

文章编号 1004-924X(2009)12-2906-06

发光二极管诱导荧光微芯片分析检测器的研制

廖锡昌^{1,2}, 郑慧斐³, 袁敏^{1,2}, 金庆辉¹, 赵建龙¹

(1. 中国科学院上海微系统与信息技术研究所, 上海 200050;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 南通大学附属医院, 江苏南通 226001)

摘要:以高功率发光二极管(LED)为激发光源,研制了一种小型LED诱导荧光检测器,用于微流控芯片分析检测。利用MOS管压控恒流原理,设计恒流驱动电路,使高功率LED发光稳定。通过设计和制造光学结构,成功地将LED发散光聚焦成约 $3.5\text{ mm}\times 0.3\text{ mm}$ 的线状光束,实现了与微流控芯片中的微通道对准,简化了复杂的机械校准结构,且大大减少了光学系统体积(约为 $9.5\text{ cm}\times 4\text{ cm}\times 17\text{ cm}$)。用荧光染料NBD和高密度脂蛋白评价该体系的性能,结果表明,LED激发光源稳定,检测器重复性好,可用于微流控芯片毛细管电泳分析检测,基本实现了LED诱导荧光检测器的微型化。

关键词:发光二极管;荧光检测;线状光束;微型化;微流控芯片分析

中图分类号:TH744.5;TN312.8 **文献标识码:**A

High-power light-emitting-diode induced fluorescence detector for microfluidic chip analysis

LIAO Xi-chang^{1,2}, ZHENG Hui-fei³, YUAN Min^{1,2}, JIN Qing-hui¹, ZHAO Jian-long¹

(1. *Shanghai Institute of Microsystem and Information Technology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200050, China;*

2. *Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China;*

3. *Affiliated Hospital of Nantong University, Nantong 226001, China*)

Abstract: A novel miniaturized fluorescence detector by using a blue high-power Light-emitting-Diode (LED) as its excitation light source was developed for microfluidic chip analysis. Based on the constant current principle of MOS tubes, a constant current driving circuit was designed to control the LED to generate a stable light. A special optical structure was designed and manufactured to focus the divergent light emitted by the LED into a linear beam with the size about $3.5\text{ mm}\times 0.3\text{ mm}$. This linear beam could be easily aligned to the microchannel of a microfluidic chips to reduce the complexity of the detector and miniaturize the size of the detector, and the bulk of the optical system was about $9.5\text{ cm}\times 4\text{ cm}\times 17\text{ cm}$. NBD C6-ceramide and high density lipoprotein were used to evaluate the performance of the detector, the results indicate that the LED excitation source is stable, and the detector has good reproducibility and can be used in the capillary electrophoresis analysis of microfluidic chips.

收稿日期:2008-11-20;修订日期:2008-12-23.

基金项目:国家863高技术研究发展计划资助项目(No. 2007AA042106);上海市科委资助项目(No. 0752nm021; No. 0852nm00400; No. 08110700200)

Key words: light-emitting diode; fluorescence detection; linear shape beam ; miniaturization; microfluidic chip analysis

1 引言

激光诱导荧光检测是高灵敏度检测手段之一。在激光诱导荧光检测系统中,目前常用的激光光源存在体积大、能耗高、价格高等缺点,难以实现整个分析检测系统的微型化^[1-2]。近几年,随着 LED 技术的日益成熟和 LED 性能的改善,高功率(瓦级)、短波长(470 nm 左右)、单色性及稳定性良好的 LED 已经上市。与激光器相比,LED 具有成本低(十几元人民币)、体积小(几十个立方毫米)、使用寿命长(10^5 h)的优点。同时,这类型号的 LED 已能够满足生化分析中荧光激发的要求,LED 诱导荧光检测系统适应了仪器微型化、集成化和便携化发展的趋势。

为了使整个分析检测系统微型化,目前已经有很多使用光纤直接将 LED 发射光束传导至检测微通道的报道^[3-4]。合适的光纤耦合方法可以简化光学设计,降低检测系统复杂性,但由于光纤接收角有限,光纤与 LED 发射光束的耦合效率比较低,也会极大影响整个荧光检测系统的灵敏度。LED 发光面积一般比较大,为了充分利用 LED 的光能量并提高系统的检测灵敏度,可以通过光学系统将 LED 发出的光聚焦成能量密度大的微小光斑。目前,该方法已经得到应用^[5-8]。Yang B CH 等^[5]使用两块消色差透镜对 LED 光进行准直和聚焦,聚焦后的光通过 0.2 mm 的限光孔进入检测管道。Ebbing P J^[7]小组设计的 LED 光学聚焦系统在采用 20 倍物镜,聚焦点光斑约为 2 mm(>0.5 mm 的激光点光斑)时,其工作距离为 8 mm;当采用 40 倍的高倍物镜时,聚焦光斑约为 1 mm,但此时工作距离 <1 mm,应用受到限制。由于 LED 发出的光发散角大,目前已有文献报道 LED 经过光学系统聚焦的光斑大小约为毫米级,如果在 LED 光学系统中加上限光孔可以实现更小的光斑,但会降低 LED 能量以致检测系统灵敏度降低。

本文提出采用高功率 LED 作为激发光源,利

用 MOS 管饱和区工作时源漏极间的恒定电流为 LED 提供驱动电流,使其发射的光稳定。通过设计和制造光学结构,成功将 LED 发散光聚焦成微小的线状光束,使其很容易与微流控芯片中的微管道对准。用硝基苯并恶二唑-C6-酰基硝酸胺醇(NBD C6-ceramide)和 NBD C6-ceramide 标记的高密度脂蛋白(HDL)考察荧光检测器的性能,结果表明,LED 诱导荧光检测器工作稳定,重复性好,可用于微流控芯片毛细管电泳分析检测。

2 LED 诱导荧光检测器

2.1 高功率 LED 恒流驱动

Philips Lumileds 公司 LUEXON Rebel^[9]系列 LED 是目前体积最小的表面封装高功率 LED,表面积约为 $4\text{ mm} \times 3\text{ mm}$,具有最高的光密度(lm/mm^2);最大工作电流为 1 000 mA,此时 LED 功率高达 3 W。该检测器选用中心波长为 470 nm 的蓝光 LED。

用 LED 作激发光源时,其发出光的功率稳定性是整个检测的关键。为了实现 LED 的稳定工作,本文根据 MOS 管电压控制电流工作原理,设计并制作了一个高功率恒流驱动电路,如图 1 所示。当 MOS 管工作在饱和区时,源漏极之间的电流为恒定值,所以利用 MOS 管饱和区工作状态可实现 LED 恒流驱动^[10]。为减少 MOS 管的功耗和保证电路稳定,系统采用双电源供电。LED 使用 +5 V 电源工作,此时 MOS 管功耗约

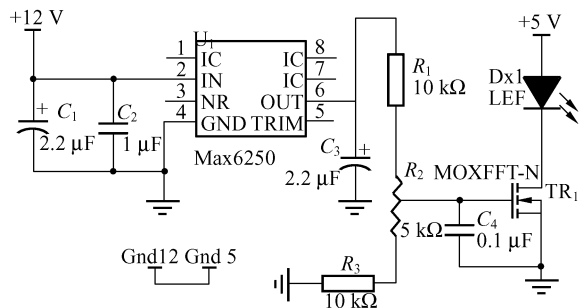


图 1 LED 恒流驱动电路

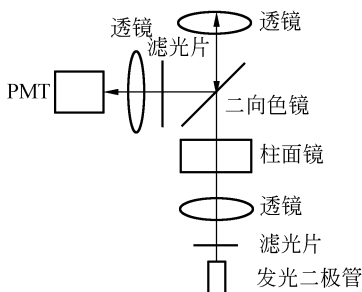
Fig. 1 LED constant-current driving circuit

为 0.9 W, 通过小的散热片就可使驱动电路与外界环境迅速达到热平衡, 从而实现 MOS 管的稳定和 LED 恒流。

5 V 基准电压源 MAX6250 通过电阻和滑动变阻器分压得到的稳定电压值作为源栅电压。调节源栅间电压 V_{GS} , 可以以改变 LED 驱动电流, 实验测得, 当 V_{GS} 调为 2.303 V 时, 输出电流为 300 mA; 当 V_{GS} 调为 2.489 V 时, 输出电流为 500 mA。

2.2 光学系统

通常用激光诱导荧光检测器分析微流控芯片时, 激光斑点与微通道的对准十分关键, 一般需要复杂的机械部件才能实现。本实验室在前期工作中提出了一种线光源的方法, 十分简便地实现了光源与管道的对准, 使检测器的机械部件大大简化。本文针对 LED 一个发散的光源, 设计并制造了一套光学组件, 成功将发散光源转换为线光源。具体光学组件如图 2(a) 所示, LED 诱导荧光检测器采用激发光路和发射光路位于同轴且同侧的共线性结构。LED 发出的光经带通滤光片过滤, 透镜准直聚焦, 柱面镜转化为线光源, 透射过二向色镜, 最后经过透镜聚焦在检测窗口处。而激发样品产生的荧光经透镜收集, 又经二向色镜, 滤光片滤除杂散光, 聚焦透镜收集至光电倍增管 (Photomultiplier, PMT), PMT 将光信号转化为电信号, 电信号经过硬件电路放大滤波, 最后通过数据采集电路和计算机做进一步的分析处理, 将结果以图形的形式显示出来。检测器光学系统实物图见图 2(b)。



(a) LED 诱导荧光检测器结构示意图

(a) Schematic diagram of LED-induced fluorescence detector



(b) 光学系统实物图

(b) Sketch of prototype

图 2 激光诱导荧光检测器系统

Fig. 2 Optical system of laser LED-induced fluorescence detector

3 实验部分

3.1 设备与试剂

实验采用的设备与试剂如下: 数字万用表 (美国 Fluke 公司); 低压直流电源模块 (上海福映电子模块厂); 高压电源模块 (天津东文高压电源模块厂); 光电倍增管 H6780 (日本滨松公司); 蓝色发光二极管 (美国 Lumileds 照明公司); 带通滤光片、二向色镜 (上海光机所); 荧光染料 NBD C6-ceramide (美国 Molecular Probes 公司); 高密度脂蛋白标准品 (美国 Sigma 公司); 石英毛细管电泳微流控芯片 (上海微系统所)。

3.2 电泳操作

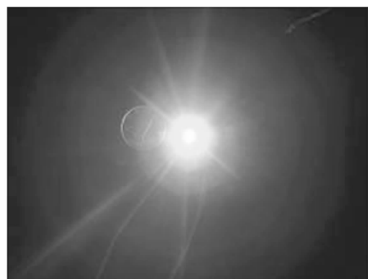
利用微流控芯片进行毛细管电泳实验^[11]。HDL 标准品处理好后, 加样。电泳条件为: 进样电压 700 V, 进样时间 40 s; 分离电压 2 500 V, 分离时间 3 min。

4 结果与讨论

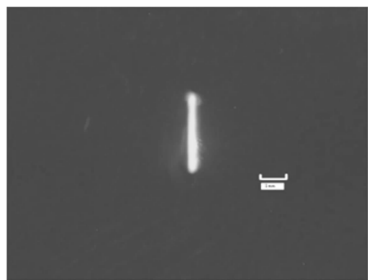
4.1 线状激发光源

LED 表面积比较小, 约为 12 mm^2 , 可视作点光源, 通过一系列光学组件可将 LED 发散光聚焦成大小约 $3.5 \text{ mm} \times 0.3 \text{ mm}$ 的线状光源。图 3 是 LED 聚焦前后光源对比图, 图 3(a) 为 LED 发出的发散光, 图 3(b) 是经过聚焦系统后形成的线状光源。检测时, 线状光源与微管道垂直交叉, 可以很容易与管道对准, 解决了激光点光源与管道

对准难度大的问题,而且降低了系统复杂性、减少了系统体积。0.3 mm 的光束线宽已小于激光光斑的大小,可以满足微流控芯片电泳分析的要求,不使用光阑而只通过光学聚焦可以充分地利用 LED 的能量,所以这种线光源结构有效地提高了 LED 诱导荧光检测器的灵敏度。



(a) LED 发散光
(a) Emitted light of LED



(b) 聚焦后的 LED 线状光束
(b) Linear beam of LED after focusing

图 3 LED 光源聚焦前后的对比

Fig. 3 Comparison of emitted light from LED before and after focusing

4.2 检测器的小型化

目前激光诱导荧光检测系统中常用的是固态激光器,如美国 Melles Griot 公司的一款 DPSS,其尺寸为 27.5 cm×13 cm×5 cm,而使用 LED 其体积只有几十个立方毫米,远远小于激光器的体积。本文提出将 LED 发散光聚焦成线状光束,减化了光学系统,大大降低了整个光学系统体积。采用模块化的光电倍增管,整个光学系统的体积约为 9.5 cm×4 cm×17 cm,实物图见图 2 (b)。另外恒流驱动电路尺寸为 5 cm×4 cm×2.5 cm,所以整个 LED 诱导荧光检测器的体积小,重量轻,实现了激光诱导荧光检测器的小型化。

4.3 LED 光源稳定性

进行微流控电泳分析时,生化样品产生的荧光信号往往十分微弱,所以必须提高 LED 光源的稳定性,以保证检测结果的稳定性并提高检测灵敏度。实验选用 LED 工作电流为 500 mA, PMT 灵敏度控制电压分别为 600、700、800、900 mV,不加样品所检测得到的背景光信号图谱如图 4 所示。

PMT 将光学信号转换为电流信号,检测器中采用的 PMT 的输出为 0~100 μ A,电流信号经过硬件电路放大滤波转化为 0~2.5 V 的电压信号。图 4 中的纵坐标表示光学系统中的背景光信号所引起的电压信号,该信号主要是由进入荧光收集系统的 LED 发散光所产生。图 4 所示的背景光噪声基线很平直而且信号很小,可以说明 LED 驱动电路和 LED 发光都很稳定,整个光学系统性能优良。

由于 LED 功率高,其聚焦后的线光源有较强的能量;另外,LED 光源稳定性好,所以可以利用 LED 取代一般激光器来激发荧光,并能取得相近的性能,而成本和体积又会下降很多,检测器性价比比较高。

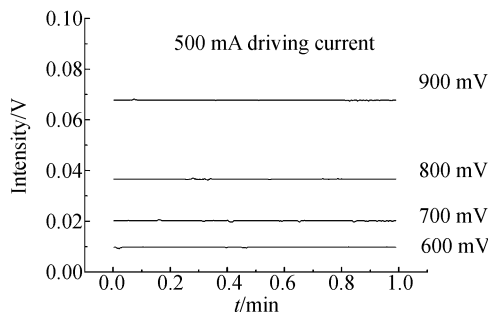


图 4 不同 PMT 灵敏度控制电压工作时的背景光信号

Fig. 4 Signal detected by different control voltages of PMT

4.4 系统性能

LED 工作电流为 500 mA 时,使用 0.2 mg/mL 的 NBD C6-ceramide 样品评价了 LED 诱导荧光检测器的性能。进行了重复性实验,每次实验 2 min,实验进行到约 1 min 时,虹吸进样,前后检测到的光信号改变量反应了荧光信号的强弱,检测图谱如图 5 所示。进样之前,3 条曲线几乎重叠,进样之后,LED 激发荧光染料产生相近

的荧光强度。由于采用虹吸进样,加样等实验操作会有误差,所以出峰时间有所差别。但 3 次进样所得图谱的最高峰值相对标准偏差(RSD)为 3.0%,说明该检测器整体性能稳定,具有较好的重复性。

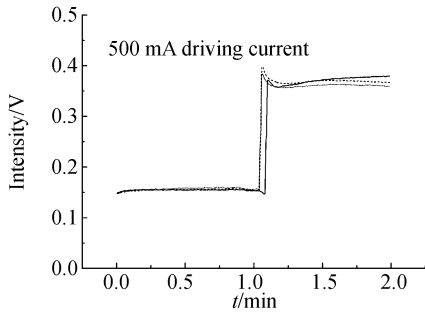


图 5 NBD C6-ceramide 样品的重复性实验图谱

Fig. 5 Experiment of reproducibility of NBD C6-ceramide

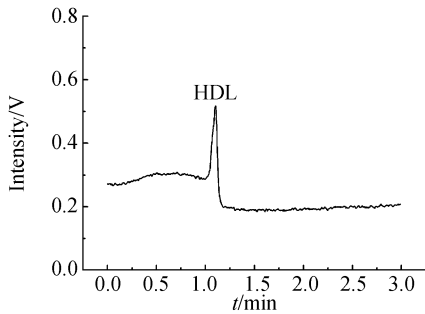


图 6 NBD 标记的 HDL 标准品电泳图谱

Fig. 6 Electrophoretogram of NBD-labeled HDL

实验中还使用了 NBD C6-ceramide 标记的 HDL 标准品进行电泳实验,得到的电泳图谱如 6 所示,样品峰形良好,表明 LED 诱导荧光检测器也可用于微流控芯片毛细管电泳分析检测。

5 结 论

以高功率 LED 为激光光源,构建了用于微流控芯片检测的 LED 诱导荧光检测器。利用 MOS 管压控恒流原理实现了高功率恒流驱动,保证了 LED 激发光源的稳定性。通过设计和制作光学结构成功地实现了将发散的 LED 光聚焦成线状光束,避免了复杂光学校准系统,使光学系统的体积大大减少,实现了激光诱导荧光检测系统的微型化、集成化。以 NBD C6-ceramide 和 HDL 评测该检测器,实验结果表明,该检测器性能稳定,重复性好;样品峰形良好,可用于微流控芯片毛细管电泳分析检测。目前该检测器通过计算机实现控制显示,也可使用液晶触摸屏实现系统的控制和检测结果的显示。由于系统功耗小,可采用电池供电,从而可以实现 LED 诱导荧光检测器的微型化、便携化。由于激光诱导荧光检测灵敏度高,这种便携式、微型化的 LED 诱导荧光检测器有望在现场生化分析检测中得到广泛应用。

参考文献:

- [1] 王德,李学千. 半导体激光器的最新进展及其应用现状[J]. 光学 精密工程, 2001, 9(3): 279-283.
WANG D, LI X Q. New progress in semiconductor lasers and their applications [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2001, 9(3): 279-283. (in Chinese)
- [2] 吕彦飞,张喜和,檀慧明. 全固态连续波 555 nm 黄-绿光激光器[J]. 光学 精密工程, 2007, 15(5): 674-677.
LU Y F, ZHANG X H, TAN H M. 555 nm all solid-state continuous-wave yellow-green laser [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2007, 15(5): 674-677. (in Chinese)
- [3] WANG CH L, ZHAO SH L, YUAN H Y, *et al.*. Determination of excitatory amino acids in biological fluids by capillary electrophoresis with optical fiber

- light-emitting diode induced fluorescence detection [J]. *Journal of Chromatography B*, 2006, 833: 129-134.
- [4] ZHAO SH L, WANG B, HE M, *et al.*. Determination of free D-alanine in the human plasma by capillary electrophoresis with optical fiber light-emitting diode-induced fluorescence detection [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2006, 569: 182-187.
- [5] YANG B CH, TIAN H ZH, XU J, *et al.*. An integrated light-emitting diode-induced fluorescence detector for capillary electrophoresis [J]. *Talanta*, 2006, 69: 996-1000.
- [6] SU A K, CHANG Y SH, LIN CH H. Analysis of riboflavin in beer by capillary electrophoresis/blue light emitting diode (LED)-induced fluorescence detection combined with a dynamic pH junction tech-

nique[J]. *Talanta*, 2004, 64: 970-974.

- [7] EBBING P J, CHARLES A. Spectral filtering of light-emitting diodes for fluorescence detection[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2005, 546: 37-45.
- [8] QIN Y L, LUAN X L, BI L J, *et al.*. Real-time detection of dental calculus by blue-LED-induced fluorescence spectroscopy[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2007, 87: 88-94.
- [9] Philips Lumileds Lighting Inc. LUEXON Rebel Datasheet DS56[Z].
- [10] MASATAKA N, HIROSHI S, SONG W J. A

light-emitting diode light source for imaging of neural activities with voltage-sensitive dyes[J]. *Neuroscience Research*, 2006, 54: 230-234.

- [11] 金庆辉, 庄贵生, 刘菁, 等. 微流控分析芯片在线尿中蛋白及 LDH 同工酶检测[J]. *光学精密工程*, 2005, 13(2): 151-157.
- JIN Q H, ZHUANG G SH, LIU J, *et al.*. On-line detection of urinary protein and lactate dehydrogenase isoenzyme by capillary electrophoresis microchip[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2005, 13(2): 151-157. (in Chinese)

作者简介:



廖锡昌(1983-), 男, 安徽黄山人, 博士研究生, 2006 年于山东大学获得学士学位, 主要从事微流控芯片检测的研究。E-mail: liaobarry@mail.sim.ac.cn



郑慧斐(1986-), 女, 福建龙岩人, 硕士研究生, 2007 年于南通大学获得学士学位, 主要从事微流控芯片毛细管电泳分析的研究。E-mail: zhenghuihui3884326@163.com



袁敏(1985-), 女, 山东潍坊人, 博士研究生, 2007 年于山东大学获得学士学位, 主要从事微流控芯片检测的研究。E-mail: yuanmin986@mail.sim.ac.cn



金庆辉(1972-), 男, 江西玉山人, 研究员, 1997 年于南昌大学获得学士学位, 2002 年于中科院上海微系统与信息技术研究所获得博士学位, 主要从事 MEMS 生物微系统方面的研究。E-mail: jinqh@mail.sim.ac.cn

导师简介:



赵建龙(1969-), 男, 江苏张家港人, 研究员, 1992 年于清华大学获得学士学位, 1997 年于中科院上海冶金所获得博士学位, 主要从事微电子技术、生物微系统等方面的研究。E-mail: jlzhao@mail.sim.ac.cn