



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103063646 A

(43) 申请公布日 2013. 04. 24

(21) 申请号 201310012461. 6

(22) 申请日 2013. 01. 14

(71) 申请人 武汉大学

地址 430072 湖北省武汉市武昌区珞珈山武汉大学

(72) 发明人 肖玉秀 邓彬

(74) 专利代理机构 武汉科皓知识产权代理事务所(特殊普通合伙) 42222

代理人 温珊珊 沈林华

(51) Int. Cl.

G01N 21/64(2006. 01)

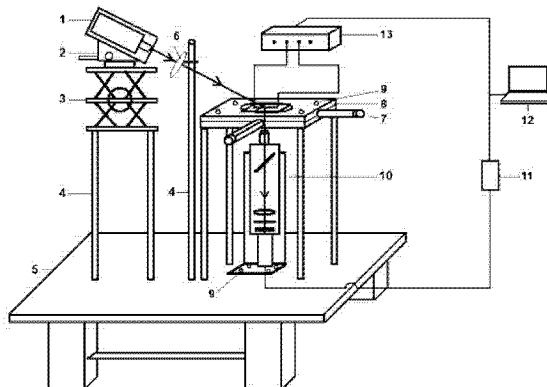
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54) 发明名称

一种两用激光诱导荧光检测系统

(57) 摘要

一种两用激光诱导荧光检测系统,包括隔振光学平台(5)、数据采集单元和数据处理单元,所述隔振光学平台(5)上设置有激光发射单元、可调式凸透镜(6)和荧光转换单元,所述可调式凸透镜(6)将激光发射单元发出的小角度入射光线聚焦于荧光转换单元,经荧光转换单元转换的荧光信号由数据采集单元收集并输送到数据处理单元。其优点是:易于更换微流控芯片或者毛细管,且定位精确、二维可调,使得该检测系统可以用于微流控芯片或者毛细管电泳分离的激光诱导荧光检测,采用小角度入射式光路设计,获得最大的检测灵敏度,检测限达 10<sup>-11</sup>mol/L,可用于微量样品的检测;可以广泛应用于药学、生命科学、环境工程、食品业及农业等多个领域。



1. 一种两用激光诱导荧光检测系统,包括隔振光学平台(5)、数据采集单元和数据处理单元,其特征在于:所述隔振光学平台(5)上设置有激光发射单元、可调式凸透镜(6)和荧光转换单元,所述可调式凸透镜(6)将激光发射单元发出的小角度入射光线聚焦于荧光转换单元,经荧光转换单元转换的荧光信号由数据采集单元收集并输送到数据处理单元。

2. 如权利要求1所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述激光发射单元的激光光路和经荧光转换单元的荧光光路之间的夹角 $\alpha$ 的范围为 $90^\circ < \alpha < 180^\circ$ 。

3. 如权利要求1所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述激光发射单元,包括依次连接的激光器(1)、二维微调器(2)和高承载剪式升降台(3),所述高承载剪式升降台(3)通过连杆(4)和隔振光学平台(5)相连。

4. 如权利要求1所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述荧光转换单元,包括中心开设圆孔的二维平移台(7)和滤镜组固定模块(10),所述二维平移台(7)中心圆孔的圆心位于滤镜组固定模块(10)的中轴线上。

5. 如权利要求4所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述滤镜组固定模块(10),包括显微物镜(15)、外筒(17)和内筒(25),所述外筒(17)内设二向色镜(18)和聚焦透镜(19),内筒(25)内设长通滤镜(21)、带通滤镜(22)和光电倍增管(24),所述二向色镜(18)、聚焦透镜(19)、长通滤镜(21)、带通滤镜(22)和光电倍增管(24)的中轴与显微物镜(15)的中轴同轴。

6. 如权利要求4或5所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述二维平移台(7)上设置有中心开设透光圆孔的芯片固定板(8),所述芯片固定板(8)上开设有用于放置微流控芯片的长方形凹槽(28)。

7. 如权利要求4或5所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述二维平移台(7)上设置有中心开设透光圆孔的上、下两块毛细管固定板(30),所述下部的毛细管固定板(30)上开设一用于放置毛细管的线形凹槽(32)。

8. 如权利要求6所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述芯片固定板(8)的中心圆孔与二维平移台(7)的中心圆孔同轴。

9. 如权利要求7所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述毛细管固定板(30)的中心圆孔与二维平移台(7)的中心圆孔同轴。

10. 如权利要求1所述的两用激光诱导荧光检测系统,其特征在于:所述数据采集单元为数据采集器(11)。

## 一种两用激光诱导荧光检测系统

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种检测系统,具体的说是两用激光诱导荧光检测系统。

### 背景技术

[0002] 现代分析技术逐渐向检测样品微量化发展,分析方法要求具有较高的检测灵敏度。一般紫外法(UV)检测限为 $10^{-5} - 10^{-6}$  mol/L,质谱法(MS)为 $10^{-8} - 10^{-9}$  mol/L,而激光诱导荧光法(Laser Induced Fluorescence Detector, LIFD)能达到 $10^{-9} - 10^{-12}$  mol/L级别,是所有检测方法中灵敏度最高的,因此许多分析方法和技术手段均采用 LIFD 作为检测方式。

[0003] 微流控芯片技术(Microfluidic chip),又称微全分析系统(Micro total analysis systems,  $\mu$ TAS)或芯片实验室(Lab-on-a-chip),它借助微机电加工技术,将采样、反应、分离、检测等操作都整合在一块厘米尺寸的芯片上完成,集成度高,实验时间短,试剂消耗少,分析通量高,在过去的十几年间得到了迅猛发展。毛细管电泳技术(Capillary electrophoresis)是一种应用电分离技术的分离方式,在电解质溶液中,离子样品在电场作用下,各种粒子按照移动速度不同实现了分离,在检测窗口处被检测到物质信号,被广泛用于DNA、蛋白质等生物样品的分析。以上两种分析方法使用广泛,均可连接 LIFD 作为检测手段。

[0004] 目前世界上 LIFD 的生产厂商主要有美国贝克曼公司、沃特斯公司和上海通微公司等,其生产的 LIFD 多采用“共焦式”设计,但这些检测器大多结构复杂,灵敏度有限( $10^{-9}$  mol/L),还有进一步的提升空间。

### 发明内容

[0005] 本发明的目的是提供一种检测灵敏度高、定位准确、稳定性好、使用方便的两用激光诱导荧光检测系统。

[0006] 一种两用激光诱导荧光检测系统,包括隔振光学平台 5、数据采集单元和数据处理单元,所述隔振光学平台 5 上设置有激光发射单元、可调式凸透镜 6 和荧光转换单元,所述可调式凸透镜 6 将激光发射单元发出的小角度入射光线聚焦于荧光转换单元,经荧光转换单元转换的荧光信号由数据采集单元收集并输送到数据处理单元。

[0007] 所述激光发射单元的激光光路和经荧光转换单元的荧光光路之间的夹角  $\alpha$  的范围为  $90^\circ < \alpha < 180^\circ$ 。

[0008] 所述激光发射单元,包括依次连接的激光器 1、二维微调器 2 和高承载剪式升降台 3,所述高承载剪式升降台 3 通过连杆 4 和隔振光学平台 5 相连。

[0009] 所述荧光转换单元,包括中心开设圆孔的二维平移台 7 和滤镜组固定模块 10,所述二维平移台 7 中心圆孔的圆心位于滤镜组固定模块 10 的中轴线上。

[0010] 所述滤镜组固定模块 10,包括显微物镜 15、外筒 17 和内筒 25,所述外筒 17 内设二向色镜 18 和聚焦透镜 19,内筒 25 内设长通滤镜 21、带通滤镜 22 和光电倍增管 24,所述二

向色镜 18、聚焦透镜 19、长通滤镜 21、带通滤镜 22 和光电倍增管 24 的中轴与显微物镜头 15 的中轴同轴。

[0011] 所述二维平移台 7 上设置有中心开设透光圆孔的芯片固定板 8, 所述芯片固定板 8 上开设有用于放置微流控芯片的长方形凹槽 28。

[0012] 所述二维平移台 7 上设置有中心开设透光圆孔的上、下两块毛细管固定板 30, 所述下部的毛细管固定板 30 上开设一用于放置毛细管的线形凹槽 32。

[0013] 所述芯片固定板 8 的中心圆孔与二维平移台 7 的中心圆孔同轴。

[0014] 所述毛细管固定板 30 的中心圆孔与二维平移台 7 的中心圆孔同轴。

[0015] 所述数据采集单元为数据采集器 11。

[0016] 本发明两用激光诱导荧光检测系统的优点是:易于更换微流控芯片或者毛细管,且定位精确、二维可调,使得该检测系统可以用于微流控芯片或者毛细管电泳分离的激光诱导荧光检测,采用小角度入射式光路设计,获得最大的检测灵敏度,检测限达  $10^{-11}$  mol/L,可用于微量样品的检测;该检测系统可以广泛应用于药学、生命科学、环境工程、食品业及农业等多个领域,特别是痕量物质的检测,相对于其他检测器而言具有更为精确、灵敏的特点。

## 附图说明

[0017] 图 1 为本发明的结构示意图;

图 2a 为本发明滤镜组固定模块的侧视图;

图 2b 为本发明滤镜组固定模块的正视图;

图 3 为设置有微流控芯片的二维平移台的结构示意图;

图 4a 为毛细管的结构示意图;

图 4b 为毛细管固定板的结构示意图;

图 4c 为下部毛细管固定板的结构示意图;

图 4d 为设置有毛细管固定板的二维平移台的结构示意图;

图 5 为本发明的微流控芯片电泳实验灵敏度测试结果图;

图 6 为本发明的毛细管电泳实验灵敏度测试结果图。

[0018] 其中:1 为激光器、2 为二维微调器、3 为高承载剪式升降台、4 为连杆、5 为隔振光学平台、6 为可调式凸透镜、7 为二维平移台、8 为芯片固定板、9 为 M6 螺钉、10 为滤镜组固定模块、11 为数据采集器、12 为计算机、13 为多路可控编程电源、14 为 L 形金属板、15 为显微物镜、16 为金属环套、17 为外筒、18 为二向色镜、19 为聚焦透镜、20 为镜槽、21 为长通滤镜、22 为带通滤镜、23 为小孔、24 为光电倍增管、25 为金属内筒、26 为载玻片、27 为微流控芯片、28 为长方形凹槽、29 为毛细管、30 为毛细管固定板、31 为毛细管窗口、32 为线性凹槽。

## 具体实施方式

[0019] 下面结合附图,对本发明进行进一步说明:如图 1-6 所示,一种两用激光诱导荧光检测系统,包括隔振光学平台 5、数据采集单元和数据处理单元,所述隔振光学平台 5 上设置有激光发射单元、可调式凸透镜 6 和荧光转换单元,所述可调式凸透镜 6 将激光发射单元发出的小角度入射光线聚焦于荧光转换单元,经荧光转换单元转换的荧光信号由数据采集

单元收集并输送到数据处理单元。

[0020] 所述激光发射单元的激光光路和经荧光转换单元的荧光光路之间的夹角  $\alpha$  的范围为  $90^\circ < \alpha < 180^\circ$ 。

[0021] 所述激光发射单元发射的激光入射角度最佳为  $25^\circ - 35^\circ$ 。

[0022] 所述激光发射单元,包括依次连接的激光器 1、二维微调器 2 和高承载剪式升降台 3,所述高承载剪式升降台 3 通过连杆 4 和隔振光学平台 5 相连,所述高承载剪式升降台 3 上设置有二维微调器 2,所述二维微调器 2 上设置有激光器 1。

[0023] 所述荧光转换单元,包括中心开设圆孔的二维平移台 7 和滤镜组固定模块 10,所述二维平移台 7 中心圆孔的圆心位于滤镜组固定模块 10 的中轴线上。

[0024] 所述滤镜组固定模块 10,包括显微物镜 15、外筒 17 和内筒 25,所述外筒 17 内设二向色镜 18 和聚焦透镜 19,内筒 25 内设长通滤镜 21、带通滤镜 22 和光电倍增管 24,所述二向色镜 18、聚焦透镜 19、长通滤镜 21、带通滤镜 22 和光电倍增管 24 的中轴与显微物镜头 15 的中轴同轴。所述二向色镜 18 与水平面呈  $45^\circ$  夹角。

[0025] 所述二维平移台 7 上设置有中心开设透光圆孔的芯片固定板 8,所述芯片固定板 8 上开设有用于放置微流控芯片的长方形凹槽 28。

[0026] 所述二维平移台 7 上设置有中心开设透光圆孔的上、下两块毛细管固定板 30,所述下部的毛细管固定板 30 上开设一用于放置毛细管的线形凹槽 32。

[0027] 所述芯片固定板 8 的中心圆孔与二维平移台 7 的中心圆孔同轴。

[0028] 所述毛细管固定板 30 的中心圆孔与二维平移台 7 的中心圆孔同轴。

[0029] 所述数据采集单元为数据采集器 11。

[0030] 所述数据处理单元为计算机 12。

[0031] 如图 1 所示,为本发明的基本结构示意图,激光器 1 通过二维微调器 2、高承载剪式升降台 3 和接杆 4 固定于精密隔振光学平台 5 之上。可调式凸透镜 6 通过接杆 4 固定在光学平台 5 之上,其角度可调。精密二维平移台 7 通过接杆 4 固定于光学平台 5 之上。滤镜组固定模块 10 通过 M6 螺钉 9 垂直固定在光学平台 5 之上,其显微物镜 15 正对着精密二维平移台 7 中心的圆孔。荧光信号通过数据采集器 11 被计算机 12 收集并处理。微流控芯片电泳所需电压由多路可控编程电源 13 提供。

[0032] 如图 2a、b 所示,滤镜组固定模块 10 通过 L 形金属板 14,用 M6 螺钉 9 固定在精密隔振光学平台 5 之上,使得整个滤镜组固定模块 10 垂直于光学平台 5。滤镜组固定模块 10 上包括有显微物镜 15,通过金属环套 16 固定在金属外筒 17 上;二向色镜 18 和聚焦透镜 19 通过镜槽 20 固定在金属外筒 17 上;长通滤镜 21、带通滤镜 22、小孔 23 和光电倍增管 24,固定在金属内筒 25 上。入射激光以一定的小角度 ( $25^\circ - 35^\circ$ ) 入射,聚焦在芯片微通道之上。所得的发射荧光信号(波长大于 500 nm)经位于芯片微通道之下的显微物镜经垂直方向收集,透过二向色镜 18,聚焦透镜 19、长通滤镜 21、带通滤镜 22、小孔 23 后,由光电倍增管 24 将光信号经放大并转换成电信号,通过数据采集器 11,被计算机 12 收集并处理得荧光信号图谱。

[0033] 如图 3 所示,使用本发明检测系统进行微流控芯片实验时,键合在载玻片 26 上的微流控芯片 27 通过芯片固定板 8 固定在精密二维平移台 7 上,可方便调节芯片检测窗口的水平位置。芯片固定板是一块正方形工程塑料板,四角上钻有 M6 规格的孔,中心有一圆孔

可以透光。在板上刻有载玻片大小的长方形凹槽 28, 可以使以载玻片 26 为基底的微流控芯片正好放入此凹槽中。使用时先将芯片放入凹槽内, 用 M6 螺钉 9 将芯片固定板固定在精密二维平移台 7 上。通过调节精密二维平移台 7, 带动微流控芯片水平移动, 调节激发激光聚焦位置和荧光信号收集位置, 使光电倍增管获得最大的信号响应。

[0034] 如图 4 所示, 使用本发明检测系统进行毛细管电泳实验时, 毛细管 29 (图 4 a) 通过毛细管固定板 30 (图 4 b) 固定在精密二维平移台 7 上, 可方便调节毛细管检测窗口 31 的水平位置。毛细管固定板是两块正方形工程塑料板, 四角上钻有 M6 规格的孔, 中心有一圆孔可以透光。其中一块沿水平方向刻有一道线性凹槽 32, 便于放置毛细管(图 4 c)。使用时, 先将毛细管放入线性凹槽中, 毛细管窗口对准中心圆孔, 并用胶带固定。然后盖上另一块盖板, 用 M6 螺钉 9 将合盖在一起(中间夹有毛细管)的两板固定在精密二维平移台 7 上(图 4 d)。通过调节精密二维平移台 7, 调节激发激光聚焦位置和荧光信号收集位置, 使光电倍增管获得最大的信号响应。

[0035] 实施例一 在本发明检测系统上进行微流控芯片电泳的灵敏度测试

样品:  $0.5 \mu\text{g/mL}$  盐酸阿霉素; 微流控芯片: 十字通道结构, 通道宽  $150 \mu\text{m}$ , 深  $30 \mu\text{m}$ ; 进样方式: 各样品池均加样  $20 \mu\text{L}$ , 夹流方式进样; 电泳条件: 四硼酸钠 ( $10 \text{ mM}$ ) - 十二烷基硫酸钠 ( $10 \text{ mM}$ ) 溶液,  $\text{pH } 9.3$ , 程序电压控制, 进样时间  $30 \text{ s}$ , 分离时间  $30 \text{ s}$ ; 检测距离:  $5 \text{ mm}$ ; 激发光波长:  $473 \text{ nm}$ ; 发射光中心波长  $575 \text{ nm}$ ; 激光入射角度:  $35^\circ$ ; 激光光路和荧光光路之间的夹角  $\alpha$  为  $125^\circ$ 。微流控芯片电泳结果如图 5 所示。由图可见, 阿霉素的电泳峰成脉冲峰形式。以  $0.5 \mu\text{g/mL}$  的盐酸阿霉素标准溶液测定微流控芯片电泳 - 激光诱导荧光检测系统的检测灵敏度, 经计算得盐酸阿霉素的浓度检测限为  $1.66 \times 10^{-10} \text{ g/mL} = 2.86 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ 。

[0036] 实施例二 在本发明检测系统上进行毛细管电泳的灵敏度测试

样品:  $0.1 \mu\text{mol/L}$  荧光素钠; 毛细管:  $30 \mu\text{m}$  内径,  $365 \mu\text{m}$  外径, 全长  $60 \text{ cm}$ , 毛细管有效长度  $30 \text{ cm}$ ; 进样方式: 毛细管两端高度差  $10 \text{ cm}$ , 进样时间  $10 \text{ s}$ ; 电泳条件: Tris 碱 ( $10 \text{ mM}$ ) - 硼酸 ( $10 \text{ mM}$ ),  $\text{pH } 8.6$ , 分离电压  $15 \text{ kV}$ ; 激发光波长:  $473 \text{ nm}$ ; 发射光中心波长  $515 \text{ nm}$ ; 激光入射角度:  $35^\circ$ ; 激光光路和荧光光路之间的夹角  $\alpha$  为  $125^\circ$ 。毛细管电泳结果如图 6 所示。由图可见, 荧光素钠的迁移时间约为  $5.3 \text{ min}$ , 峰高约为  $50 \text{ mV}$ , 系统噪音值较低, 基线漂移情况较小。经计算, 此时样品信噪比 (S/N) 值为  $5000$ , 浓度检测限为  $6.0 \times 10^{-11} \text{ mol/L}$ , 经进样体积换算后得质量检测限为  $21.8 \text{ zmol}$ , 比市面上现有的商品化仪器 (异硫氰酸荧光素的浓度检测限为  $10^{-9} \text{ mol/L}$ ) 低了百分之一。

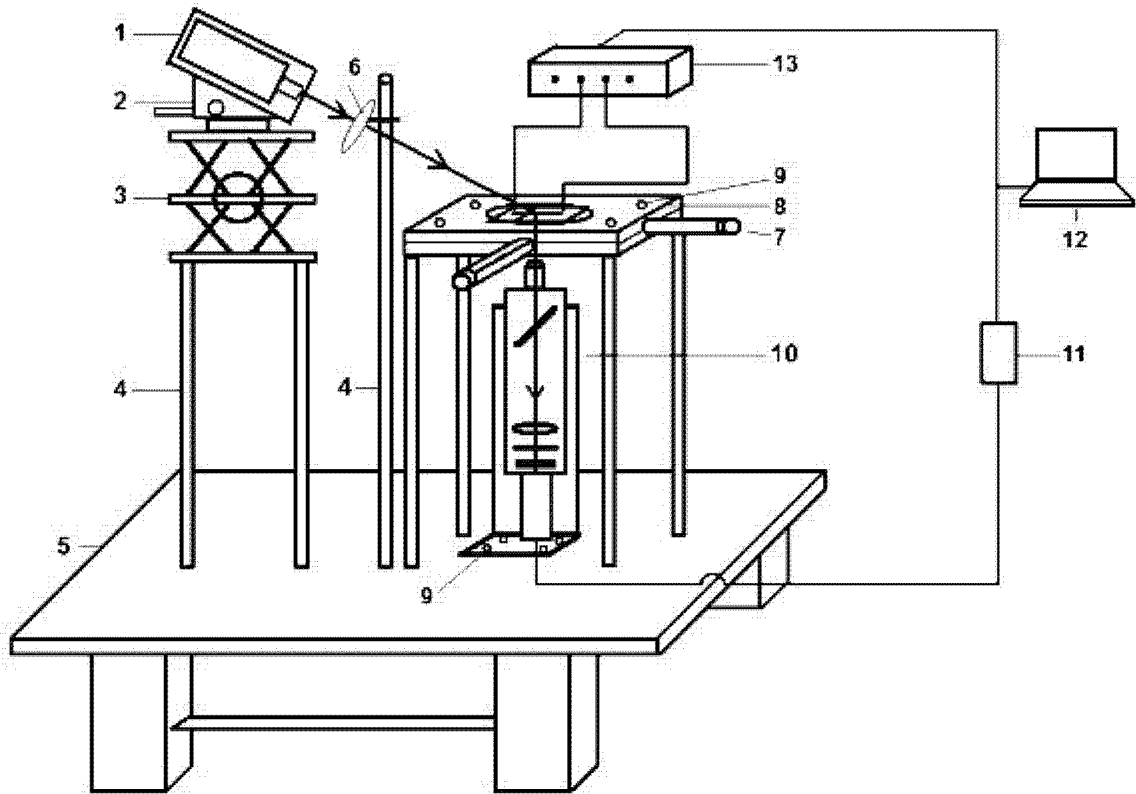


图 1

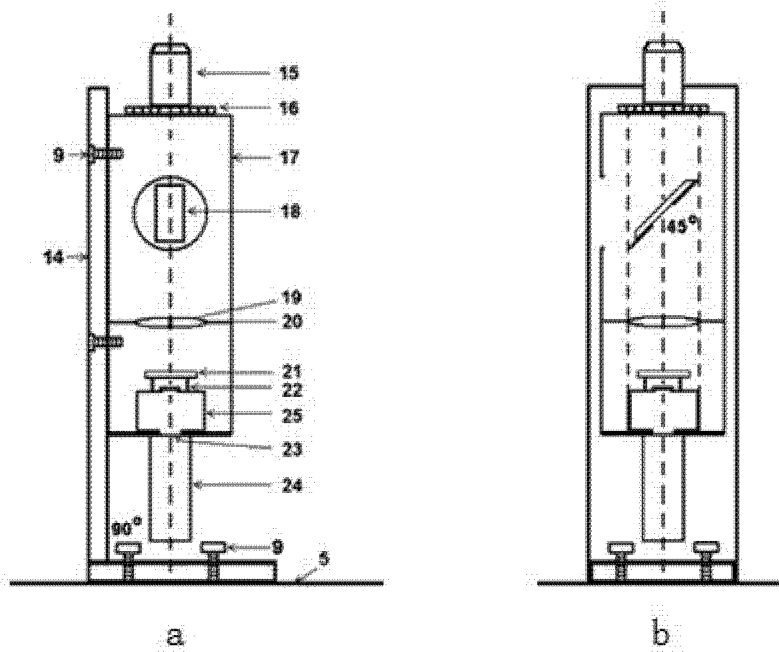


图 2

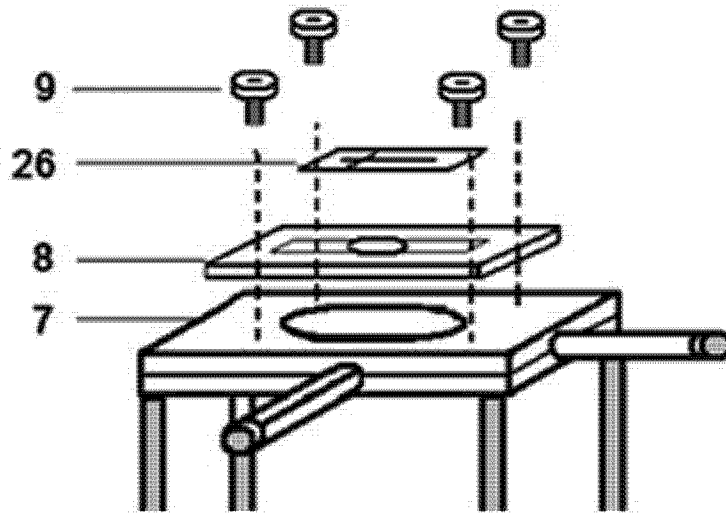


图 3

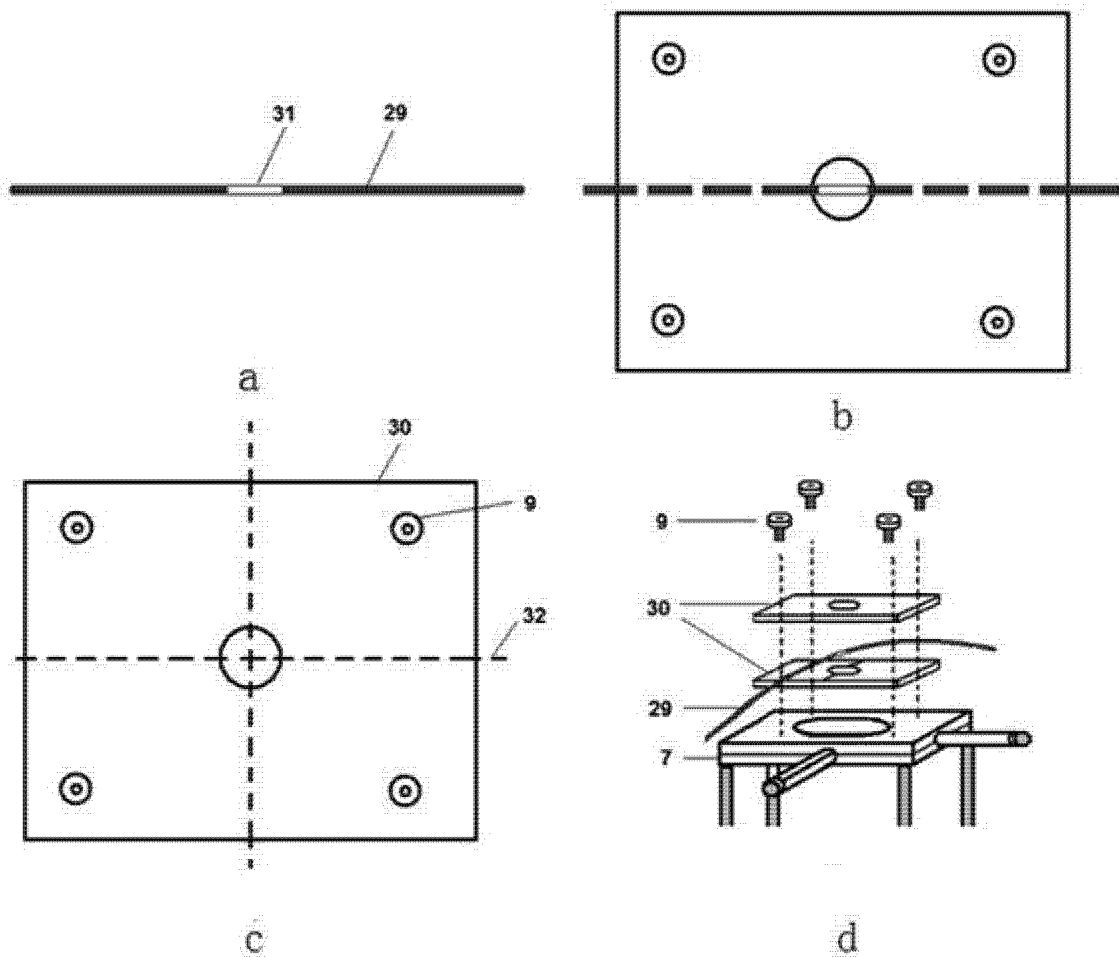


图 4



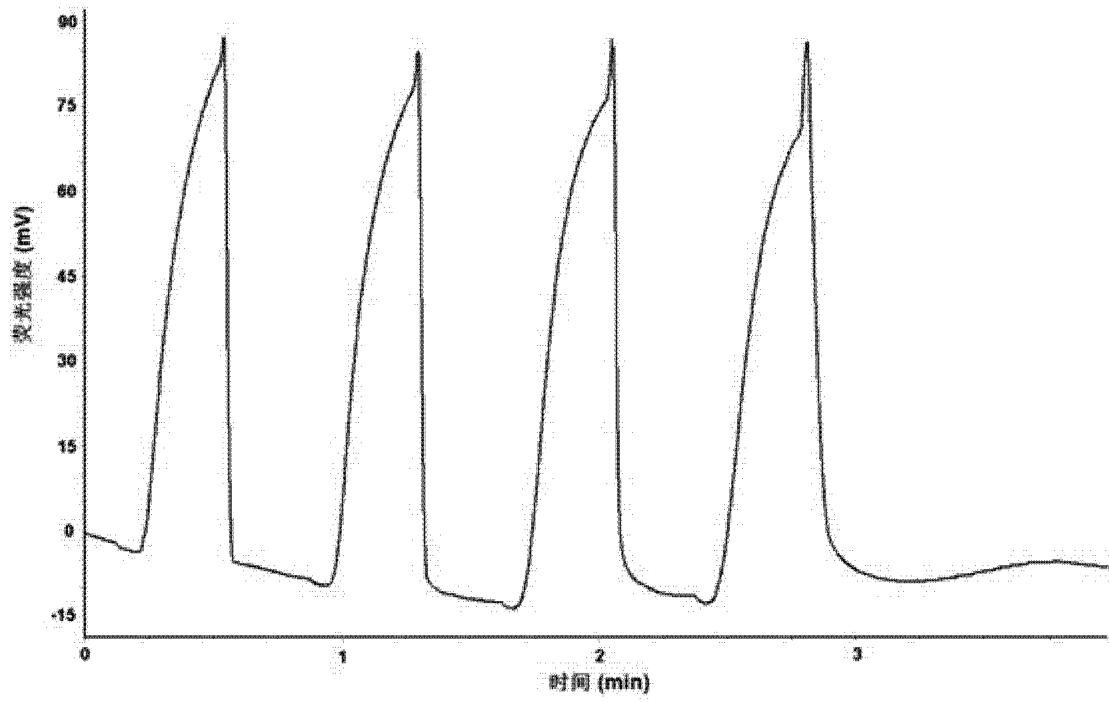


图 5

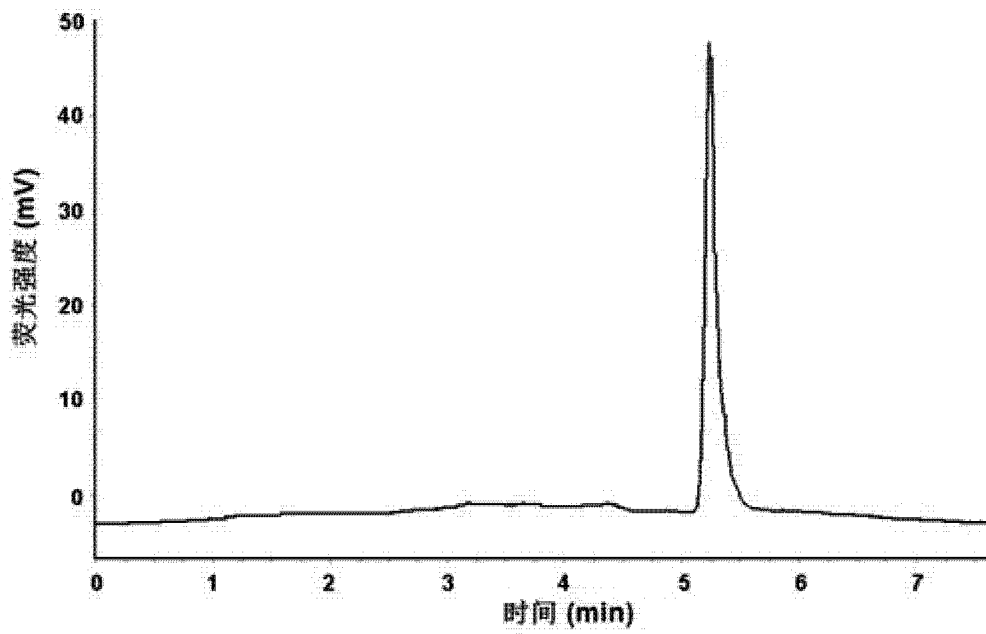


图 6