

一种高精度的血液 C-反应蛋白浓度荧光检测系统*

汪鲁才¹ 王桃¹ 林海军¹ 李四美^{1,2}

(1. 湖南师范大学工程与设计学院 长沙 410081; 2. 永州工商职业中等专业学校 永州 425006)

摘要: 针对临床医学检测血液中 C-反应蛋白(CRP)浓度的精确定量需求,设计一种基于 STM32F429IGT6 处理器的 CRP 浓度荧光检测系统。介绍了系统基于荧光检测的工作原理和非线性浓度定量模型,详细阐述系统的软硬件设计,并采用商用检测仪器验证系统定量的准确性。实验表明:系统常规检测范围段误差小于 5% 重复性误差小于 3%,符合临床医学检测需求。

关键词: C-反应蛋白;STM32F429IGT6;荧光检测;定量模型

中图分类号: TH789 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 510

High-precision fluorescence detector for C-reactive protein in blood

Wang Lucai¹ Wang Tao¹ Lin Haijun¹ Li Simei²

(1. College of Engineering and Design, Hunan Normal University, Changsha 41008, China;

2. Yongzhou Industrial and Commercial Technical Secondary School, Yongzhou 425006, China)

Abstract: According to the precise quantitative requirements of clinical medicine field in CRP concentration of blood detection, a design of high-precision CRP fluorescent detector based on STM32F429IGT6 processor was introduced in this paper. Firstly, the working principle based on fluorescence immune-chromatographic technology and the nonlinear regression quantitative model that can achieve accurate quantitative detection were presented. Secondly, the hardware and software design of detector is described in detail. Finally, many test that has been verified by commercial detector have been done to show that the quantitative error is less than 5% and the repetition error is less than 3%, in line with the detection requirements of clinical medicine.

Keywords: CRP; STM32F429IGT6; fluorescence detection; quantitative model

1 引言

C-反应蛋白(C-reactive protein, CRP)是一种能与肺炎球菌细胞壁 C 多糖体结合的非抗体蛋白质,常作为判断机体炎症状况的标记,广泛应用于临床医学检测^[1]。近几十年国际医学界研究发现,CRP 浓度不仅反映机体炎症状况,还是冠心病、高血压、动脉粥样硬化等心血管类疾病的预警因子,定量检测其浓度,对预防和控制此类病情有积极意义^[2-4]。目前国内外市面上 CRP 检测仪主要采用 4 种方法:1)基于胶体金免疫层析法,该方法灵敏度低,检测范围小,常用于定性检测;2)基于酶联免疫法,该方法需保持酶活性,检测要求高,时间长,也常用于定性检测;3)基于放射免疫法,该方法以放射物为标记,稳定性差,存在放射危险和污染;4)基于化学发光法,该方法定量精确,但检测试剂价格昂贵^[5-7]。

针对上述检测方法的不足,本文实现的检测系统,采用在放射免疫法基础上改进的基于荧光检测的免疫方法。该法以荧光物取代放射物作为示踪标记,通过测量荧光标记被激发出的荧光光强,结合光强-浓度定量模型,实现 CRP 定量检测,克服放射免疫法稳定性差,标记物危害大的不足,检测稳定性好、精确度高^[8-9]。

2 CRP 荧光检测工作原理和浓度定量处理模型

2.1 CRP 荧光检测原理

CRP 荧光检测免疫法是利用免疫反应的特异性,结合层析技术和荧光示踪技术,实现 CRP 浓度定量检测。把检测目标 CRP 抗原对应的 CRP 抗体进行荧光标记,根据免疫反应的特异性,目标 CRP 抗原与荧光抗体反应形成荧光复合物,将复合物样本滴入检测条,如图 1 所示,经试纸分析膜层析作用,荧光复合物被分离在 T 带

收稿日期:2015-09

* 基金项目:国家自然科学基金资助项目(51205127)、湖南省研究生科研创新项目(CX2015B181)资助项目

处,游离荧光抗体在 C 带处,特定波长激发光扫描检测条,荧光标记被激发出荧光,血液样本 CRP 抗原浓度越高,T 带处激发出荧光越强,峰值越大,如图 2 所示,计算 T/C 峰面积比,参照光强-浓度定量模型,计算样本 CRP 浓度^[10-11]。

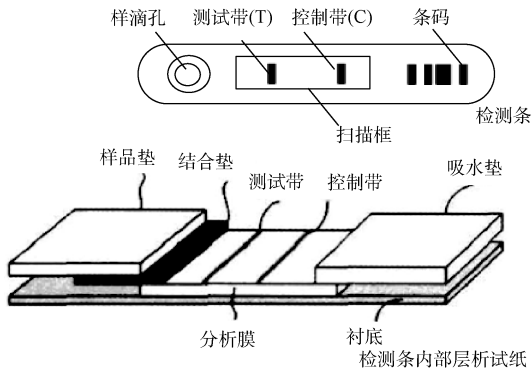


图 1 免疫层析试纸结构

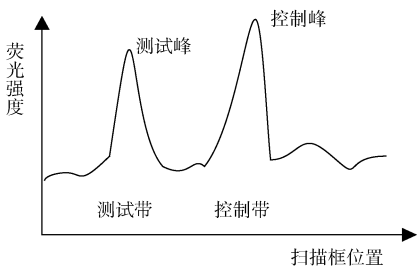


图 2 荧光曲线图

2.2 非线性回归荧光-浓度定量模型

不同 CRP 浓度, T/C 比不同, 由于传感器、放大器 etc 元器件达不到理想线性, 因此采用非线性回归拟合进行补偿, 浓度值 Z 和 T/C 值 H 之间的非线性关系, 即:

$$Z = f(H) \tag{1}$$

利用回归分析方法对式(1)进行非线性建模, 考虑系统计算复杂度和检测精度, 非线性模型采用一元三次多项式, 即:

$$Z = a_0 + a_1H + a_2H^2 + a_3H^3 \tag{2}$$

式中: $a_0 \sim a_3$ 为各多项式系数^[12]。

利用最小二乘法 (LSM), 解各系数 $a_0 \sim a_3$ 的值。系统共检测 N 个不同浓度的 C/T 比值数据作为样本点 (H_k, Z_k), $k=1, 2, \dots, N$, 标定值与所有样本均方差之和 $E(a_0, a_1, a_2, a_3)$, 即:

$$E(a_0, a_1, a_2, a_3) = \sum_{k=1}^N [Z_k - (a_0 + a_1H_k + a_2H_k^2 + a_3H_k^3)]^2 \tag{3}$$

利用多元函数求极值法, 式(3) $E(a_0, a_1, a_2, a_3)$ 最小时, 即可解系数 $a_0 \sim a_3$ 值, 即:

$$\frac{\partial E}{\partial a_0} = 0, \frac{\partial E}{\partial a_1} = 0, \frac{\partial E}{\partial a_2} = 0, \frac{\partial E}{\partial a_3} = 0 \tag{4}$$

$$\begin{cases} Na_0 + \sum_{k=1}^N H_k a_1 + \sum_{k=1}^N H_k^2 a_2 + \sum_{k=1}^N H_k^3 a_3 = \sum_{k=1}^N Z_k \\ \sum_{k=1}^N H_k a_0 + \sum_{k=1}^N H_k^2 a_1 + \sum_{k=1}^N H_k^3 a_2 + \sum_{k=1}^N H_k^4 a_3 = \sum_{k=1}^N H_k Z_k \\ \sum_{k=1}^N H_k^2 a_0 + \sum_{k=1}^N H_k^3 a_1 + \sum_{k=1}^N H_k^4 a_2 + \sum_{k=1}^N H_k^5 a_3 = \sum_{k=1}^N H_k^2 Z_k \\ \sum_{k=1}^N H_k^3 a_0 + \sum_{k=1}^N H_k^4 a_1 + \sum_{k=1}^N H_k^5 a_2 + \sum_{k=1}^N H_k^6 a_3 = \sum_{k=1}^N H_k^3 Z_k \end{cases} \tag{5}$$

从而,

$$\mathbf{A} = \mathbf{X}^{-1}\mathbf{Y} \tag{6}$$

式中: $\mathbf{A} = [a_0, a_1, a_2, a_3]^T$,

$$\mathbf{X} = \begin{pmatrix} N & \sum_{k=1}^N H_k & \sum_{k=1}^N H_k^2 & \sum_{k=1}^N H_k^3 \\ \sum_{k=1}^N H_k & \sum_{k=1}^N H_k^2 & \sum_{k=1}^N H_k^3 & \sum_{k=1}^N H_k^4 \\ \sum_{k=1}^N H_k^2 & \sum_{k=1}^N H_k^3 & \sum_{k=1}^N H_k^4 & \sum_{k=1}^N H_k^5 \\ \sum_{k=1}^N H_k^3 & \sum_{k=1}^N H_k^4 & \sum_{k=1}^N H_k^5 & \sum_{k=1}^N H_k^6 \end{pmatrix}$$

$$\mathbf{Y} = \begin{bmatrix} \sum_{k=1}^N Z_k & \sum_{k=1}^N H_k Z_k & \sum_{k=1}^N H_k^2 Z_k & \sum_{k=1}^N H_k^3 Z_k \end{bmatrix}^T$$

3 荧光检测系统硬件设计

3.1 系统总体硬件设计

系统总体框图如图 3 所示。CRP 荧光检测系统以 STM32F429IGT6 处理器为核心, USB 扫码设备、光电检测模块、机械运载模块、调理电路、AD 采样模块、EEPROM 卡、TFT 屏、客户端等构成外围系统。USB 条码设备扫描检测条码 ID, 便于处理器读取 EEPROM 卡中条码 ID 信息, 处理采样数据; 光电检测模块包括光源驱动、激光器、光电管等, 扫描检测条, 激发荧光转换成电信号; 机械运载模块包括电机驱动、步进电机, 驱动检测条, 完成荧光扫描; 调理电路完成信号放大、滤波、整流, 供 AD 模块采样数据; 处理器处理完采样数据, 输出结果到 TFT 屏, 或蓝牙传送到客户端。客户端 Android APP 自带 SQLite 数据库, 实现用户登录、分析显示、记录保存等功能。

3.2 光电检测模块硬件设计

系统采用时间分辨荧光合成纳米荧光微球标记 CRP 抗体, 该荧光标记被 340 nm 波长紫外光照射可辐射出 615 nm 波长红光, 斯托克斯位移达 275 nm, 容易排除自身荧光干扰。

根据荧光标记光谱特性, 设计光电检测模块结构如图 4 所示, UVLED 激光器发射中心波长为 340 nm 紫外光, 经滤光片 320~360 nm 范围带通滤光和分色镜反射后, 被凸

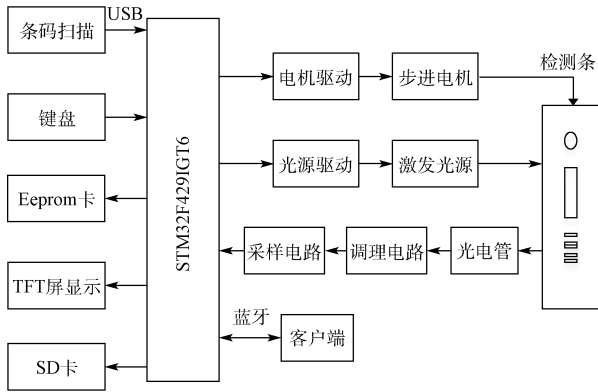


图3 系统总体设计框图

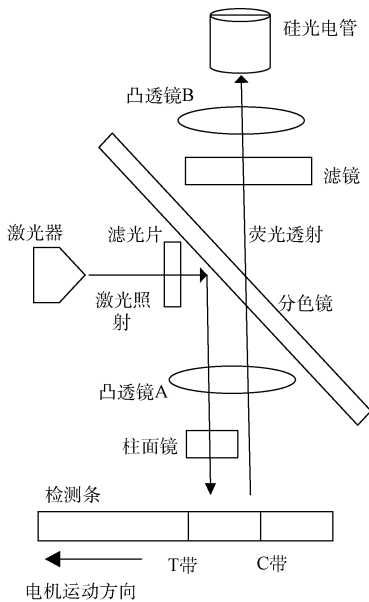


图4 光电检测模块结构

透镜 A 聚焦,并透过柱面镜形成线斑投射到检测条上,步进电机驱动检测条缓慢前进,T、C 带附近荧光标记被激发发出荧光,荧光透过凸透镜 A 平行射出,经分色镜透射和 600~620 nm 带通滤镜滤除杂光后,被凸透镜 B 聚焦到硅光电管接收面,转换为电信号,从而获得样本荧光曲线^[13]。系统 UVLED 采用 TH-UV340A-TO39,功耗低、光功率大,发光稳定、发射角度大。

3.3 光电检测模块驱动电路设计

系统采用输出连续可调电流的电流源驱动激光器发光,通过调节输出电流,控制激光器输出光功率,决定发出紫外光光强,方便不同 CRP 浓度检测。系统电流源驱动电路如图 5 所示,驱动电路主要由集成运放 U_1 、三极管 Q_1 、阻值相等的 R_1 、 R_2 、 R_6 和 R_4 精密电阻等构成,根据运放电路的虚短、虚断特性和 b 点的节点电流定律可知:

$$I_b = \frac{V_{in}}{R_5} + \frac{V_{in} - V_3}{R_6} \quad (7)$$

由于 $R_7 \gg R_5$,

$$I = \frac{V_{in}}{20} \quad (8)$$

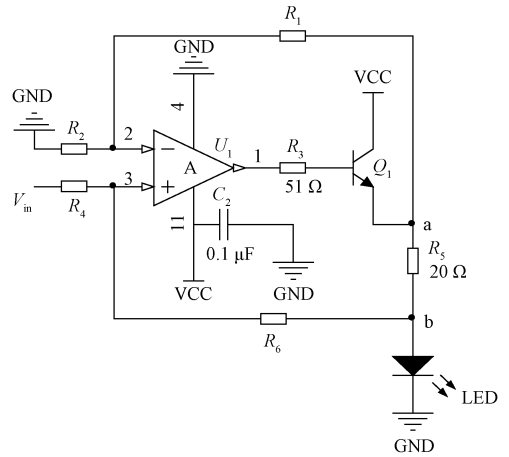


图5 电流源驱动电路

3.4 步进电机驱动电路设计

系统采用低振动两相四线 PK233Pa 电机驱动检测,步距角 1.8° ,驱动电路采用高细分芯片 A3967 设计,如图 6 所示。处理器控制信号 Motor_STEP、Motor_DIR、Motor_MEN 经三路光耦传送 A3967 芯片,控制电机的 PWM、运动方向和使能,避免干扰,提高信号安全性;MS1、MS2 为电机细分逻辑口,控制电机步进细分模式,OUT1A、OUT2A、OUT1B、OUT2B 连接步进电机两相四线输出,驱动电机步进转动。本系统采用全桥驱动连接方式,可得到较大的输出电流,提高工作效率,精细的步进控制,保证检测的稳定性。

3.5 信号调理电路设计

系统调理电路主要包括放大电路、低通滤波电路和精密整流电路。放大电路采用 AD620 仪用放大器设计,增益大,低频特性好,共模抑制比高,提高了系统信噪比和抑制零漂;并采用四阶巴特沃斯低通滤波器对放大信号滤波,有源滤波器有较理想输入输出阻抗,不需阻抗匹配,可直接级联,调节桥臂电阻大小可进行不同频率的电路增益补偿,为了保证信号稳定性,系统滤波后还进行了精密整流,确保 A/D 采样数据的准确性^[14-15]。

4 CRP 荧光检测软件设计

系统的荧光检测功能主要由 STM32 软件编程实现,其检测流程如图 7 所示,系统上电初始化,激光器、步进电机试运行自检,USB 条码设备扫描检测条条码 ID,处理器通过 I²C 总线从 EEPROM 中获取 ID 信息,开始控制光电模块和机械运载荧光检测,荧光信号经放大、滤波、整流等调理,A/D 模块采样 500 数据点,处理器调用 ID 信息处理采样数据,并结合非线性荧光-浓度定量模型,计算出 CRP 浓度,输出检测结果到 TFT 屏或传送到用户客户端,并保

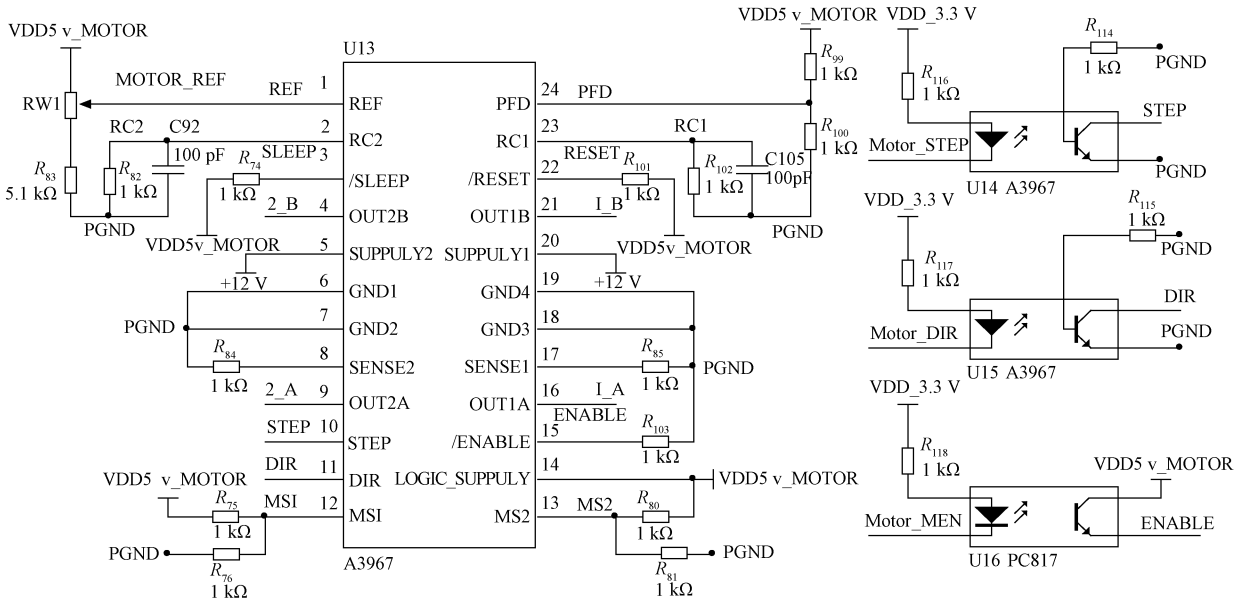


图 6 步进电机驱动电路

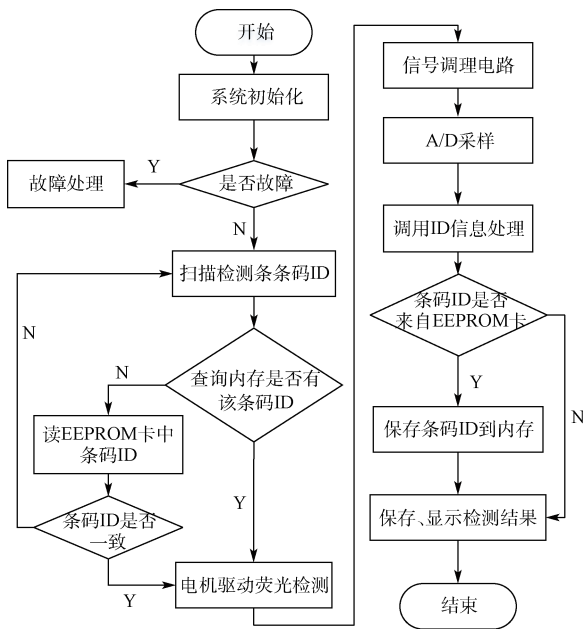


图 7 软件检测流程

来小量误差,临床常规检测范围 7~25 mg/L 内,系统的定量误差小于 5%,重复性误差小于 3%,表明系统定量精度高,稳定性好。

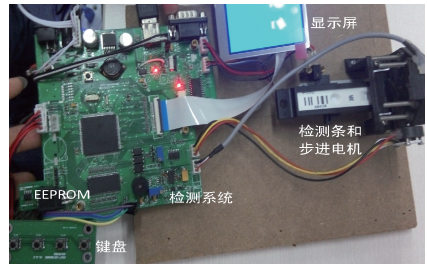


图 8 系统检测平台

表 1 系统试验测试表

| 样本浓度/ (mg·L ⁻¹) | 系统荧光检测 | | | | 万孚飞测 检测/ (mg·L ⁻¹) |
|--------------------------------|---------|--------------------------------|----------------------|------------|--------------------------------------|
| | T/C | 检测结果/ (mg·L ⁻¹) | 变异系 数 C.V/ (%) | 误差/ (%) | |
| 1 | 0.433 8 | 0.9 | 6.91 | 10 | 0.75 |
| 4 | 0.685 6 | 3.79 | 3.58 | 5.25 | 3.58 |
| 7 | 0.936 6 | 6.85 | 1.36 | 2.14 | 6.63 |
| 10 | 1.179 5 | 9.84 | 0.93 | 1.61 | 9.53 |
| 13 | 1.407 2 | 12.83 | 0.72 | 1.3 | 12.51 |
| 16 | 1.612 5 | 15.91 | 0.60 | 0.56 | 15.78 |
| 19 | 1.788 2 | 19.18 | 0.95 | 0.95 | 19.08 |
| 22 | 1.927 1 | 22.39 | 1.34 | 1.78 | 22.26 |
| 25 | 2.022 1 | 24.37 | 1.85 | 2.53 | 24.01 |
| 26.5 | 2.05 | 25.75 | 3.90 | 2.92 | 25.51 |

存记录包内存,采用循环覆盖的方式,保存最新 50 条 ID 信息和 100 条检测记录。

5 系统实验结果

系统实验平台如图 8 所示。为验证定量准确性,在 1~27 mg/L 范围内,每 3 mg/L 配置浓度样本,每种浓度重复检测 15 次,取平均作为检测结果,用变异系数 C.V 反应检测重复稳定性,同时采用广州万孚科技的飞测荧光检测仪验证,结果如表 1 所示。由于实验条件限制,低浓度样本本身浓度误差大,检测结果不可避免存在小量误差;高浓度样本液,因荧光复合物富集较多,部分复合物被覆盖,也带

6 结 论

设计一种基于 STM32 处理器的 CRP 定量检测系统,采用荧光免疫层析法检测,鲁棒性好,精确度高,量程范围 1~27.0 mg/L,定量误差控制在 5% 以内,满足临床检测要求,配有 Android 客户端,可用于家庭医疗,方便用户查看、管理个人检测记录。整个系统性能稳定、成本偏低、功耗小,目前在尚飞科技(湖南)进一步优化,前景广阔。

参考文献

- [1] 吴卫华,陈佳,张鹏飞,等.量子点荧光免疫渗滤法定量检测血清 C 反应蛋白的研究[J].国际检验医学杂志,2014,35(11):1471-1473.
- [2] 童海,涂玉林.高敏 C 反应蛋白与动脉粥样硬化[J].中国动脉硬化杂志,2010,18(9):746-750.
- [3] 张晓东.血清脂蛋白 CysC Hcy 及 hs-CRP 水平变化与动脉粥样硬化性疾病的相关性分析[J].山西医学杂志,2015,44(24):2853-2855.
- [4] TENNENT G A, HUTCHINSON W L, KAHAN M C, et al. Transgenic human CRP is not pro-atherogenic pro-atherothrombotic or pro-inflammatory in apoE(-/-)mice[J]. Atherosclerosis, 2008,196(1):248-255.
- [5] 任冰强,黄立华,黄惠杰.基于免疫层析技术的时间分辨荧光免疫分析仪研究[J].仪器仪表学报,2009,30(6):1330-1335.
- [6] 王淑杰.基于光电检测技术的 C 免疫反应蛋白检测仪研制[D].杭州:浙江大学.2013.
- [7] 刘鑫.荧光免疫层析分析仪的设计分析[J].生命科学仪器,2015,13(6)23-26.

- [8] 刘婷婷.荧光免疫试条定量检测仪的研制[J].现代电子技术,2013,36(15):95-98.
- [9] 曹明勤.基于 STM32 的荧光分析仪的软件设计[D].杭州:杭州电子科技大学,2014.
- [10] 谢梦圆,张军,谷稳,等.便携式定量荧光免疫分析仪[J].仪表技术与传感器,2014(12):25-29.
- [11] 熊有郑,闵小平,葛胜祥,等.基于嵌入式 Linux 的扫描式荧光检测仪的实现[J].工业控制计算机,2013,26(9):9-13.
- [12] 林海军,李松辉,汪鲁才,等.基于交流阻抗的掺杂煤炭快速识别方法[J].电子测量与仪器学报,2015,29(4):577-583.
- [13] 刘翔,杜民,李玉榕,等.荧光免疫层析定量检测系统的设计与实现[J].电子测量与仪器学报,2013,27(9):859-866.
- [14] 汪鲁才,刘国峰,林海军.基于 MSP430F449 的掺假煤炭快速检测系统设计[J].传感器与微系统,2014,33(8)97-101.
- [15] 刘岩俊.基于 DSP 的嵌入式温度测量系统设计与实现[J].国外电子测量技术,2014,33(1)78-81.

作者简介

汪鲁才,1969 年出生,博士,教授,主要研究方向为计算机视觉与嵌入式系统。

E-mail:705343406@qq.com

王桃,1989 年出生,硕士,主要研究方向为物联网与嵌入式系统开发。

E-mail:wangtao82011@163.com