、CY5 这 2 个荧光染料,分别使用梯度 1、梯度 3、梯度 5,并利用皮安表对每个通道进行 2 种荧光染料和 DEPC 水的测试,采集 PD 后的电流值后对比荧光染料与稀释液的电流值。结果如表 7 和表 8 所示,各通道检测非目标荧光染料的电流值均与稀释液相近,而目标荧光染料的电流值呈梯度分布,如图 8 所示。因此该荧光检测系统无通道间荧光干扰,为所得荧光信号的高信噪比与数据采集的有效性提供了保障。

表 7 基于 HEX 荧光染料的荧光串扰测试结果

Table 7 Fluorescence crosstalk test results based on

HEX fluorescent dyes

pA

检测通道	电流值			
	高浓度	中浓度	低浓度	DEPC 水
ROX	1.90	1.11	2.15	1.28
FAM	0.29	0.54	1.23	0.22
HEX	217.71	65.63	20.52	4.18
CY5	0.80	0.42	0.67	1.19

表 8 基于 CY5 荧光染料的荧光串扰测试结果
Table 8 Fluorescence crosstalk test results based on

CY5 fluorescent dyes				pA
检测通道	电流值			DEPC水
	高浓度	中浓度	低浓度	
ROX	0.22	0.37	0.67	1.15
FAM	0.28	0.14	0.19	0.02
HEX	2.03	0.19	1.78	1.37
CY5	120.63	38.54	14.15	0.94

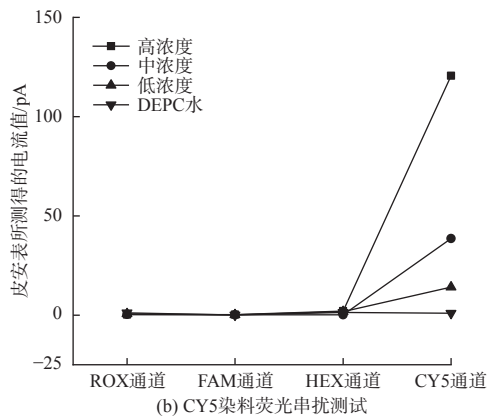
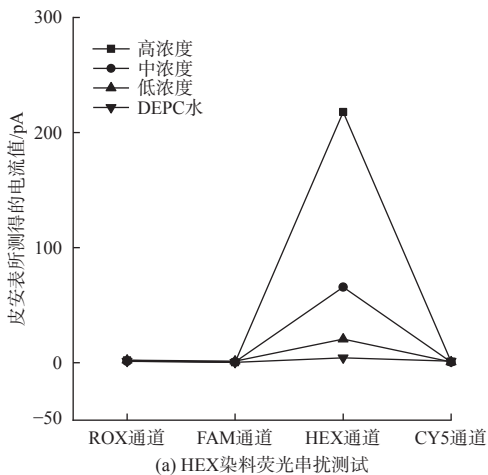


图 8 通道间荧光串扰测试结果

Fig. 8 Test results of fluorescence crosstalk between channels

3.4 样本扩增检测测试

对荧光检测系统进行测试后,将系统集成至核酸现场快速检测仪器中,配合本团队自行研发的快速扩增模块,进行样本扩增检测测试。使用商用试剂对 10 倍梯度稀释的高、中、低浓度巨细胞(CMV)病毒培养液的手提核酸样本分别进行扩增实验,结果如图 9 所示。该系统能够完整地采集扩增数据,在各浓度样本的 3 次重复性实验中,曲线拐点的位置重叠性好,证明系统的稳定性与一致性较强。高、中、低浓度之间的拐点位置相差约 3.3 个

循环,表明该系统的梯度性与准确性较好。

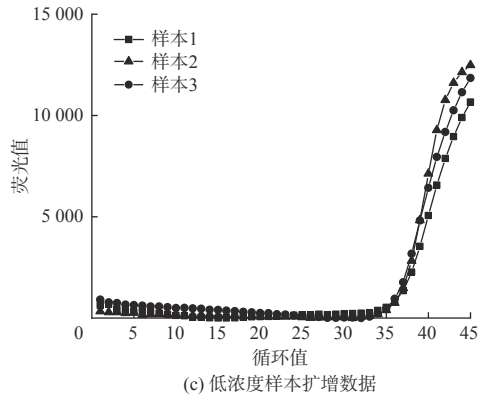
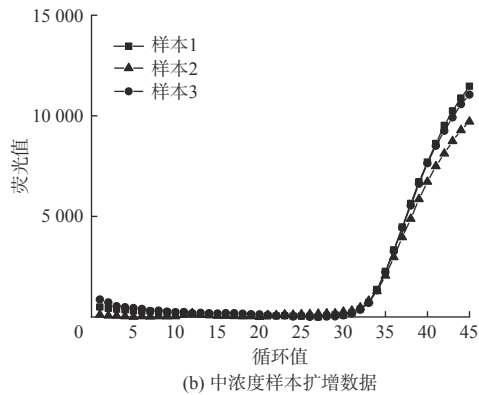
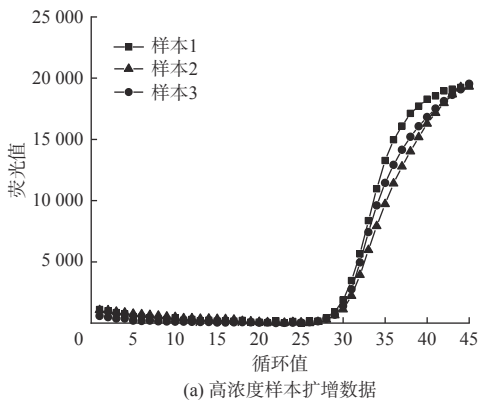


图 9 样本扩增检测测试结果

Fig. 9 Test results of sample amplification detection

4 结论

本文面向核酸现场快速检测的需求,设计了基于非共聚焦式的正交光路与基于旋转切换方式的多通道旋转集成结构。相较于当前商用化的检测仪器,具有较高的检测效率、准确性、可拓展性以及较低检测下限。搭建系统后,对其进行工程实验与核酸扩增实验,以验证系统性能。实验证明,该系统可实现检测速率快、稳定性强、准确率高多重检测。在荧光染料测试中,梯度性测试的

R^2 值均大于 0.99, 稳定性测试的 CV 值不超过 1.27%, 均符合国家行业标准, 检测下限低于 $1.6 \mu\text{g/mL}$, 通道间无串扰现象; 在 CMV 样本扩增实验中, 荧光数据的梯度性与重复性较好。整体测试结果体现了该系统优良的检测性能与应用价值。

参考文献:

- [1] 孟德豪, 张艳芬, 孙玉森, 等. 核酸检测技术进展及其在 SARS-CoV-2 核酸检测中的应用[J]. 生物化学与生物物理进展, 2021, 48(11): 1290-1300.
MENG Dehao, ZHANG Yanfen, SUN Yumiao, et al. Progress in nucleic acid detection technology and its application in SARS-CoV-2 nucleic acid detection[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2021, 48(11): 1290-1300.
- [2] YE Q, LU D Z, ZHANG T, et al. Recent advances and clinical application in point-of-care testing of SARS-CoV-2[J]. Journal of Medical Virology, 2022, 94(5): 1866-1875.
- [3] 翁振宇. 基于微流控的核酸现场检测系统关键技术研究[D]. 厦门: 厦门大学, 2020.
WENG Zhenyu. Research on key technologies of nucleic acid field detection system based on microfluidic[D]. Xiamen: Xiamen University, 2020.
- [4] 吴晓松, 李志刚, 朱灿灿, 等. 微流控聚合物链式反应芯片的多色荧光检测[J]. 光电子·激光, 2017, 28(8): 859-864.
WU Xiaosong, LI Zhigang, ZHU Cancan, et al. Multicolor fluorescence detection of microfluidic polymer chain reaction chips[J]. Journal of Optoelectronics · Laser, 2017, 28(8): 859-864.
- [5] 毛贺. 定量聚合酶链式反应荧光检测技术研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2016.
MAO He. Study on quantitative polymerase chain reaction fluorescence detection technology[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2016.
- [6] 李润芝, 杨波, 郭彩虹, 等. 应用于微型 PCR 荧光检测仪的光学系统设计[J]. 电子科技, 2017, 30(11): 34-37.
LI Runzhi, YANG Bo, GUO Caihong, et al. Optical system design of miniature PCR fluorescence detector[J]. Electronic Science and Technology, 2017, 30(11): 34-37.
- [7] MA Y T, ZENG L, ZHANG J H. A fluorescence detection optical system for real-time quantitative PCR[C]//Proceedings of SPIE/COS Photonics Asia. [S.l.]: SPIE, 2020, 11548: 409-417.
- [8] HUANG X C, QUESADA M A, MATHIES R A. DNA sequencing using capillary array electrophoresis[J]. Analytical Chemistry, 1992, 64(18): 2149-2154.
- [9] ZHONG K K, CHEN Z W, HUANG J, et al. A LED-induced confocal fluorescence detection system for quantitative PCR instruments[C]//2011 4th International Conference on Biomedical Engineering and Informatics (BMEI). Shanghai: IEEE, 2011: 1014-1018.
- [10] 谢欣茹, 杨波, 潘帅, 等. 多通道 PCR 荧光检测仪的光学系统设计[J]. 光学技术, 2019, 45(5): 531-534.
XIE Xinru, YANG Bo, PAN Shuai, et al. Optical system design of multichannel PCR fluorescence detector[J]. Optical Technique, 2019, 45(5): 531-534.
- [11] SEILER K, HARRISON D J, MANZ A. Planar glass chips for capillary electrophoresis: repetitive sample injection, quantitation, and separation efficiency[J]. Analytical Chemistry, 1993, 65(10): 1481-1488.
- [12] 李艳, 岑兆丰, 李晓彤. 集成毛细管电泳芯片荧光检测的研究[J]. 光学仪器, 2003, 25(1): 8-13.
LI Yan, CEN Zhaofeng, LI Xiaotong. The research of the laser induced fluorescence detection on the integrated capillary electrophoresis chip[J]. Optical Instruments, 2003, 25(1): 8-13.
- [13] YANG H, GIJS M A M. Micro-optics for microfluidic analytical applications[J]. Chemical Society Reviews, 2018, 47(4): 1391-1458.
- [14] CHRISTEL L A, PETERSEN K E, et al. Multi-channel optical detection system: USA, US6940598[P]. 2005-09-06.
- [15] CHENG Z, WU X D, CHENG J, et al. Microfluidic fluorescence-activated cell sorting (μ FACS) chip with integrated piezoelectric actuators for low-cost mammalian cell enrichment[J]. Microfluidics and Nanofluidics, 2017, 21(1): 9.
- [16] 赵子龙. 核酸检测一体化设备检测系统关键技术研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2022.
ZHAO Zilong. Research on key technologies of detection system of nucleic acid detection integrated equipment[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2022.
- [17] R·D·阿伯特, P·L·赖利, Z·K·埃文斯, 等. 用于基本同时地监测样品阵列中的样品的紧凑光学系统: CN105359028B[P]. 2019-06-25.
ABBOTT R D, RILEY P L, EVANS Z K, et al. A compact optical system for basically simultaneous detection of

- samples in a sample array: CN105359028B[P]. 2016-02-24.
- [18] 戴皓正. 面向核酸现场检测仪器的荧光检测系统研制[D]. 厦门: 厦门大学, 2021.
- DAI Haozheng. Development of fluorescence detection system for nucleic acid field detection instrument[D]. Xiamen: Xiamen University, 2021.
- [19] ZHANG M T, PENG Y M, PAN J Z, et al. LIFGO: a modular laser-induced fluorescence detection system based on plug-in blocks[J]. *Talanta*, 2022, 239: 123063.
- [20] 程琦, 孔明, 周洋. 实时荧光定量PCR仪中荧光检测装置的设计[J]. 传感器与微系统, 2011, 30(3): 111-113.
- CHENG Qi, KONG Ming, ZHOU Yang. Design of fluorescence detection device in real-time quantitative PCR instrument[J]. *Transducer and Microsystem Technologies*, 2011, 30(3): 111-113.
- [21] CHOI Y J, TAKAHASHI K, MISAWA N, et al. Multi-wavelength fluorescence detection of submicromolar concentrations using a filter-free fluorescence sensor[J]. *Sensors and Actuators B:Chemical*, 2018, 256: 38-47.
- [22] 臧留琴, 张镇西, 苗宝刚, 等. 多重定量PCR系统中多色荧光检测和光谱串扰校正方法[J]. 光学学报, 2014, 34(1): 187-193.
- ZANG Liuqin, ZHANG Zhenxi, MIAO Baogang, et al. Multicolor fluorescence detection in the multiplex quantitative PCR system and spectra crosstalk correction method[J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(1): 187-193.
- [23] KOO S B N, CHI H G, KIM J D, et al. Multiple compact camera fluorescence detector for real-time PCR devices[J]. *Sensors*, 2021, 21(21): 7013.
- [24] 何文彦, 孔明东, 任戈, 等. 非平行光束对窄带滤光片光谱性能的影响[J/OL]. 红外与激光工程: 2022, 51(8): 425-431[2022-09-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1261.TN.20211228.1358.014.html>.
- HE Wenyan, KONG Mingdong, REN Ge, et al. Effect of non-parallel beam on spectral performance of narrow band filter[J/OL]. *Infrared and Laser Engineering*, 2022, 51(8): 425-431[2022-09-22]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/12.1261.TN.20211228.1358.014.html>
- [25] 国家食品药品监督管理局. 聚合酶链反应分析仪: YY/T 1173—2010[S]. 北京: 中国标准出版社, 2012.
- State Food and Drug Administration of the People's Republic of China. Polymerase chain reaction analyzer: YY/T 1173—2010[S]. Beijing: Standards Press of China, 2012.
- [26] 张师音. 微流控检测芯片: CN111111798A[P]. 2020-05-08.
- ZHANG Shiyin. Microfluidic detection chip: CN111111798A[P]. 2020-05-08.