

DOI:10.19651/j.cnki.emt.2105753

## 基于时间分辨荧光微球的免疫层析分析仪设计\*

刘艳萍<sup>1</sup> 杨光光<sup>2</sup> 何海英<sup>2</sup> 陈锐彬<sup>1</sup>

(1. 广东工贸职业技术学院 广州 510510; 2. 佛山科学技术学院 佛山 528000)

**摘要:**为解决荧光免疫分析灵敏度低,线性范围窄等问题,设计一款基于免疫层析技术和时间分辨荧光微球的免疫层析分析仪。该系统以荧光层析试剂卡为检测对象,标记物为时间分辨荧光微球。仪器的激发光源为单色LED(340 nm),通过光电二极管检测试剂卡T线和C线上荧光微球发出的荧光,结合标准浓度曲线即可计算出待测物的浓度。经实验测试,仪器在0.5~200 mg/mL范围内具有良好的线性,线性相关系数为 $R^2=0.9988$ ;仪器精密度良好,台内CV小于1%,台间CV小于2.5%。仪器操作简单,检测快速,可广泛应用于POCT、毒品检测、食品安全检测等领域。

**关键词:**时间分辨荧光微球;免疫层析分析仪;光学检测;曲线拟合

**中图分类号:** R446.1; R446.6 **文献标识码:** A **国家标准学科分类代码:** 310.6110

## The design of immunochromatography analyzer based on time-resolved fluorescence microparticles

Liu Yanping<sup>1</sup> Yang Guangguang<sup>2</sup> He Haiying<sup>2</sup> Chen Ruibin<sup>1</sup>

(1. Guangdong Polytechnic of Industry and Commerce, Guangzhou 510510, China;

2. Foshan University, Foshan 528000, China)

**Abstract:** In order to solve the problems of low sensitivity and narrow linear range of fluorescence immunoassay, an immune analyzer based on immunochromatography assay and time-resolved fluorescence microparticles was designed. In the system, the detection object is the fluorescent reagent card, the marker of which is the time-resolved fluorescence microparticles. The excitation light is monochromatic LED (340 nm). The fluorescence emitted by the fluorescence microparticles on the T line and C line of the reagent card is detected by photodiode. The concentration of the measured substance can be calculated using the fluorescence value together with the standard concentration curve. The results show that the immune analyzer shows up good linearity in the range of 0.5~200 mg/mL, with linear correlation coefficient  $R^2=0.9988$ . The precision of the immune analyzer is also pretty good since the instrument CV is generally less than 1%, and the inter-instrument CV is no more than 2.5%. The merit of simple operation and fast detection allows the immune analyzer to be applied in a wide range of fields, such as the POCT, drug detection, food safety detection and so on.

**Keywords:** time-resolved fluorescence microparticles; immunochromatography analyzer; optical detection; curve fitting

## 0 引言

免疫层析技术(immuno chromatography assay, ICA)是建立在层析技术和抗原-抗体特异性免疫反应基础上的一项免疫检测技术<sup>[1-4]</sup>。传统免疫层析技术使用胶体金作为标记物,通过条带显示实现对目标物定性检测或半定量分析,胶体金法虽然简单快捷,但灵敏度较差,难以准确定量<sup>[5-7]</sup>。

荧光免疫层析技术(fluorescence immuno chromatography

assay, FICA)的标记物主要有荧光素、量子点、上转换纳米微粒等,相对于胶体金,灵敏度有了极大地提高,可以对目标物进行定量检测,同时又保留了传统胶体金试纸条的现场快速检测优点,成为提高免疫层析方法检测性能的主要途径之一<sup>[8-9]</sup>。

时间分辨荧光免疫分析法(time-resolved fluoro immuno assay, TRFIA)是20世纪80年代初在传统荧光免疫分析的基础上创立的一种新型非放射性标记免疫分析技术<sup>[10-12]</sup>,以镧系元素螯合物为标记物,具有低背景、高特

收稿日期:2021-01-27

\* 基金项目:广东省青年创新人才项目(自然科学)(2018GkQNCX055)资助

异性、高灵敏度和线性范围大等优点<sup>[13-14]</sup>,但操作繁琐,易造成污染,限制了其应用领域。

21 世纪以来,随着生物技术和纳米技术的进步,不断有一些新的标记纳米材料被开发。时间分辨荧光微球的出现,促进镧系元素螯合物与免疫层析技术的融合,形成一种新兴免疫检测技术,即时间分辨荧光免疫层析技术,它具有高灵敏度和现场快速定量检测的特点,很快成为国内外研究的新热点<sup>[15-17]</sup>。

即时检测(point-of-care testing, POCT),指在病人旁边进行的临床检测,通常不一定是临床检验师来进行,是体外诊断行业的细分领域<sup>[18-19]</sup>。POCT 的特点是检测快速、操作简便、应用范围广。POCT 在我国起步较晚,目前整体市场规模约占到体外诊断市场的 10% 以上,增速超过 25%,在高等级医院突破、基层下沉两端都大有空间<sup>[20-21]</sup>。在我国,POCT 产品主要包括心脏标志物、感染性疾病、妊娠/排卵、凝血、糖尿病等类别,大部分产品还处于导入和成长期。

目前市面上的 POCT 产品存在检测灵敏度不高、精密程度差、台间差异大等缺点。为解决 POCT 产品存在的这些问题,本文在研究时间分辨荧光微球特征和层析试剂卡原理的基础上,进行了精密的光学设计、稳定的机械传动和孵育温度设计,优化了曲线拟合算法、人机交互界面和检测场景。最终,实现一款基于时间分辨荧光微球的免疫层析分析仪,该分析仪具有精密度高、线性范围大、操作简单、检测快速等特点。

## 1 设计基础

### 1.1 时间分辨荧光特性

时间分辨荧光微球以镧系元素(常见  $\text{Eu}^{3+}$ )螯合物作为荧光标记物,每个微球中可包裹成千上万个螯合物分子,大大提高了荧光的标记效率,有效提高了分析灵敏度。时间分辨荧光微球相比于普通荧光微球具有以下特点<sup>[22]</sup>:

1) 较普通的红色或绿色荧光微球,荧光强度更高。

2) Stokes 位移大(大部分在 250 nm 以上),如图 1 所示,较普通荧光微球(30~60 nm)要大。Stokes 位移大可以降低光路设计的难度,有效降低激发光对发射光的干扰,提高信噪比。

3) 荧光寿命长,抗干扰能力强。时间分辨荧光寿命通常在 100  $\mu\text{s}$  以上,较普通荧光微球的荧光寿命高。在信号检测时,通过延迟采样时间,可以有效避开非特异性荧光(样本中蛋白质荧光,寿命 1~10  $\mu\text{s}$ )对测量结果的干扰。

4) 稳定性好,时间分辨荧光通常使用镧螯合物作为标记物,镧螯合物的稳定性较普通荧光高,批间差异更小。

### 1.2 时间分辨荧光层析试剂卡

时间分辨荧光层析试剂卡的一般结构如图 2 所示,主要包括样本垫、结合垫、硝酸纤维素膜、检测线(T 线)、质控线(C 线)、吸水垫、塑料基板等部分<sup>[23-24]</sup>。其中,T 线和 C

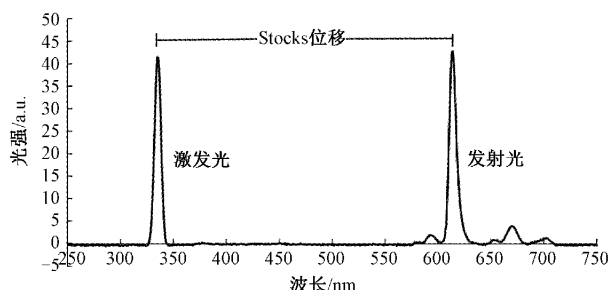


图 1 镧系元素的 Stokes 位移示意图

线固定在硝酸纤维素膜上,包被有特异性的固相抗体(或抗原)。结合垫上喷制有特异性荧光微球。样本检测时,样本溶液通过毛细作用在层析试剂卡上泳动,首先与特异性荧光微球发生免疫反应,特异性地形成标记抗体-待测物的结合物(或标记抗原-待测物的结合物)。经层析,该结合物可以被 T 线的固相抗体(或抗原)捕获,从而在 T 线处形成荧光标记信号,该标记信号的强度与待测物的浓度相关。C 线作为对照线,也会发生特定的免疫反应而形成荧光标记信号,用于衡量样本的层析效果。多余的标记抗体等,则在层析的作用下,最终被吸水垫吸收。

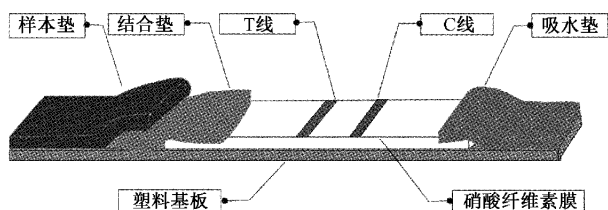


图 2 时间分辨荧光层析试剂卡

## 2 仪器设计

### 2.1 光学检测设计

光学检测是本系统的核心。光学检测采用激发光路和发射光路共焦的方式,通过二向分色镜将激发光和发射光分开<sup>[25-26]</sup>,如图 3 所示。

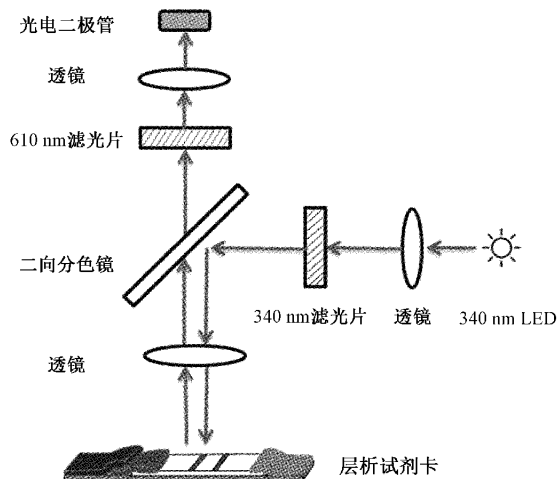


图 3 光学检测设计

铈螯合物的峰值激发波长约为 340 nm,峰值发射波长约为 613 nm。本系统选用小角度、波长 340 nm 的单体 LED 作为激发光。LED 产生的激发光经过透镜进行准直,然后通过窄带滤光片(中心波长 340 nm,半波带宽 9 nm)选出 340 nm 的紫外光,利用二向分色镜对光进行反射,最后通过聚焦透镜将激发光聚焦到层析试剂卡上。

在激发光的照射下,层析试剂卡发射出峰值波长为 610 nm 的荧光,荧光首先经过透镜准直,然后透射通过二向分色镜,通过窄带滤光片(中心波长 610 nm,半波带宽 10 nm)保留 613 nm 的特异性荧光,最后由聚焦透镜将荧光聚焦到光电二极管的感光面上。光电二极管将光信号转换为电信号,然后经过电路放大,最后通过模数转换芯片(ADS8866)转换为数字信号。

二向分色镜与激发光路呈 45°角放置,反射激发光,最低反射率大于 95%;透射发射光,最低透射率大于 90%,截止深度 OD3,如图 4 所示。

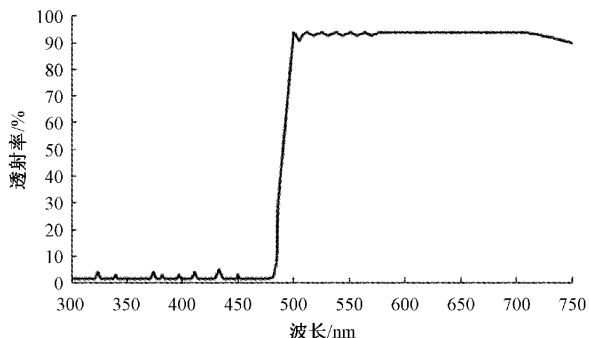


图 4 二向色镜透过率曲线

## 2.2 硬件设计

本系统硬件主要包含两部分:核心板及其周边模块、控制板及其周边模块,图 5 为仪器功能框图。

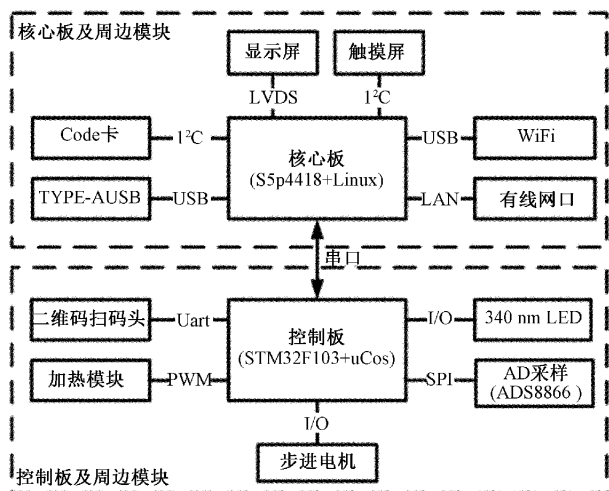


图 5 仪器功能框图

核心板使用 S5P4418 内核,运行 Linux 操作系统,主要负责人机交互,包括图形界面显示、触屏控制;通过 I²C 接

口读取 Code 卡数据,Code 卡中存储着待测物质的曲线拟合数据;TYPE-A USB 用于连接 U 盘进行数据导出和软件升级,也可以连接键盘和鼠标;WiFi 和有线网口可以连接医院的 LIS 系统,下载病人信息,上传测试结果。

控制板使用 STM32F103,运行 uCos 操作系统。负责控制 340 nm LED 和荧光光强采样;驱动扫码头,扫描试剂卡上的二维码,识别待测项目和生产批次;控制步进电机,传动试剂卡进仓和出仓,以完成采样和扫码;驱动加热模块,达到指定的孵育温度。

一个稳定高精度的传动机构是采集荧光信号的关键。传动机构一般由步进电机驱动,主流的二相步进电机的步距角为 1.8°,为提高转动精度,需要对步角距进行细分。TMC2130 是一款用于两相步进电机的高性能驱动器 IC,最高分辨率每步完成 256 微步,stealthChop 模式可实现极其安静的操作和平稳运动。工作时,电机转动带动丝杆,将角速度转化为线速度,完成对试剂卡 T 线和 C 线的扫描和荧光信号采集。T 线和 C 线宽度约 1 mm,为保证足够的荧光信号分辨率,电机运动速度要保证每毫米不少于 50 个采样点。

精确的孵育温度是本系统设计的一个难点,它直接影响系统的精密度。试剂进行免疫反应需要一个稳定的孵育温度(37 °C±1 °C),且需要在 50 s 内达到此目标温度。而试剂卡在仪器内处于一个相对开放的环境,会大大增加设计难度。本系统使用陶瓷加热片对试剂卡背部进行加热,通过热传导将热量传递到试纸条,并在不同的环境温度下(仪器工作温度范围 10 °C~30 °C),构建不同的加热功率曲线,以达到系统对孵育温度的要求。

## 2.3 操作流程

图 6 为仪器实物图,仪器前端有 Code 卡(左侧)和试剂卡(中间)的插卡位,Code 卡和试剂卡要保证批次一致。

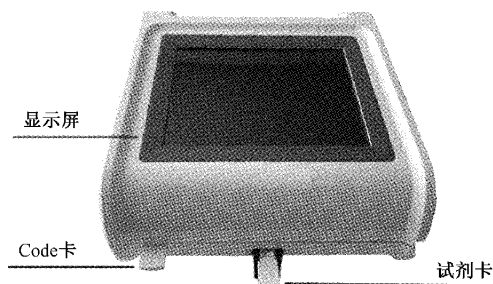


图 6 仪器实物图

启动测试前,仪器需从 Code 卡中读出批次信息和标准浓度曲线,每批次只需要读取一次。样本测试时,操作者将滴加了样本的试剂卡插进卡槽,并通过操作界面启动测试,试剂卡在电机的传动下进入仪器内部,剩下的测量步骤由仪器自动完成,仪器工作流程如图 7 所示。

仪器有两种工作模式:标准模式和快捷模式。标准模式是指将样本滴加到试剂卡后,插入仪器内孵育,孵育指定时间后,再开始荧光检测。快捷模式是指试剂卡在仪器外孵育,仪器仅完成荧光测量,整个检测过程小于 10 s。

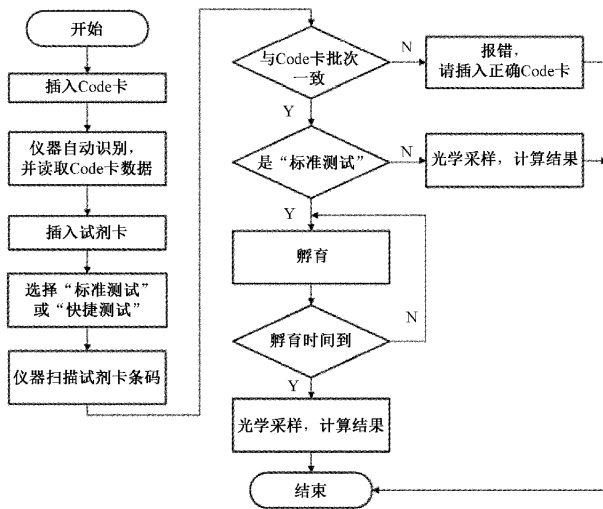


图 7 仪器工作流程

### 3 数据处理

#### 3.1 数据预处理

样本检测时, 每张试剂卡采集 800 点, 绘制成波形如图 8 所示, 横坐标为采样点序号, 纵坐标为 AD 采样值。在 T 线和 C 线处形成两个波峰, 将两个波峰值分别记做 T 和 C, 二者的比值(T/C)与待测项目的浓度具有相关性。

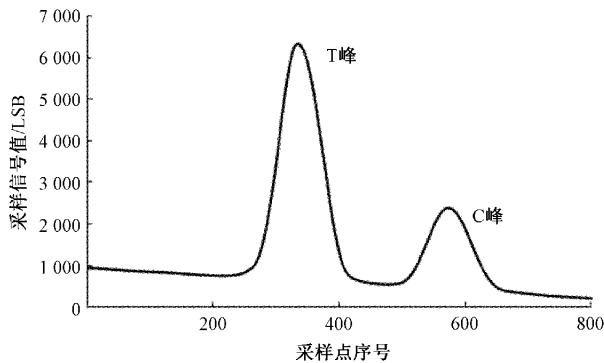


图 8 正常采样数据波形

由于试剂卡的层析效果受硝酸纤维素膜、荧光微球、检测项目等多种因素的影响, 采样波形的基线会存在一定的漂移, 如图 9 所示。这种情况下, 使用 T/C 求解待测物质的浓度, 会造成测量结果的偏差, 而且低浓度梯度分不开, 影响检测灵敏度。因此, 为了提高检测准确度和灵敏度, 必须消除基线的影响, 也就是去本底。

为了消除本底对测试结果的影响, 将 T/C 修正为  $(T - B_1)/(C - B_2)$ , 其中  $B_1$  为 T 峰对应的本底,  $B_2$  为 C 峰对应的本底。

$$B_1 = \frac{b_0 + b_1}{2} \quad (1)$$

$$B_2 = \frac{b_2 + b_3}{2} \quad (2)$$

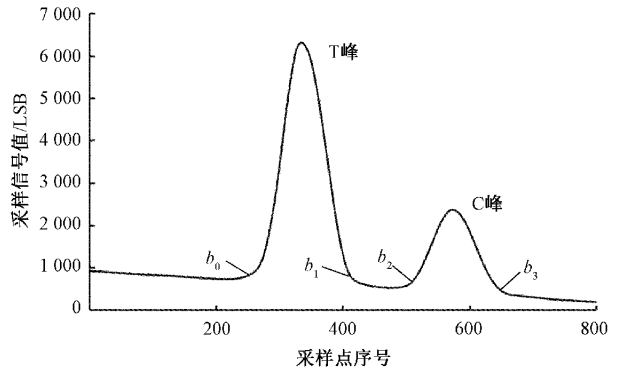


图 9 基线漂移波形

式中:  $b_0$  是 T 峰的上升沿起始位的采样值;  $b_1$  是 T 峰的下降沿结束位的采样值;  $b_2$  是 C 峰的上升沿起始位的采样值;  $b_3$  是 C 峰的下降沿结束位的采样值。  $b_0, b_1, b_2$  和  $b_3$  通过一阶求导, 结合阈值判定得到。利用修正后的计算公式, 可以有效解决基线漂移对测量的影响, 提高测量准确度和灵敏度。

#### 3.2 曲线拟合

使用仪器对样本待测物质进行荧光检测后, 得到的是  $(T - B_1)/(C - B_2)$  值, 如何求解待测物的浓度, 就要用到拟合算法。

在实验室, 将一系列已知浓度标准品加到试剂卡上进行反应, 得到浓度和  $(T - B_1)/(C - B_2)$  值的对应关系, 然后建立函数关系, 即曲线拟合。得到拟合曲线后, 再以此计算样本中待测物质的浓度。

反应中待测物质和免疫反应之间的关系一般是非线性的, 选择合适的模型, 可以提高曲线拟合绘制的准确度, 从而获得较为准确的待测物质浓度。本仪器提供了多种拟合算法: 三次样条插值法、多项式法、四参数法、Logit-Log 转换等, 可根据待测物质、检测方法、试剂反应趋势选择合适的拟合算法。

### 4 仪器性能测试

#### 4.1 线性范围检测

为了评估仪器性能, 在 T 线处喷制不同浓度的荧光微球, 制作出 L1~L9 标准卡, 如表 1 所示。

表 1 标准卡测试结果

试剂卡编号	荧光微球浓度 ( $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )	测试结果 ( $(T - B_1)/(C - B_2)$ 值)
L1	0.5	0.017
L2	1	0.033
L3	2	0.069
L4	4	0.129
L5	8	0.253
L6	16	0.567
L7	32	1.009
L8	64	1.955
L9	200	5.745

使用仪器测试 L1~L9 标准卡,对测试结果进行线性拟合,如图 10 所示,得到线性方程  $y=0.0314x+0.003$ ,线性相关系数  $R^2=0.9988$ 。可见,在荧光微球浓度 0.5~200 mg/mL 范围内,仪器具有良好的线性响应。

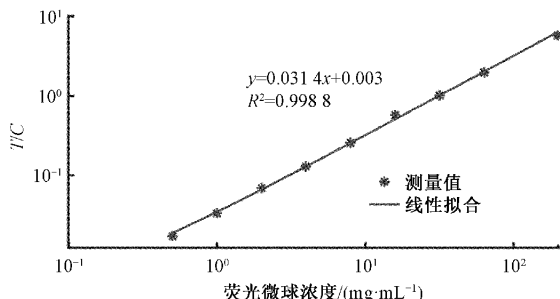


图 10 不同浓度荧光微球测试结果曲线

#### 4.2 仪器精密度的

使用仪器对 L1~L9 标准卡进行重复测量,每张卡重复测量 10 次,分别计算变异系数(coefficient of variation, CV),用于评价仪器的精密度的。

$$CV = \frac{SD}{Mean} \times 100\% \quad (3)$$

式中:SD 为标准偏差,Mean 为平均值。图 11 为精密度的测量结果,高浓度的 CV 优于低浓度的 CV, CV 值均小于 1%,说明仪器具有良好的精密度的。

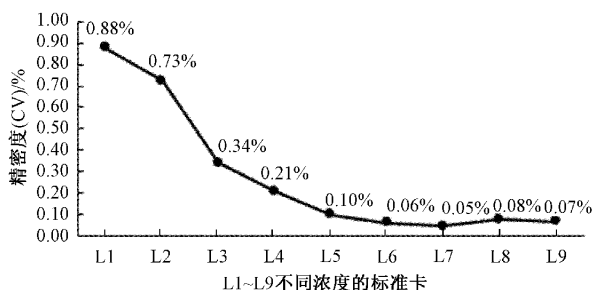


图 11 精密度的测试结果

#### 4.3 仪器台间差的

选取 10 台仪器,每台仪器使用每张标准卡各完成 10 次测量,然后各自计算平均值。对比 10 台仪器的平均值,计算变异系数 CV,如图 12 所示。10 台仪器的台间 CV 在 2.5%以内,具有良好的台间差的。

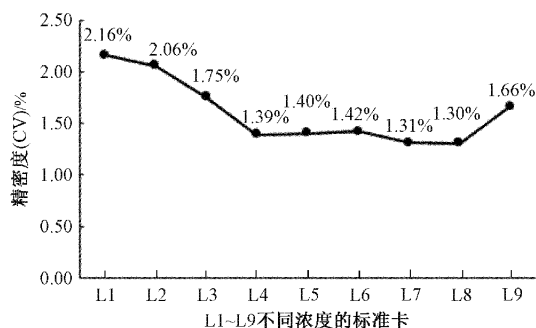


图 12 台间差的测试结果

#### 4.4 小 结

本系统可实现免疫定量检测,线性范围大、灵敏度高,相对于胶体金和彩色胶乳免疫层析法高 1~3 个数量级。同时,解决了传统的 DELFIA 法(解离增强镧系元素荧光免疫检测)只能在液相中、而不能在固相中反应的问题,操作简单,更容易实现自动化操作,非常适合 POCT 应用场景。

#### 5 结 论

本文介绍了一种基于时间分辨荧光微球的免疫层析分析仪,它使用单色 LED 作为激发光源,光敏二极管作为探测器,通过检测层析试剂卡上的时间分辨荧光微球发射出的荧光,并结合标准浓度曲线,可计算出待测物的浓度,从而实现定量分析。仪器具有良好的线性范围、精密度和台间差。仪器操作简单,检测快速,非常适用于 POCT。同时,仪器具有检测原理的通用性,可扩展应用于时间分辨荧光层析法的其他应用领域,如毒品检测<sup>[27]</sup>和食品安全检测<sup>[28]</sup>等。

本文介绍的免疫层析分析仪只有一个检测通道,后续可向多通道、可扩展方向进行研究,以满足不同规模的卫生机构对检测通量的需求。同时,增加设备互联功能,借助云端数据和网络化管理,可针对特定场景进行不同功能模块的配置,增强检测数据的可追溯性,简化报告及数据传输工作,对于提升医院管理效率具有重要意义。

#### 参考文献

- [1] BERNASCONI L, OBERLE M, GISLER V, et al. Diagnostic performance of a SARS-CoV-2 IgG/IgM lateral flow immunochromatography assay in symptomatic patients presenting to the emergency department[J]. Clinical Chemistry and Laboratory Medicine(CCLM), 2020, 58(9): e159-e161.
- [2] LI R J, ZHANG X Y, YANG CH, et al. Development of a colloidal gold-based immunochromatographic assay for the rapid detection of edwardsiella ictaluri[J]. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2018, 18(6): 3800-3805.
- [3] LI B B, SONG J ZH, CHEN J L, et al. Novel immunochromatography assay based on background fluorescence quenching for the sensitive determination of serum cystatin C[J]. Analytical Letters, 2019, 52(8): 1340-1351.
- [4] 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.
- [5] 周梦婕,李小盼,代荣阳,等. 免疫层析试纸条检测技术的研究进展[J]. 检验医学与临床, 2019, 16(22): 3382-3386.
- [6] 王寅彪,刘肖,李青梅,等. 免疫层析试纸条检测技术研究

- 进展[J]. 河南科技大学学报(医学版), 2017, 35(3): 236-240.
- [7] 庞润, 程文播, 钱庆, 等. 一种智能手机读取免疫层析试纸的新方法[J]. 电子测量技术, 2020, 43(6): 105-109.
- [8] WEN L Y, ZHU P, LIU Y J, et al. Development of a fluorescence immunochromatographic assay for the detection of zeta globin in the blood of (SEA)  $\alpha$ -thalassemia carriers [J]. Blood Cells, Molecules & Diseases, 2012, 49(3-4): 128-32.
- [9] 任志奇, 吴英松, 刘天才. 新型免疫层析技术的研究进展[J]. 广东医学, 2013, 34(2): 312-314.
- [10] 解肖鹏, 张雷. 时间分辨荧光免疫分析技术的研究进展[J]. 食品与药品, 2012, 14(5): 203-206.
- [11] 刘寰曦, 王弼陡, 罗刚银. 基于 ARM 的荧光定量分析仪设计[J]. 电子测量技术, 2018, 41(13): 139-144.
- [12] DING L, CHEN Q, FAN W T, et al. Application of a time-resolved fluoroimmunoassay for detection of p16INK4a in cervix [J]. Annals of Diagnostic Pathology, 2017, 29: 7-10.
- [13] 李登红, 陆建伟, 王洪涛, 等. 基于时间分辨免疫荧光法与电化学发光法对降钙素原检测项目的临床一致性评价[J]. 医疗装备, 2020, 33(1): 42-44.
- [14] 王泽洲, 吴俊清, 张永宁, 等. 时间分辨荧光免疫分析技术的研究进展[J]. 四川畜牧兽医, 2015, 42(7): 34-37.
- [15] ETVI J, TIINA M, TEPPON S, et al. Performance of fluorescent europium (III) nanoparticles and colloidal gold reporters in lateral flow bioaffinity assay [J]. Analytical Biochemistry, 2012, 428(1): 31-38.
- [16] LIANG R L, XU X P, LIU T C, et al. Rapid and sensitive lateral flow immunoassay method for determining alpha fetoprotein in serum using europium (III) chelate microparticles-based lateral flow test strips[J]. Analytica Chimica Acta, 2015, 891: 277-283.
- [17] 郭明明, 周衍, 周剑波, 等. 荧光微球时间分辨免疫层析技术定量检测甲胎蛋白的研究[J]. 免疫学杂志, 2015, 31(10): 897-901.
- [18] STROMER A, ROSE R, SCHAFFER M, et al. Performance of a point-of-care test for the rapid detection of SARS-CoV-2 antigen [J]. Microorganisms, 2020, 9(1): 58-58.
- [19] COLLOPY K T, KIVLEHAN S M, SNYDER S. What's the point of point-of-care testing? Understanding the potential of this evolving capability [J]. EMS World, 2014, 43(2): 34-42.
- [20] 邓均, 宋世平, 郑峻松. 我国 POCT 发展现状与展望[J]. 临床检验杂志, 2015, 33(11): 844-845.
- [21] 黄德智, 蒲晓允. 免疫层析技术的发展及在 POCT 中的应用[J]. 国际检验医学杂志, 2019, 40(5): 594-597.
- [22] 梁荣良, 吴英松. 镧系元素在免疫学检测技术中的应用[J]. 现代免疫学, 2015, 35(4): 348-352.
- [23] 李启欣, 梁指荣, 汤永平, 等. 血清淀粉样蛋白 A 免疫荧光层析法的建立[J]. 热带医学杂志, 2017, 17(9): 1152-1155, 1163.
- [24] 朱利国, 邹贤, 范俊, 等. 甲状腺激素荧光免疫层析定量检测技术的研制及应用研究[J]. 现代免疫学, 2018, 38(1): 31-35.
- [25] 张巍巍, 程浩, 肖慧荣, 等. 荧光式传感技术研究进展[J]. 仪器仪表学报, 2020, 41(4): 1-13.
- [26] 任郁苗, 吉智. 生物芯片检测系统设计[J]. 国外电子测量技术, 2020, 39(11): 122-126.
- [27] 韩军, 李伟, 李彬, 等. 毛发中痕量毒品快速检测技术解析[J]. 警察技术, 2019(4): 82-84.
- [28] 李向梅, 刘志威, 陈晓敏, 等. 食品安全免疫层析检测技术研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2020, 11(15): 4939-4955.

#### 作者简介

刘艳萍, 硕士, 讲师, 主要研究方向为智能控制技术与仪器、自动化仪表与检测系统。

E-mail: 841083418@qq.com

杨光光, 博士, 副教授, 主要研究方向为智能算法理论和

E-mail: 240991183@qq.com