

刘婷婷, 屈渲婷

(厦门大学 机电系, 福建 厦门 361005)

摘要: 为了对AMI疑似患者进行现场快速筛查,研制了一款可对AMI荧光免疫层析试条进行定量、快速检测的仪器。该仪器主要由光路单元、数据采集单元、处理及显示单元组成,激发光聚焦于试条上产生荧光,荧光通过收集光路聚焦于线阵CCD,ARM9芯片通过CCD的灰度值对试条进行判断。测试结果表明,仪器检测得到试条的相对荧光强度与心肌标志物浓度成正比,该仪器可实现对患者心肌标志物浓度的定量检验,为患者病情的诊断和康复提供了有力保证。

关键词: 荧光免疫层析试条; 试条检测; 荧光激发收集; 线阵CCD

中图分类号: TN710-34; TP212.3

文献标识码: A

文章编号: 1004-373X(2013)15-0095-04

Development of quantitative testing instrument for fluorescence immunochromatographic strip

LIU Ting-ting, QU Xuan-ting

(Department of Mechanical and Electrical Engineering, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: An instrument was designed for achieving quantitative and fast detection on acute myocardial infarction (AMI) fluorescence immunochromatographic strip to conduct on-site and rapid screening for patients with suspected AMI. The instrument consists of optical elements, data acquisition unit, processing and display unit. The excitation light is focused on the strip to produce fluorescence, which will be focused on linear array CCD through collecting light path afterwards, and then the ARM9 chip is used to judge the strip through the gray value of CCD. The test results indicate that the relative fluorescence intensity on strips detected by the instrument is in direct proportion to cardiac biomarker concentrations. This instrument can achieve quantitative detection on cardiac biomarker concentrations of patients, which provides a strong guarantee for the diagnosis and rehabilitation of patients.

Keywords: fluorescence immunochromatographic strip; testing-strip detection; fluorescence excitation and collection; linear array CCD

0 引言

急性心肌梗死(Acute Myocardial Infarction, AMI)是一类由于冠状动脉急性闭塞,导致血流骤减而引起心肌细胞缺氧性坏死的疾病,其发病率和死亡率在全球居高不下。每年由AMI引起的死亡人数占心血管疾病死亡人数的一半以上。近年来研究发现AMI患者在发病前一周左右,血液中的心肌标志物浓度会产生变化:如肌钙蛋白(CTn-I)、心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)^[1-2]。AMI的治疗时间十分重要,早发现并实施院前急救是降低死亡率极为重要的环节,也是提高再灌注率和成功率的关键^[3]。

目前,用于心肌标志物的即时检验方法主要是胶体金免疫检测技术:使用胶体金作为标记物,标记物与待

测物的络合物被相应的配体捕获而浓集显色,以纤维膜上显色带的有无进行定性检测^[4]。但胶体金标记利用静电吸附,在液相中稳定性较差,已标记上的蛋白质分子容易脱落,并且具有产品质量相差大,不宜质控,不能确保质量等缺点^[5]。

近几年出现的荧光免疫层析技术,结合纳米技术,定向标记技术、生物膜技术、横向流体技术及荧光检测技术,采用化学偶联方法标记抗体,具备了胶体金检测产品原有的优势,也克服了其固有缺陷,其灵敏度高、特异性强、且能够定量反应血液中心肌标志物的浓度。目前,福建泰普生物科学有限公司已成功研制出针对该心肌标志物检测的荧光免疫层析试条,本文针对该试条研制了一款可在现场进行快速、准确、定量检测的仪器。

1 试条检测原理

试条结构如图1所示。本文主要对荧光免疫层析

试条进行检测。其工作原理为:将一定量患者的血液滴加在样品垫上,血液通过层析作用向前移动,溶解结合垫上固化的标记试剂后与之反应。当血液移动至抗原的检测带时,待测物和试剂的复合物与之发生特异性结合后被截留,结合物在检测线上富集,附着的结合物含量与样品中待测物含量成正比。该结合物具有如下特性:在紫外光的激发下,能激发产生 615 nm 的红光。当激发光波长为 330 nm 时,激发效率最高,反应结合物的激发光谱及荧光光谱如图 2 所示。激发光饱和时,激发产生的荧光强度与试条上富集的反应结合物数量成正比。

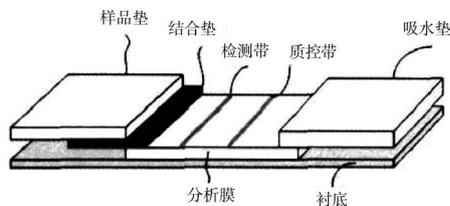


图1 荧光免疫层析试条

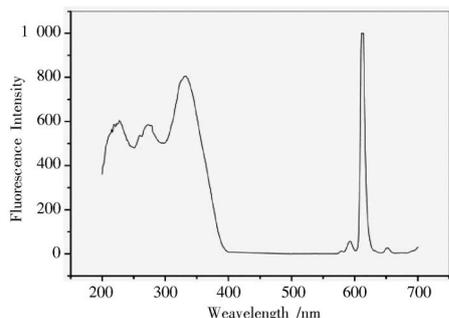


图2 反应结合物的激发光谱

往试条样品垫滴入血液样品后,在 330 nm 激发光激发下,试条产生的荧光情况如图 3 所示。图 3(a) 为样品中待测物质含量较高时的发光情况;图 3(b) 为样品中待测物质含量较低时的发光情况;图 3(c) 检测带无荧光,质控带发荧光,为样品中无待测物质的发光情况;图 3(d) 检测带发荧光,质控带无荧光,为试条失效的情况。在试条有效的情况下(图 3(a)~图 3(c)),可以通过检测质控带和检测带中反应生成的结合物的数量,即检测质控带的荧光发射强度($OD_{质控带}$)与检测带的荧光发射强度($OD_{检测带}$),通过二者的比值 $\frac{OD_{检测带}}{OD_{质控带}}$,定量检测血液样品所含心肌标志物的浓度。

2 系统设计

2.1 检测原理及仪器整体设计

仪器要求:将定量的患者血液滴加在试条的样品垫上后,将试条插入检测仪器中,便可得到患者心肌标志

物的浓度,对患者的病情做出判断。

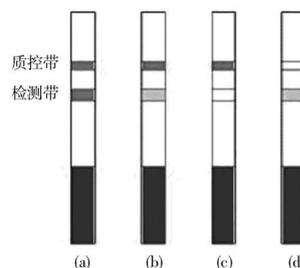


图3 试条荧光激发情况

仪器的本质:检测质控带及检测带的荧光强度。选择合适的激发光源,设计相应的激发光路,将激发光聚焦在试条上,测试带及质控带产生的荧光通过荧光收集光路,聚焦在线阵 CCD 上,将光信号转换为电信号。通过建立测试数据与被测样品浓度一一对应的数学模型,将荧光密度的比值转换为患者血液中该心肌标志物的浓度,并显示输出。

该仪器的组成主要包括以下三个部分:光学单元(包括紫外激发光路、荧光采集光路)、光电转换单元、信号处理及显示单元。下面将对以上三个单元具体说明。

2.2 光学单元设计

光学系统所要完成的功能是:波长为 330 nm 的紫外光通过激发光路聚焦于试条上的检测带和质控带,使反应结合物产生荧光,受激产生的荧光通过荧光收集光路聚焦于线阵 CCD 上。激发及荧光收集光路的效率、灵敏度直接决定着检测结果的准确性。

2.2.1 激发光路要求

如图 1 所示,荧光免疫层析试条的规格如下:检测带、质控带宽 1 mm,长 4 mm,检测带与质控带之间间隔 2 mm。只需用一个波长为 330 nm,尺寸略大于 4 mm×4 mm,有足够光强的紫外光斑照射该试条,便能使试条的检测带和质控带被完全覆盖,二者被完全激发,产生荧光。

由于 LED 具有功耗低、发光寿命长、光强稳定(在恒流供电的情况下)等优点,仪器选用中心波长为 330 nm 的紫外 LED 作为激发光源。其发光功率为 0.2 W,发射角度为 120°,发光晶片规格为 1 mm×1 mm。由于所选用的紫外 LED 功率较小(高功率的紫外 LED 价格十分昂贵),且发射角度较大,此紫外激发光路具有高效的聚光能力。

2.2.2 荧光检测光路要求

检测带、质控带受激产生的荧光强度较弱,且是根据二者的荧光相对强度来判断病情,因此,要求荧光收集光路要高效的收集效率、高灵敏度及一定的空间分辨率。

2.2.3 光路设计

设计的光路如图 4 所示。光路由椭球透镜 L_1 、石英平凸透镜 L_2, L_3, L_4 、二向色镜 L_5 、滤光片 L_6 组成。二向色镜 L_5 将紫外激发光路(由 L_1, L_2, L_3, L_4 构成)和荧光收集光路(由 L_3, L_5, L_4, L_6 构成)结合起来,整个光路更紧凑,缩小了光学单元的体积。

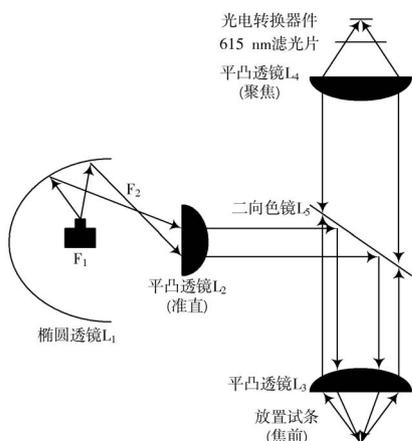


图 4 光路原理图

光路说明:椭球反射镜 L_1 起聚光作用。选择合适的椭球反射镜,将紫外 LED 放在椭球反射镜 L_1 的第一焦点 F_1 上,则 LED 发出的大部分光可聚焦在椭球反射镜的第二焦点 F_2 上^[9];平凸透镜 L_2 起准直作用。其焦距为 f_2 , F_2 即是椭球透镜的第二焦点,也是平凸透镜 L_2 的焦点,透过 L_2 的光将平行射出;二向色镜起分光作用。选择分光波长为 350 nm 的二向色镜,小于 350 nm 的波长将发生反射,大于 350 nm 的波长将透过。在此光路中二向色镜可将紫外激发光反射,将红色荧光透射;透镜 L_3 对紫外激发光的聚焦作用。其焦距为 f_3 , L_2, L_3 两块透镜构成一个比例成像光路,该光路的放大比例 K 由 L_2, L_3 的焦距决定,即 $K = f_3 / f_2$ 。选择合适焦距的透镜,便可得到所需的光斑大小。同时,在荧光收集光路中透镜 L_3 起聚光及准直的作用。 L_3 与 L_4 也在荧光收集光路中构成一个比例成像光路。

2.3 光电转换单元

2.3.1 光电转换器件的选取

图像采集单元的主要作用是将荧光收集光路所采集到的光信号转换为电信号。仪器要求光电转换单元拥有较高的灵敏度及一定的空间分辨率,因此选用东芝的 TCD256ED 线阵 CCD 作为光电转换单元,该线阵 CCD 具有以下特点:具有 256 个像素,有效长度为 4.8 mm,每个像元的尺寸为 $18 \mu\text{m} \times 18 \mu\text{m}$,像元尺寸较大,适合弱光检测;光谱响应的峰值为 560 nm,615 nm 波长光的相对敏感度大于 90%,因此对收集的荧光可高效地进行光

电转换;质控带及检测带大小约 $4 \text{ mm} \times 4 \text{ mm}$,而线阵 CCD 的有效成像长度为 4.8 mm,因此上述荧光收集光路采用 1:1 的比例成像光路。

2.3.2 线阵 CCD 的驱动及数据采集模块

采用三星公司生产的 ARM9 芯片 S3C2440 作为主控芯片,对数据进行采集及处理,采用 CPLD 产生脉冲信号作为线阵 CCD 的驱动,原理图如图 5 所示。

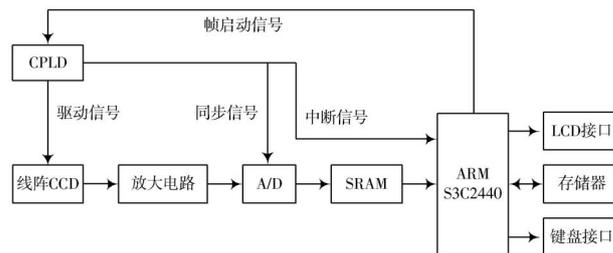


图 5 线阵 CCD 的驱动模块及图像采集模块

数据采集以帧为单位进行。单帧读入及处理过程如下^[7-9]:S3C2440 接收到键盘输入的采集信号时,S3C2440 发送帧启动脉冲给 CPLD;CPLD 接收到帧启动脉冲信号,产生线阵 CCD 驱动信号和 A/D 转换器的采样信号,使 CCD 与 A/D 转换器开始工作;从线阵 CCD 出来的模拟信号较微弱,经放大电路放大后,通过 8 位精度的 A/D 转换电路转换为数字信号;从 A/D 出来的数字信号存入 SRAM;一帧图像采集完毕,发送 INT 信号给 S3C2440,S3C2440 读取 SRAM,处理信号。

线阵 CCD 驱动电路是使用硬件描述语言在 CPLD (可编程逻辑器件)内部产生满足驱动时序要求的脉冲信号。驱动东芝 TCD1024ED 线阵 CCD 共需要 5 路驱动信号^[9],分别为:光积分脉冲 SH,两相电荷转移脉冲 P1、P2,复位信号 RS,钳位信号 CP,五个驱动信号只有彼此之间满足一定的时序和相位关系,X1024A 才能正常工作。驱动电路原理如图 6 所示^[10-11]。



图 6 线阵 CCD 驱动原理图

由于 CPLD 输出 3.3 V 的电平,而 CCD 需要 5 V 的驱动电压,因此采用 TI 公司生产的带三态输出的、8 位电平转换芯片 SN74ALVC4245,进行 3.3 V 电压向 5 V 电压的转换。

由于荧光比较微弱,在编写驱动时,可以通过延长积分时间,使每个 CCD 像元可以累积更多的电荷,提高系统检测弱光的能力。

2.4 信号处理及输出单元

S3C2440 同时作为信号的采集芯片及处理芯片。

信号处理流程图如图7所示。

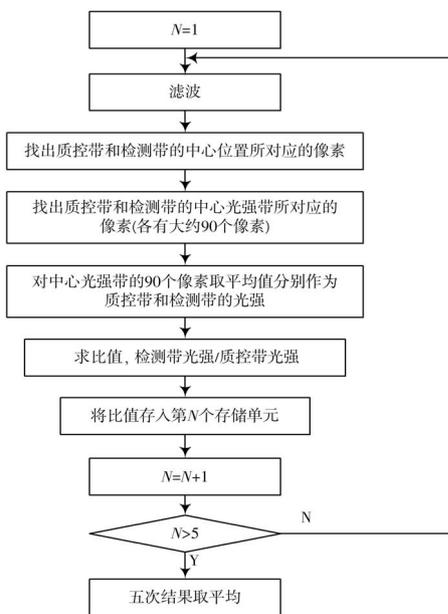


图7 信号处理流程图

2.5 系统标定

数据经 ARM9 处理后,得到检测带与质控带荧光发射密度的比值。采用实验的方法对仪器进行标定,建立检测结果与心肌标志物浓度的对应关系,通过曲线拟合的方法,得到荧光密度比与心肌标志物浓度的关系曲线,如图8所示,从而得到二者一一对应关系的数学模型。由检测得到的荧光比值便可确定出心肌标志物的浓度。

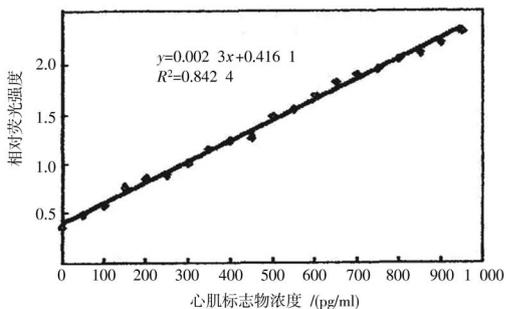


图8 荧光发射密度比值与心肌标志物浓度的对应关系曲线

3 实验结果及分析

本文采用福建泰普生物科学有限公司的荧光免疫层析试条以及厦门大学医学院提供的心肌标志物标准品,并将所述标准品稀释成 400 mIU/mL, 350 mIU/mL, 300 mIU/mL, 250 mIU/mL, 200 mIU/mL, 100 mIU/mL 等不同等级浓度的标准试液。取等量的试液分别滴加在试条上,并连续对每个试条进行 3 次测量,测试结果见表 1。

表1 实验结果

标准样品浓度 / (mIU/mL)	仪器测出浓度 / (mIU/mL)				相对误差 / %
	第一次测量	第二次测量	第三次测量	平均值	
400	388	389	388	388.3	2.93
350	340	340	341	340.3	2.77
300	292	293	293	292.6	2.47
250	244	244	244	244.0	2.36
200	195	197	197	195.7	2.15
100	98	99	98	98.6	1.4

由表1可知,随着标志物浓度的增强,仪器检测的相对误差增大,通常 AMI 患者心肌标志物的浓度小于 350 mIU/mL,因此该仪器的测量误差小于 2.77%,满足临床检测的要求。

4 结语

本文采用线阵 CCD 对荧光信号进行定量检测,设计了高效的紫外聚焦光路、荧光收集光路,采用 CPLD 产生 5 路脉冲对线阵 CCD 进行驱动,并且采用 ARM9 处理器采集及处理数据。最后通过系统标定,实现了样品中特定心肌标志物浓度的定量检测,为医学诊断提供了科学的依据。

参考文献

- [1] 陈莉莉,郭小梅,马业新,等.心型脂肪酸结合蛋白金标记免疫层析法的建立[J].临床检验杂志,2006(5):324-325.
- [2] 任玉国,任玉峰.肌钙蛋白试条快速检测急性心肌梗死的价值[J].中国煤炭工业医学杂志,2001(3):235-236.
- [3] 文秀兰,邹利群,马建英.130例急性心肌梗死患者院前急救时间延误分析[J].华西医学,2009,24(9):2438-2439.
- [4] 严华,申厚凤.胶体金免疫层析技术的应用与展望[J].微生物学免疫学进展,2005,33(3):86-89.
- [5] 刘艳,李君莲.免疫胶体金检验技术在应用中存在的问题[J].新疆医学,2011,41(3):47-49.
- [6] 卢健,周蕾,赵永凯,等.发光免疫试纸条扫描检测系统研究[J].光子学报,2006,35(4):6-7.
- [7] 刘蕾,周蕾,黄立华,等.基于一维 CCD 的免疫层析试纸条检测系统[J].仪器仪表学报,2007,28(2):246-251.
- [8] 白玉洁.胶体金试纸条的光电检测仪器研制[D].天津:天津大学,2008.
- [9] 邓华,方滨.基于 CPLD 技术的 CMOS 图像传感器高速采集系统[J].现代电子技术,2004,27(7):47-49.
- [10] 苏波,王纪龙.线阵 CCD 驱动电路的研究[J].山西师范大学学报,2002,16(1):13-18.
- [11] 王薇.基于 ARM 的线阵 CCD 数据采集系统研究[D].哈尔滨:哈尔滨工业大学,2006.

作者简介:刘婷婷 女,1992年出生,浙江嘉兴人。主要研究方向为测控技术。

屈渲婷 女,1993年出生,陕西西安人。主要研究方向为电气工程及其自动化。