

高通量微流控荧光定量 PCR 激发光非均匀性研究

王华东¹, 赵树弥¹, 朱 灵^{1,2},
李志刚¹, 王 安¹, 刘 勇^{1,2}

(1 中国科学院合肥物质科学研究院应用技术研究, 安徽省生物医学光学仪器工程技术研究中心,
安徽 合肥 230031;

2 皖江新兴产业技术发展中心, 安徽 铜陵 244000)

摘 要: 研究高通量微流控荧光定量聚合酶链反应 (PCR) 激发光非均匀性问题对提高 DNA 浓度定量结果的精度具有重要意义。根据荧光定量 PCR 的原理, 分析了激发光非均匀性对循环阈值 (C_t) 测量精度的影响, 给出了激发光非均匀性引起 C_t 值测量偏差的表达式, 确定了激发光强度标准偏差应小于 11.56% 的要求。根据微流控芯片结构特点及激发光均匀性要求, 设计了基于光棒的匀光光路用于解决激发光照度非均匀性问题。模拟及实验所得到的激发光照度的相对标准偏差分别为 3.10%、6.01%, 二者均小于 11.56%。所设计匀光光路能够满足高通量微流控荧光定量 PCR 的要求。

关键词: 医用光学与生物技术; 均匀照明; 光学设计; 微流控芯片; 荧光定量 PCR

中图分类号: O439

文献标识码: A

文章编号: 1007-5461(2015)05-0613-07

Non-uniform illumination of high-throughput microfluidic qPCR

WANG Huadong¹, ZHAO Shumi¹, ZHU Ling^{1,2},
LI Zhigang¹, WANG An¹, LIU Yong^{1,2}

(1 Anhui Provincial Engineering Technology Research Center for Biomedical Optical Instrument,
Institute of Applied Technology, Hefei Institutes of Physical Science,
Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China;

2 Wanjia Center for Development of Emerging Industrial Technology,
Tongling 244000, China)

Abstract: The non-uniform illumination of high-throughput microfluidic qPCR is significant for improving the precision of DNA quantitative results. According to the theoretical principle of qPCR, theoretical analysis was presented. The analysis focused on the deviation of cycle threshold (C_t) resulting from non-uniform illumination. On the basis, the deviation formula of C_t caused by non-uniform illumination was proposed. Moreover, the requirement of excitation light was determined, and the relative standard deviation of excitation should be less than 11.56%. Then, according to the characteristics of microfluidic chip and the requirement of the excitation light uniformity, an illumination system based on light pipe was designed. The relative standard deviations of irradiance, obtained from simulation and experiment, were respectively 3.10% and 6.01%, both less than 11.56%. And the uniform illumination system is able to meet the requirement of high-throughput microfluidic qPCR.

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项基金资助项目 (XDA08040109)

作者简介: 王华东 (1990 -), 安徽人, 研究生, 从事生物医学光学研究。E-mail: whdm818@163.com

导师简介: 王 安 (1958 -), 安徽人, 研究员, 从事光谱学与光谱分析和生物医学光子学方面的研究。

E-mail: wangan@aiofm.ac.cn

收稿日期: 2014-10-30; **修改日期:** 2014-12-10

Key words: medical optics and biotechnology; uniform illumination; optical design; microfluidic chip; qPCR

1 引言

微流控荧光定量聚合酶链反应 (Microfluidic quantitative polymerase chain reaction, PCR) 具有分析速度快、能耗低、污染小等特点, 在分子生物学研究及医疗诊断领域应用广泛^[1~3]。荧光定量 PCR 依据 DNA 扩增过程中荧光信号达到指定荧光阈值所经历的循环次数 (C_t 值) 进行定量。高通量荧光定量 PCR, 以其多腔并行的特点有效提高了检测效率, 荧光成像方法是高通量荧光定量 PCR 荧光信号提取的主要方法之一^[4,5]。但激发光不均匀导致相同浓度 DNA 溶液在不同反应腔测量所得 C_t 值存在差异, 不能达到同时进行多次重复测量提高测量准确性的目的。

针对激发光非均匀性导致的相同浓度 DNA 在不同反应腔所得 C_t 值差异的问题, 常规的解决方法是通过在反应试剂中加入参比染料, 增加光学检测通道以及校正光谱串扰等复杂的过程来降低差异^[6], 这种方法增加了硬件结构和数据处理的复杂程度, 且需要特定的参比染料。通过非成像光学设计的方法能够直接产生均匀光场, 降低光照非均匀性, 无需参比即可解决激发光非均匀导致的测量精度降低问题。Ding^[7]等通过设计非球面透镜用于提高照度均匀性; Su^[8]等通过设定评价函数优化 LED 阵列结构实现均匀照明。二者均提出了用于均匀照明设计的方法, 但从应用角度来说其制作加工难度较大。光棒及复眼等匀光器件被广泛应用于光刻机及投影仪照明光路中^[9]。相对而言, 基于光棒的匀光方法前期投入成本较低, 设计制作简单, 且能够有效提高激发光照度均匀性。

本文拟将根据荧光定量 PCR 原理, 分析激发光非均匀性对 C_t 值测量精度的影响, 明确相应测量精度要求下激发光均匀性应满足的条件。根据微流控 PCR 芯片的结构特点及相应的激发光均匀性要求, 设计相应的匀光光路, 并进行相关的仿真及实验, 分析目标面激发光均匀性情况。

2 激发光非均匀问题理论分析

2.1 荧光定量 PCR 原理

荧光定量 PCR 反应利用荧光信号的累积实时监测 PCR 扩增反应过程。其扩增过程包括基线期, 指数增长期, 线性增长期和平台期。指数增长期 DNA 浓度变化的数学描述^[10]为

$$I_n = X_0(1 + E)^n, \quad (1)$$

其中, X_0 表示初始的 DNA 浓度, E 表示扩增效率, X_n 表示第 n 次循环后的 DNA 浓度。对应的荧光信号强度变化为

$$I_n = I_0 X_0(1 + E)^n, \quad (2)$$

其中, I_n 表示 n 次循环后荧光信号强度, I_0 表示摩尔浓度荧光物质对应的荧光信号强度。

C_t 值是荧光强度达到指定荧光阈值所经历的循环次数, 即

$$I_0 X_0(1 + E)^{C_t} = I_{C_t}, \quad (3)$$

$$C_t = \frac{-\lg X_0}{\lg(1 + E)} + \frac{\lg I_{C_t}}{\lg(1 + E)} + \frac{-\lg I_0}{\lg(1 + E)}, \quad (4)$$

其中, I_{C_t} 为根据实际实验划定的荧光阈值。(4) 式可写成

$$C_t = a \lg X_0 + b, \quad (5)$$

其中 $a = \frac{-1}{\lg(1 + E)}$, $b = \frac{\lg I_{C_t}}{\lg(1 + E)} + \frac{-\lg I_0}{\lg(1 + E)}$ 。根据 C_t 值与 DNA 初始浓度的函数关系, 通过定标曲线确定 DNA 初始浓度, 实现荧光定量 PCR 的测量。

2.2 激发光非均匀性与测量精度

激发光非均匀性对荧光信号的影响主要表现为相同浓度荧光试剂在不同反应腔所得到的荧光信号强度不相同, 这直接导致相同初始浓度 DNA 溶液经荧光定量 PCR 实验所得到的 Ct 值存在差异, 影响 DNA 浓度的定量精度。

根据朗伯比尔定律及荧光产生机理, 荧光强度与浓度的关系为

$$I_f = 2.303QI_{ex}\epsilon cl, \tag{6}$$

$$I_f = AI_{ex}c \quad (A = 2.303Q\epsilon l), \tag{7}$$

其中, I_f 为荧光强度, Q 为量子产率, I_{ex} 为激发光强度, ϵ 为摩尔吸收强度, l 为作用距离, c 为荧光物质浓度。 A 为摩尔浓度溶液的荧光强度与激发光强度的比例系数。

令 $I_0 = I_f$, (7) 式代入 (3) 式, 即计入激发光强度信息, 则有

$$AI_{ex}X_0(1 + E)^{Ct} = I_{Ct}, \tag{8}$$

$$Ct = \frac{-\lg X_0}{\lg(1 + E)} + \frac{\lg I_{Ct}}{\lg(1 + E)} + \frac{-\lg A}{\lg(1 + E)} + \frac{-\lg I_{ex}}{\lg(1 + E)}, \tag{9}$$

对比 (4) 式, 对于高通量荧光定量 PCR, 在多腔并行的检测方法中, 相同初始浓度 DNA 溶液, 若激发光强度不同将导致在相同阈值条件下得到的 Ct 值测量结果存在差异。 (9) 式两边对激发光强度 I_{ex} 求偏微分, 即可得到激发光强度非均匀对 Ct 值测量结果的影响, 其表达式为

$$\frac{\partial Ct}{\partial I_{ex}} = \frac{-1}{\lg(1 + E)} \frac{1}{\ln 10} \frac{1}{I_{ex}}, \tag{10}$$

即

$$\Delta Ct = \frac{-1}{\lg(1 + E)} \frac{1}{\ln 10} \frac{\Delta I_{ex}}{I_{ex}}, \tag{11}$$

其中 $\frac{\Delta I_{ex}}{I_{ex}}$ 描述了不同区域激发光强度的波动, 反映了激发光强度的非均匀性。 (11) 式反映了激发光不均匀对微流控 PCR 所得 Ct 值的影响, 即相同浓度 DNA 溶液, 相同扩增效率, 在不同反应腔同时反应时, 由激发光不均匀导致的测量结果精度降低。

设 $E = 1$ (扩增效率为 100%), 分析由激发光差异引起的 Ct 值偏差可用 (12) 式计算得到。 分别计算不同光照均匀性引起的偏差计入 Table 1。 如 Table 1 所示, 激发光越不均匀, Ct 值测量结果偏差越大。

$$\Delta Ct = \frac{-1}{\lg 2 \ln 10} \frac{\Delta I_{ex}}{I_{ex}}. \tag{12}$$

Table 1 The deviation of Ct resulted from non-uniform illumination

$ \Delta I_{ex}/I_{ex} $	10%	20%	30%	40%	50%
$ \Delta Ct $	0.14	0.29	0.43	0.58	0.72

通常情况下, 实验要求实时荧光定量 PCR 检测系统至少能够区分 DNA 样本溶液及其两倍稀释溶液。 以浓度为 $2X_0$ 的 DNA 样本溶液及其两倍稀释液 (浓度为 X_0) 为例, 扩增效率为 100% 时, 根据 (5) 式可知其 Ct 值相差为 1。 研究表明^[11~13], Ct 的测量值满足正态分布, 若满足 99.6% 置信水平可区分初始浓度相差两倍的 DNA 溶液, 则 Ct 值标准偏差应满足 $\Delta Ct < 1/6$ 。 这就要求由激发光非均匀引起的 Ct 值标准偏差必须小于 1/6, 对应激发光强度的相对标准偏差需小于 11.56%。

3 基于光棒的匀光光路设计

针对微流控 PCR 的芯片结构尺寸特点, 确定待激发区域为 40 mm×40 mm 方形区域。 相应的激发光非均匀性标准偏差必须小于 11.56%。

设计选用高亮白光 LED 为 Luminus CBT90 系列光源，其主要的参数为 3 mm×3 mm 方形发射面，120° 发散角。白光 LED 可通过更换滤光片切换不同激发波长，满足微流控 PCR 实验中不同的荧光标记物激发波长的需要。

光路设计的主要内容是将 3 mm×3 mm 方形发射面的光尽可能多地收集进入光棒，经光棒出射的光再经投影放大，实现 40 mm×40 mm 区域的均匀激发。

3.1 光棒匀光原理

光棒的主要作用是对进入光棒的不同入射角度的光进行分割，经过光棒以后在出射端叠加，形成均匀的光斑^[14]。如 Fig.1 所示光棒剖面，∠A 内的光线在光棒中不经反射直接通过出射端出射；大于 ∠A 小于 ∠B 内的光线经过一次反射从光棒出射端出射，大于 ∠B 小于 ∠C 内的光线经过两次反射从光棒出射端出射。入射光线角度与其在光棒中反射的次数满足

$$\frac{W/2 + (n - 1)W}{L} < \tan \theta < \frac{W/2 + nW}{L}, \tag{13}$$

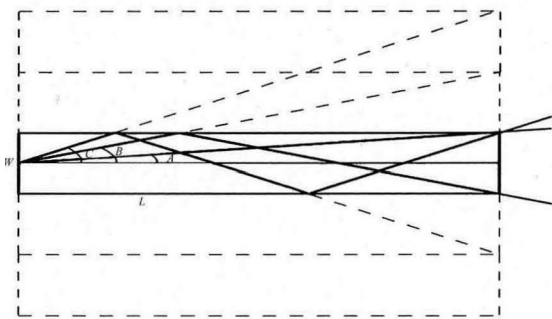


Fig.1 Principle of light pipe homogenizer

其中 n 为在光棒中的反射次数， L 、 W 为光棒剖面的长宽， θ 即为入射光线进入光棒后与光轴的夹角。即不同入射角度的光线经过不同的光路到达光棒出射端。光在光棒中的传输过程相当于对入射光进行基于角度的分割分配，经不同的路径到达出射面实现叠加积分，最终实现出射端面的光能量重新分配，从而提高出射端面照度的均匀性。

设计过程中只须调节光棒的长宽比例即可实现对入射光不同程度的分割叠加，满足相应的均匀性要求。当光棒端面尺寸一定时，适当增长光棒长度可有效提高光棒出射端照度均匀性，但并不是越长越好，光棒长度太长时，就必须考虑光的吸收损耗^[14]。

3.2 匀光光路结构

如 Fig.2 所示荧光检测系统，其中虚线框图内为匀光光路。匀光光路的设计内容包含前级耦合透镜、后级耦合透镜，前级耦合透镜将 LED 发出的光收集进入光棒，后级耦合透镜将光棒出射的光经放大投影

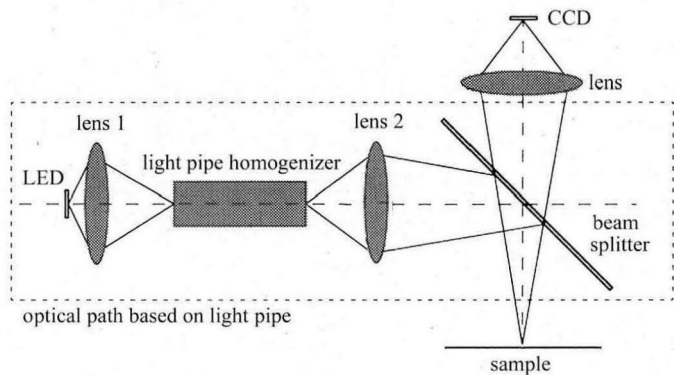


Fig.2 Fluorescence detection system including uniform illumination system

实现对较大区域的照明激发。光棒的主要作用即是通过入射光的分割叠加实现对光能量的重新分配得到均匀发射面(光棒端面),通过对均匀发射面的放大成像即可获得较大区域的均匀照明。

前级耦合透镜设计主要顾及两点:第一要尽可能多的收集 LED 发出的光能量,第二要调整光线进入光棒的入射角度。前级耦合透镜将发散的光收集进入光棒,其收集效率直接影响 LED 的能量利用率。根据光学扩展量守恒^[15],光棒出射面发散角与进入光棒的光线入射角直接相关,较小的入射角度会产生较小的出射角度,通过前级耦合透镜的调节降低光线进入光棒的入射角能够降低对后级放大系统的孔径要求,减小设计难度。

与前级耦合透镜类似,后级耦合透镜同样要考虑光棒出射面发出的光收集效率,另外还需要优化光棒出射面放大投影过程中的像差。与成像的投影过程不同,用于照明激发的投影放大对像差要求较低,主要是优化投影放大过程中的畸变。

光源发射面与光棒入射面构成一对共轭面,光棒出射面与照明激发面构成一对共轭面。前后级耦合透镜分别承担相应共轭面之间的放大作用,合理选择光棒端面尺寸能够均衡前后两组耦合透镜的设计难度,降低设计成本。在确定光棒端面尺寸后可确定前后级耦合透镜。调节光棒长度,利用 Tracepro 软件模拟分析不同光棒长度条件下激发光照度的均匀情况及能量利用率,从而确定最终结构。

照明激发光路的最终结构图如 Fig.3 所示。光棒端面尺寸的选择主要考虑光源及照明区域的大小。所选光源尺寸为 3 mm×3 mm,设计照明区域大小为 45 mm×45 mm,因此为合理分配前后级耦合透镜的放大率,降低耦合透镜的设计要求,光棒的端面尺寸在 $\sqrt{3 \times 45}$ (约为 11.6 mm) 左右为宜,综合考虑市场现有的光棒产品,最终选择端面尺寸为 8 mm×8 mm 的光棒。结合模拟分析结果及市场现有产品最终确定光棒长度为 100 mm。最终结构的相关模拟及实验结果在下一章节作详细讨论。

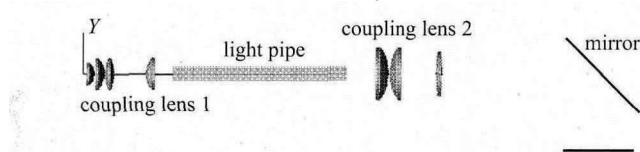


Fig.3 Diagram of illumination system designed

4 实验与结果分析

4.1 Tracepro 仿真实验与结果分析

将设计的 zemax 文件导入到 Tracepro 软件中,利用光线追迹模拟实际光学系统得到激发面辐照度情况。利用 Tracepro 插件 Surface Source Property Generator 导入 LED 光学特性图,生成表面光源文件用于光线的追迹模拟。如 Fig.4 所示, Fig.4(a) 是 Tracepro 仿真结果为 45 mm×45 mm 区域内辐照度情况,其中辐照度值均除以区域内最大辐照度值进行归一化。可知中间 40 mm×40 mm 区域光能量分布较均匀;

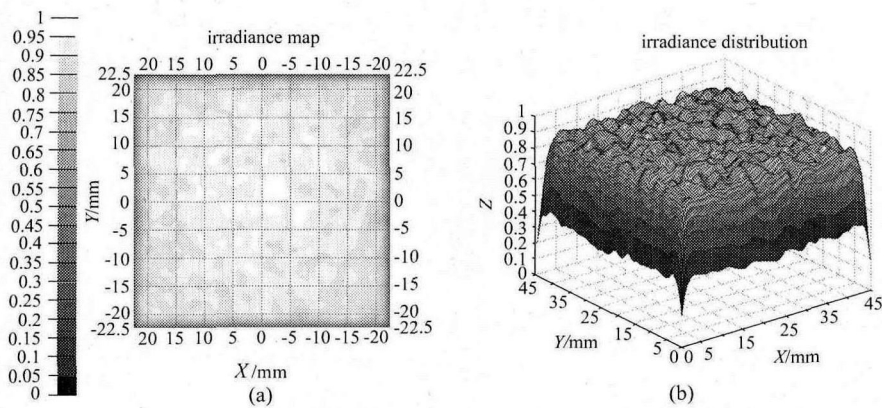


Fig.4 Irradiance map from Tracepro and 3D distribution of irradiance

Fig.4(b) 为利用 Tracepro 导出数据所得三维图, 可知, 40 mm×40 mm 区域的辐照度值起伏较小。为进一步定量研究, 利用 Tracepro 软件导出辐照度数据, 计算 40 mm×40 mm 区域内的照度值的标准偏差为 3.10%, 所设计满足激发光照度相对标准偏差小于 11.56% 的要求。

4.2 荧光成像实验与结果分析

根据设计的匀光光路结构, 搭建荧光成像实验平台, 其原理图如 Fig.2 所示。利用所搭建光路激发均匀分布的荧光素钠溶液进行荧光成像, 激发光非均匀性可通过荧光图像的非均匀性得出。Fig.5(b) 为所得荧光成像灰度图, 其中矩形框区域尺寸约为 38 mm×22 mm (实验实际使用区域小于 40 mm×40 mm)。采用相同的成像光路, 对比原有双 LED 直接激发的方法所得荧光图像 (如 Fig.5(a) 所示), 可直观地看出基于光棒的匀光光路能够有效提高激发光均匀性。

两种情况下得到的荧光图像通过相同的处理过程, 分析目标区域激发光非均匀性。首先进行灰度转化获得灰度图, 再对灰度图像进行中值滤波, 去除明显的噪点, 然后计算目标区域内灰度值的相对标准偏差, 进而得到激发光非均匀性情况。

计算表明, 双 LED 直接激发所得荧光图像灰度值的相对标准偏差为 20.23%, 大于 11.56%。采用匀光光路激发所得荧光图像灰度值的相对标准偏差分别为 6.01%, 小于 11.56%, 相应的 Ct 值标准偏差绝对值为 0.09。对比两种激发光路的数据, 基于光棒的匀光光路照度均匀性显著提高, 在理想扩增条件下值标准偏差小于 1/6, 能够满足激发光均匀性条件要求。

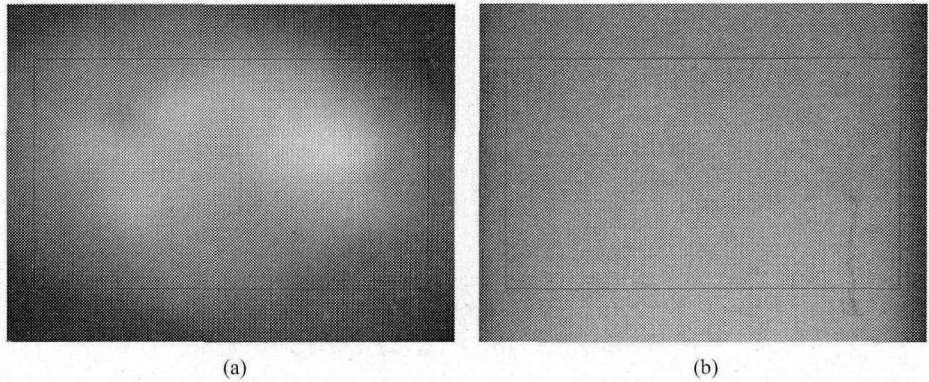


Fig.5 Grayscale fluorescence image excited by (a) two LEDs, (b) the uniform illumination system

5 结 论

分析了高通量微流控 PCR 荧光检测系统中激发光非均匀性对荧光定量 PCR 检测结果的影响。根据高通量微流控荧光定量 PCR 的特殊要求设计了基于光棒的匀光光路用于解决激发光非均匀性问题。结果表明基于光棒的匀光光路能够有效降低激发光照度非均匀性, 提高测量精度。基于光棒的匀光光路在其他通过荧光成像方法获取荧光信号的检测仪器中也有潜在的应用价值, 如用于阵列式数字 PCR 芯片、基因芯片等的荧光检测仪器。

参考文献 :

[1] Zhu Ling, Zhu Cancan, Deng Guoqing, et al. Rapid identification of H5 avian influenza virus in chicken throat swab specimens using microfluidic real-time RT-PCR [J]. *Analytical Methods*, 2014, 6(8): 2628-2632.

[2] Corman V M, Eickmann M, Landt O, et al. Specific detection by real-time reverse-transcription PCR assays of a novel avian influenza A(H7N9) strain associated with human spillover infections in China [J]. *Euro. Surveill*, 2013, 18(16): 10-16.

- [3] Lin Bingcheng, Qin Jianhua. Analysis laboratory based on a microfluidic chip [J]. *Chemical Journal of Chinese Universities* (高等学校化学学报), 2009, 30(03): 433-445 (in Chinese).
- [4] Shen F, Du W, Kreutz J E, et al. Digital PCR on a SlipChip [J]. *Lab Chip*, 2010, 10(20): 2666-2672.
- [5] Hatch A C, Fisher J S, Tovar A R, et al. 1-Million droplet array with wide-field fluorescence imaging for digital PCR [J]. *Lab Chip*, 2011, 11(22): 3838-3845.
- [6] 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* (光学学报), 2014, 34(1): 187-193 (in Chinese).
- [7] Ding Yi, Liu Xu, Zheng Zhenrong, et al. Freeform LED lens for uniform illumination [J]. *Opt. Expr.*, 2008, 16(17): 12958-12966.
- [8] Su Zhouping, Xue Donglin, Ji Zhicheng. Designing LED array for uniform illumination distribution by simulated annealing algorithm [J]. *Opt. Expr.*, 2012, 20(106): A843-A855.
- [9] Pei Wenyan, Zhou Jinyun, Liang Guojun, et al. Uniformity analysis of the illumination system for PCB laser projection image [J]. *Chinese Journal of Quantum Electronics* (量子电子学报), 2009, 26(03): 360-365 (in Chinese).
- [10] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408.
- [11] Karlen Y, McNair A, Perseguers S, et al. Statistical significance of quantitative PCR [J]. *BMC Bioinformatics*, 2007, 8(1): 131-146.
- [12] Schmittgen T D, Livak K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [13] Larionov A, Krause A, Miller W. A standard curve based method for relative real time PCR data processing [J]. *BMC Bioinformatics*, 2005, 6(1): 62-77.
- [14] Wang Weisheng, Dou Xiaoming, Huang Weishi. Analysis and design of optical tunnel lighting system for liquid crystal projector [J]. *Optical Instruments* (光学仪器), 2004, 26(04): 36-40 (in Chinese).
- [15] Lv Yong, Zheng Zhenrong. Analysis for optical extend in light-pipe illumination system [J]. *Journal of Beijing University of Aeronautics and Astronautics* (北京航空航天大学学报), 2004, 30(6): 569-571 (in Chinese).