

# 实时荧光定量 PCR 仪中荧光检测装置的设计\*

程琦, 孔明, 周洋

(中国计量学院 计量测试工程学院, 浙江 杭州 310018)

**摘要:** 设计了基于 LED 光源的积分球式聚合酶链式反应(PCR)荧光检测装置。系统采用单色 LED 作为光源, 经过积分球的均匀辐射后, 减少光源对样品的影响, 再通过光电倍增管与后续电路, 得到 PCR 循环中的实时荧光光强, 这有效地减小了荧光检测装置的体积, 提高了仪器的性价比。实验通过装置和 iCycler-iQ5 实时荧光 PCR 仪的检测数据进行对比, 仪器偏差分别为 9.44% 和 25.98%, 发现装置具有更高的精确度, 更好的稳定性和重复性。

**关键词:** 聚合酶链式反应; 积分球; 光电倍增管; 荧光检测

中图分类号: TH 744.16

文献标识码: A

文章编号: 1000-9787(2011)03-0111-03

## Design of fluorescence detection device in real-time quantitative PCR instrument\*

CHENG Qi, KONG Ming, ZHOU Yang

(College of Metrology & Measurement Engineering, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China)

**Abstract:** PCR fluorescence detection device is designed based on LED and integrating sphere. System used monochromatic LED as the light source, which through the integrating sphere of uniform radiation to reduce the influence of light source on the sample. Through the photomultiplier tube and follow-up circuit, the real-time PCR cycle fluorescence intensity is gotten. This design could effectively reduced the volume of fluorescence detection device and improved the cost-effective of instrument. This experimental results is compared with the results of iCycler-iQ5 PCR instrument. The instrumental deviations are 9.44% and 25.98% respectively. It shows that this device has higher precision, better stability and reproducibility.

**Key words:** PCR; integrating sphere; photomultiplier tube; fluorescence detection

### 0 引言

聚合酶链式反应(polymerase chain reaction, PCR)是一种在体外模拟自然 DNA 复制过程的核酸扩增技术,其原理类似于天然 DNA 的复制,是体外酶促反应选择性地合成特异性 DNA 的一种方法<sup>[1]</sup>。实时荧光定量 PCR 的反应通过添加荧光染料,由高温热变性、低温复性和适温延伸组成一个周期,循环进行,使 DNA 片段得以迅速扩增。在整个循环过程中,对产物进行标记监控,利用荧光检测装置得到实时荧光量<sup>[2]</sup>。在实时荧光 PCR 仪的荧光检测装置中,由于生物样品的特性,荧光染料所产生的荧光信号一般是很微弱的,甚至极其微弱<sup>[3]</sup>。因此,荧光检测装置中激发光源的稳定性和探测器的灵敏度是不容忽视的。

目前,各种实时荧光 PCR 仪中的荧光检测模块的区别主要在于激发光源和探测器。荧光仪器的激发光源多采用

氙灯、汞灯、钨灯和激光器<sup>[4]</sup>。氙灯、汞灯和钨灯虽然辐射波段范围广,但在不同的波段输出信号强度不同。激光器是目前高性能荧光仪器主要使用的光源,单色性好,没有杂散光,但波长选择范围小,且价格及其昂贵。PCR 仪光电检测模块的检测器主要有 CCD 和光电倍增管两类<sup>[5]</sup>。CCD 的工作原理类似于数码相机,最大的优点就是可以同时扫描所有样品中的荧光信号,但灵敏度较低,而且,同时检测样品间的荧光信号存在干扰。光电倍增管具有灵敏度高、响应速度快、噪声系数小、动态范围宽等优点,特别适用于需要测量微弱或极微弱光信号的时间分辨荧光免疫分析仪器。

为了克服现有的荧光检测设备中激发光源发光强度不稳定,单色性差的不足,本文设计了一种基于 LED 光源的积分球式荧光检测装置。采用单色光 LED 与积分球相结

合,使入射光源具有良好的单色性和平滑度,并且使用光电倍增管作为探测器,也保证了灵敏度和精确度。

## 1 系统整体设计

### 1.1 系统组成

基于LED光源的积分球式荧光检测装置由单色LED、激发窄带滤光片、积分球、荧光窄带滤光片、光电倍增管、样品和样品支架组成,系统结构如图1所示。

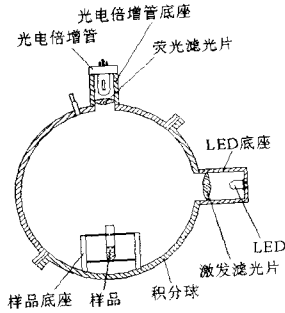


图1 系统结构图

Fig 1 Structural diagram of the system

将待测的样品试管放入样品支架的定位孔中,由托盘支撑。LED发出的光线通过激发窄带滤光片滤去杂散光之后进入积分球,经过多次漫反射使光线的光强达到均匀分布。当均匀的光线照射到样品试管上后,激发了荧光物质,使之产生荧光。样品产生的荧光通过荧光窄带滤光片照射到与积分球透光孔相连接的光电倍增管。因光电倍增管安放于试管的顶部,所以,荧光将不会受积分球漫反射的影响,直接进入光电倍增管,再通过光电倍增管后续电路,读出光强的信号。

### 1.2 激发光源

荧光检测仪器是一种高灵敏度的分析仪器,虽然可以通过提高仪器的增益或放大倍数来获取可观的信号,但是激发光源的不稳定则会影响到荧光的强度,从而无法获取可靠的光谱数据。因此,本装置中利用单色LED和积分球的特性和功能,达到单色性好,光强稳定的要求<sup>[6]</sup>。

#### 1.2.1 单色LED

本实验将用SYBR GreenI为荧光染料,所以,装置中所用的光源为单色LED,波长为485 nm,功率为1 W,其被固定于灯座的底部,并有激发窄带滤光片与之对应。滤光片中心波长为485 nm,中心波长透射率大于80%,带宽为10~30 nm,其他波长截止深度为0.5%。窄带滤光片能有效地滤除LED光源中的杂散光,使之达到单色光的要求。

#### 1.2.2 积分球技术

积分球是辐射度、光度、色度测量中不可缺少的设备,它的原理是基于封闭的漫反射表面内部辐射交换的理论。一束光进入积分球后,经过多次漫反射,就形成了一个理想的漫射源。这样就可以消除被测样品的不均匀性和探测器

件受光面的不均匀性带来的影响。另外,积分球还是一个理想的消偏振部件,从而消除了测量中偏振的影响<sup>[7]</sup>。

如图2所示,一束光通量为 $\Phi(\lambda)$ 的光束经开口 $S_1$ 进入半径为 $R$ 的积分球中,投射在内壁 $S_2$ 上,在积分球内壁上多次反射后,除了少部分光通量经开口 $S_1$ 射出以外,其余部分则会在积分球内表面形成均匀的照明。设除了投射面 $S_2$ 外,其余内壁上任意点 $M$ 处的总照度为 $E(\lambda)$ ,它是由 $S_2$ 处出射光的直射照度和所有点(包括 $S_2$ 点)的多次漫反射照度叠加组成<sup>[8]</sup>。

$$E(\lambda) = \frac{\rho_w(\lambda)\Phi(\lambda)}{4\pi R^2[1-\rho_w(\lambda)(1-f)]} \quad (1)$$

式中 $E(\lambda)$ 为 $M$ 点的总光谱辐照度; $\rho_w(\lambda)$ 为积分球内壁的光谱反射比; $\Phi(\lambda)$ 为进入积分球的光通量; $R$ 为积分球内球半径; $f$ 为积分球开口球面面积与积分球总的内反射表面积(包括开口)的比。

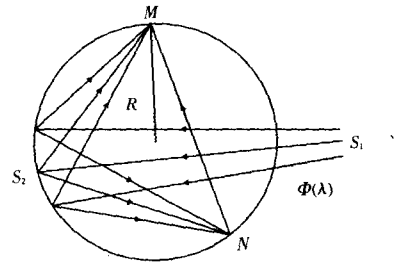


图2 积分球原理图

Fig 2 Principle diagram of integrating sphere

上式说明:当一束光进入理想积分球后,除投射面 $S_2$ 外,球内表面任意点的照度(包括球壁开口处球面上的照度)只是球的几何尺寸、涂层的漫反射比、进入球的光通量的函数,而与位置无关。

在本装置中,积分球的内表面和样品支架的外表面都涂有 $\text{BaSO}_4$ ,具有很高的漫反射特性。样品试管的顶部略低于与LED底座相连的通光孔的底部边缘,这将避免激发LED的光源直接照射到样品上,而使激发的荧光强度有所变化。

### 1.3 光电探测器

探测器由光电倍增管<sup>[9]</sup>及其后续电路组成。光电倍增管采用日本滨松的R4632型,它的灵敏度为800 A/lm,光谱响应范围为180~890 nm。因光电倍增管安放于试管的顶部,所以,荧光将不会受积分球漫反射的影响,直接进入光电倍增管,再通过光电倍增管后续电路(如图3)的驱动电路模块、微电流/电压转换电路模块、信号调理电路模块、高压模块和输出电路模块作用后,读出光强的信号。

## 2 实验与分析

### 2.1 实验方法

实验采用美国Bio-Rad公司生产的iCycler-iQ5实时

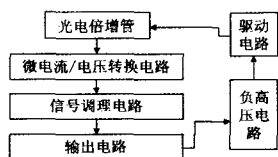


图3 光电倍增管后续电路示意图

Fig 3 Follow-up circuit diagram of photomultiplier tube

光PCR仪与积分球式的荧光检测仪的检测结果进行对比的方法。iCycler-iQ5 实时荧光PCR中采用 CCD 作为探测器,在循环过程中 SYBR GreenI 染料与双链 DNA 结合,产生荧光。此时 CCD 通过成像模式,把图像传输到电脑中,经过图像处理之后得到荧光光强。

首先取 6 支相同的样品试管,其中 3 个试管中加入 100 μL 的 10<sup>6</sup> 质量分数的样品溶液,另外 3 个试管中加入 100 μL 的 10<sup>7</sup> 质量分数的样品溶液。再将 10<sup>6</sup> 质量分数的样品试管放入积分球式的荧光检测仪中,调整光电倍增管的负高压,使光强示数在光电倍增管的灵敏阈内,并得到循环之前的荧光光强。之后将另 5 个样品试管也分别放入仪器中,得到初始光强,同时消除激发光源对样品溶液的影响。然后将这 6 个样品试管放入美国 Bio-Rad 公司生产的 iCycler-iQ5 实时荧光 PCR 仪中,进行一次循环。循环结束后,iCycler-iQ5 实时荧光 PCR 仪将自动得到一组光强值,记录下来。把这 6 支样品试管分别放入积分球式的荧光检测仪中得到另一组光强值。接着进行下一循环。直至 40 个循环之后,DNA 的数量增长进入平台期,停止循环。

2.2 实验结果与分析

将 10<sup>6</sup> 质量分数样品试管的第一组实验数据和 10<sup>7</sup> 质量分数的第一组实验数据进行比对,因 2 个仪器的光强增益不同,所以对数据进行归一化处理,结果分别如图 4 和图 5 所示。从图中可知,两条曲线的趋势相同,且从 2 个纵坐标的单位值可以看出:光电倍增管的测量值比 PCR 仪更精确,说明积分球式的荧光检测仪可以用于实时荧光 PCR 仪的荧光检测模块。

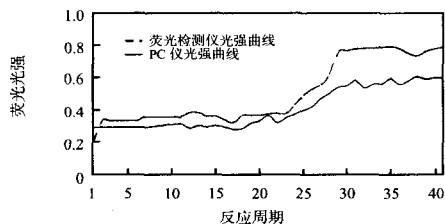


图4 10<sup>6</sup> 质量分数第一组数据对比结果

Fig 4 The first set comparison results of the mass fraction of 10<sup>6</sup>

将 10<sup>7</sup> 质量分数样品的 3 组荧光检测仪实验数据和 10<sup>7</sup> 质量分数样品的 3 个 PCR 仪实验数据分别进行比对,将数据进行归一化处理,结果分别如图 6 和图 7 所示。从图中可以发现,在相同的实验条件和相同样品情况下,荧光

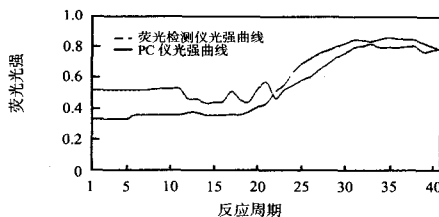


图5 10<sup>7</sup> 质量分数的第一组数据对比结果

The first set comparison results of the mass fraction of 10<sup>7</sup> 检测仪的 3 组实验数据在 23 个循环之前非常吻合,在 23 个循环之后,第 3 个样品的荧光强度则弱于第 1 和第 2 个样品,在第 35 个循环时 3 个样品的荧光强度差别最大,最大偏差为 13.87%,该装置的偏差为 9.44%。而荧光 PCR 仪的 3 组实验数据的差别为 25.98%,基本没有重合,且每条曲线的波动很大。因此,从以上分析可以看出:荧光检测仪的重复性和稳定性好于 iCycler-iQ5 实时荧光 PCR 仪。

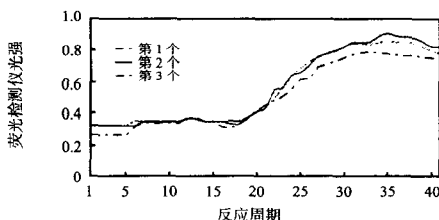


图6 10<sup>7</sup> 质量分数样品荧光检测仪数据对比结果

Fig 6 The comparison result of the fluorescence detection device

in the mass fraction of 10<sup>7</sup>

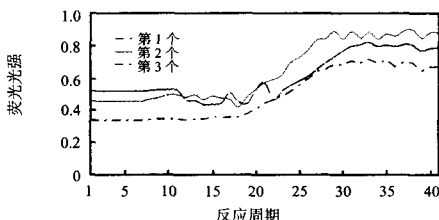


图7 10<sup>7</sup> 质量分数样品 PCR 仪数据对比结果

Fig 7 The comparison result of the PCR instrument in

the mass fraction of 10<sup>7</sup>

3 结论

1) 采用单色 LED 和积分球相连接的结构,能有效地保证激发光源的单一性和平滑度,减少了激发光源的不稳定对于样本的影响,且有效的降低了仪器成本,减小了荧光检测装置的体积,提高了仪器的性价比。

2) 光电倍增管在微弱荧光的检测中,具有更高的灵敏度、更快的响应时间和更宽的动态范围。

3) 在相同的实验条件下,将荧光装置和 iCycler-iQ5 实时荧光 PCR 仪的荧光光强的结果进行了比对,荧光装置的偏差为 9.44%,iCycler-iQ5 实时荧光 PCR 仪的偏差为 25.98%,发现荧光检测仪的精确度更高,稳定性和重复性也更好。

(下转第 117 页)

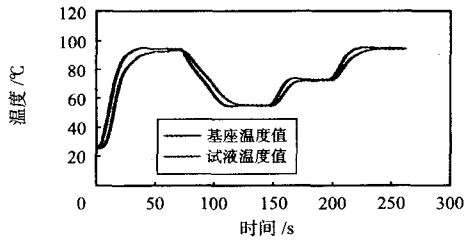


图6 基座温度与试液温度对比曲线

Fig 6 Temperature contrast curves of block and test solution

为了知道准确的延迟时间,将试液和基座从室温 25 °C 升温到 94 °C,从 94 °C 降温到 55 °C,从 55 °C 升温到 72 °C,再从 72 °C 升温到 94 °C (偏差在 ±0.5 °C 内)的时间,分别在表 2 中列出。从表 2 中可以看到,试液温度达到设定值比基座温度达到设定的延迟时间远大于 1.228 s,与理论推导一致,而且,升降温的幅度越大,延迟时间越长。

表2 两路温度部分采集数据表

Tab 2 Partial data sheet of two path's temperature

采样时间 (s)	试液温度 (°C)	采样时间 (s)	基座温度 (°C)	时间差 (s)
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
64.5	93.638	33.0	94.045	31.5
65.0	93.840	33.5	94.316	31.5
65.5	93.840	34.0	94.302	31.5
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
128.0	55.055	108.0	55.215	20.0
128.5	55.031	108.5	55.065	20.0
129.0	54.988	109.0	54.934	20.0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
172.5	71.975	162.0	71.938	10.5
173.0	72.031	162.5	72.268	10.5
173.5	72.048	163.0	72.506	10.5
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮
230.0	93.860	218.0	93.997	12.0
230.5	94.028	218.5	94.314	12.0
230.0	94.126	219.0	94.301	12.0
⋮	⋮	⋮	⋮	⋮

从图 6 所示曲线可以看到,从室温升温到 94 °C 时延迟最严重,温度相差最大,当采样时间为 33.0 s 时,基座温度为 94.045 °C,试液温度为 87.515 °C,温度相差 6.530 °C,而实时 PCR 仪对温度控制的精度要求是 ±0.1 °C。如果以基座温度为准,显然达不到控制要求。所以,试液与基座升降温的时间差不容忽视,在实时 PCR 仪的温度控制中必须考虑。

4 结 论

本文以 NTC 热敏电阻器为基础,采用 USB 总线和 FPGA 技术设计了应用于实时 PCR 仪的数据采集器,并实现了对实时 PCR 仪样品基座和试液温度的实时检测。在非稳态传热理论研究的基础上,通过设计实验,准确地检测到了试液升降温的延迟时间。延迟时间的长短与升降温的幅度有很大关系,升降温幅度越大,延迟时间越长。这一研究结果对实时 PCR 仪的温度控制具有重要意义。

参考文献:

[1] 张文超. 基因扩增分析(PCR)仪温控系统的研究与应用[J]. 华东理工大学学报,2004,30(2):204.  
 [2] 王耿新. PCR 技术在医学检验中的应用现状[J]. 实用医药杂志,2005,22(6):550.  
 [3] 于丽丽,王剑华,刁伟群. NTC 热敏电阻器在高精度温度测量中的应用[J]. 传感器技术,2004,23(12):75-77.  
 [4] Cypress Semiconductor Corporation. EZ-USB FX2LP™ USB Microcontroller [EB/OL]. [2005-05-20]. <http://www.datasheet5.com>.  
 [5] 李娜,孟令军. 用 FT245BM 实现 FPGA 与 PC 机的数据无缝传输[J]. 重庆工学院学报:自然科学版,2008,25(12):80-83.  
 [6] 肖俊,郑燕,莫易敏,等. 基于 AD7663 和 CY7C6285V 的数据采集系统设计[J]. 机电工程技术,2009,23(5):79-82.  
 [7] 钱峰. EZ-USB FX2 单片机原理、编程及应用[M]. 北京:北京航空航天大学出版社,2006:148-158.  
 [8] 安娜-玛利亚·比安什,伊负·福泰勒,雅克琳娜·埃黛. 传热学[M]. 王晓东,译. 大连:大连理工大学出版社,2008:91-95.

作者简介:

刘娟容(1984-),女,湖南邵东人,硕士研究生,主要研究方向为信号处理、生物医学仪器。

(上接第 113 页)

参考文献:

[1] 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):151-156.  
 [2] 刘志华. 使用光纤实现荧光定量 PCR 检测[J]. 中国测试技术,2006,32(6):59-61.  
 [3] 李金明. 实时荧光 PCR 技术[M]. 北京:人民军医出版社,2010:98-110.  
 [4] 许金钩,王尊本. 荧光分析法[M]. 北京:科学出版社,2006:88-91.  
 [5] 张兰. 实时 PCR 仪中荧光检测模块的研制[D]. 北京:北京工业大学,2009:4-8.

[6] Lakowicz, J R. Principles of fluorescence spectroscopy[D]. New York: Plenum Press, 1983:19-52.  
 [7] 汤顺青,朱正芳. 积分球的系统误差分析[J]. 计量技术,2005(12):30-32.  
 [8] Alfred D, Arnold D, Eric G, et al. Design of an integrating sphere as a uniform illumination source[J]. IEEE Transactions on Education, 1997, 40(2):131-134.  
 [9] 江华,周媛媛. 光电倍增管的结构与性能研究[J]. 舰船电子工程,2009,29(1):193-196.

作者简介:

程琦(1986-),女,浙江嘉兴人,硕士研究生,主要研究方向为生物荧光检测。