

文章编号 1004-924X(2017)03-0584-07

便携式上转换荧光试纸条检测仪的研制

董国亚¹, 赵翔¹, 张燕³, 孙传强^{2*}

(1. 河北工业大学 电气工程学院, 天津 300401;

2. 天津大学 精密仪器与光电子工程学院, 天津 300072;

3. 天津科技大学 食品工程与生物技术学院, 天津 300457)

摘要: 为了实现对上转换荧光试纸条的定量检测, 研制了便携式上转换荧光试纸条检测仪, 并通过实际测试验证了仪器的主要性能。首先, 介绍了上转换荧光技术以及上转换荧光试纸条的测试原理, 描述了以光学扫描检测系统和电路系统为核心的便携式荧光试纸条检测仪的设计方案, 能够将试纸条的荧光信号转变为电信号并进行处理; 然后, 基于设计方案研制了检测仪样机, 并对实际检测试纸条采集到的信号进行优化; 最后, 对检测仪的性能进行了测试。测试结果表明: 仪器稳定、重复性好, 样本检测标准差小于 0.004; 线性响应特性良好, 拟合出的浓度标准曲线决定系数为 0.996 3。该检测仪结构精巧、功耗低、性能良好, 很好地满足了上转换荧光试纸条定量检测的需求。

关键词: 上转换荧光技术; 光学扫描; 标准曲线拟合; 定量检测; 低功耗

中图分类号: Q503; TH744.5 **文献标识码:** A **doi:** 10.3788/OPE.20172503.0584

Development of portable up-conversion photoluminescence strip detector

DONG Guo-ya¹, ZHAO Xiang¹, ZHANG Yan³, SUN Chuan-qiang^{2*}

(1. School of Electrical Engineering, Hebei University of Technology, Tianjin 300401, China;

2. School of Precision Instrument & Opto-Electronics Engineering,
Tianjin University, Tianjin 300072, China;

3. College of Food Engineering and Biotechnology,
Tianjin University of Science & Technology, Tianjin 300457, China)

* Corresponding author, E-mail: suncq@tju.edu.cn

Abstract: A portable up-conversion fluorescent strip detector was developed to achieve the quantitative analysis of the up-conversion fluorescent strip. The performance of the detector was verified by practical measurements. The up-conversion fluorescent technology and the principle of up-conversion fluorescent strip were introduced firstly. The up-conversion fluorescent strip detector contained two critical components that were optical scanning system and electrical system, enabling the conversion of fluorescence signals to electric signals. Then, the prototype of the detector was developed and tested experimentally, therein the sampled signals detected by the strip were optimized. This apparatus proves great stability and repeatability, and the standard deviation of the detection is less than 0.004.

收稿日期: 2016-08-01; **修订日期:** 2016-09-06.

基金项目: “十二五”国家科技支撑计划基金资助项目 (No. 2013BAD18B11); 高等学校博士科学点专项基金资助项目 (No. 20130032110057); 河北省高等学校科学技术研究项目 (No. QN2014072); 河北省高等学校创新团队领军人才培育计划资助项目 (No. LJRC003)

The linear response characteristic is also excellent as the coefficient of determination of concentration standard curve reaches 0.996 3. This detector has a low power consumption and high performance with an exquisite structure, thus satisfying the requirements of quantitative analysis through up-conversion fluorescent strip.

Key words: up-conversion fluorescence technique; optical scanning; standard curve fitting; quantitative detection; low power consumption

1 引言

上转换荧光物质与常见的“被高能光激发,发射出低能光”的荧光物质不同,它“被低能光激发,发射出高能光”,其本质是一种反斯托克斯发光,即吸收低能量的长波长红外光子,当能量积累到一定程度时,发射出高能量的短波长可见光光子。上转换荧光检测技术以上转换荧光物质微粒作为标记物,光学稳定性好,而且吸收光和发射光的波长带宽窄、差距大,不易互相干扰,便于提取有用信号。与放射性同位素标记、酶标记和化学发光标记等传统发光检测技术相比,上转换荧光技术具有灵敏度高、选择性好、无本底干扰、无淬灭、不损伤样本等优点,克服了放射性污染、酶不稳定且灵敏度差、化学发光重现性差等缺点^[1-7]。近年来,上转换荧光技术在生物学、医学和生命科学领域的细胞成像、组织及活体成像等方面取得了大量的研究成果。同时,以该技术为核心的免疫层析试纸条应运而生,并发展成为一种简便、高效、低成本的检测方法,用于体外诊断、食品安全(农、兽药残留、真菌病毒)检测等领域^[7-8]。上转换荧光试纸条检测法与传统的胶体金试纸条法相比,误差和本底干扰更小,灵敏度可高出1~2个数量级^[9],更适合于定量检测,或将成为快速检测的主流方法。成熟的试纸条定量检测仪对于推动该检测方法的发展尤为重要。德国 Qiagen 公司的 ESEQuant Lateral Flow 荧光读数仪能够发射多种波长的激发光,通过一组共焦透镜系统可以检测上转换荧光试纸条;然而该仪器生产工艺复杂、价格高,仪器设计存在专利壁垒且配套程序相对封闭,因此不适用于科学研究。国内方面,北京热景生物技术有限公司的 UPT-3A 上转换发光免疫分析仪和北京倍肯公司的 BK-iQM 型食品安全质量检测仪均可用于检测上转换荧光试纸条,但它们都为台式仪器,体积较大。目前,市场上还

没有专门用于上转换荧光试纸条检测的便携式仪器。研究人员通常自行搭建检测平台,手动调节激发光与检测部件,因此很难保证平台的重复性与稳定性。

本文研制了一台便携式上转换荧光试纸条检测仪器。该仪器通过光电元件检测上转换荧光试纸条的荧光强度,得到对应的电信号值,并根据内置算法来反演计算被测物质的浓度,从而实现定量检测。该仪器结构精巧、成本低,并内置可充电电池,无需交流供电,符合小型化及便携式的特点。

2 上转换荧光试纸条

上转换荧光试纸条采用间接竞争法检测^[5],其结构如图1所示。样品垫、结合垫、NC膜、检测线(T线)、质控线(C线)以及吸水垫固定于支持板上,其中结合垫中布置带有上转换荧光标记物的抗体,T线处固定有包被抗原,C线处固定有二抗。检测时将被测物溶液滴加在样品垫处,溶液在吸水垫的虹吸作用下,通过NC膜向前层析。层析时结合垫上带荧光标记物的抗体被溶解一并向前涌动,流过T线和C线最终到达吸水垫。被测物作为抗原,在层析过程中与T线处固定着的包被抗原竞争结合带有荧光标记物的抗体,和包被抗原结合的标记物抗体将留在T线处,其余物质继续向C线流动,而C线处固定着的二抗会直接与标记物抗体结合^[8-9]。

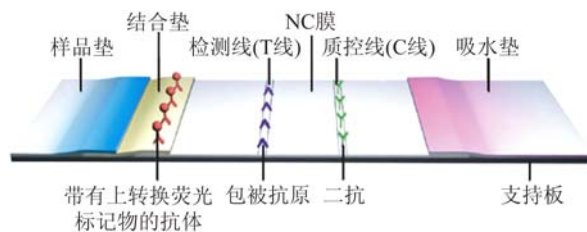


图1 上转换荧光试纸条结构示意图

Fig. 1 Schematic diagram of up-conversion photoluminescence strip

间接竞争法决定了 T 线的荧光强度与待测样品的浓度成反比,而质控带光强不受样品浓度的影响。一般采用 T 线信号与 C 线信号的比值 (T/C) 作为判断待测物样本浓度的依据^[8]。这样既避免了试纸条个体差异造成的误差,又极大地消除了仪器使用环境(如环境温度、湿度、供电电压等)对检测结果的影响。

本检测仪采用的上转换荧光试纸条标记物利用 980 nm 的红外光激发,可产生峰值波长为 540 nm 的绿色荧光。理想状态下,试纸条被红外光照射时,T 线和 C 线会出现两条绿色荧光带,而其他位置不发光。

3 检测仪设计

3.1 整体设计

该检测仪的设计基于上转换荧光原理,激发并检测已上样试纸条的荧光信号,然后通过处理该信号来实现被测物浓度的反演计算。

便携式上转换荧光试纸条检测仪主要包括光学扫描检测系统和电路系统两部分,具有友好的人机交互及扩展功能^[10-14]。

3.2 光学扫描检测系统

光学扫描检测系统负责激发并扫描检测已上样试纸条的荧光信号,该系统的设计符合便携式、小型化的要求,能够高效率地工作,其结构如图 2 所示。该系统的激发光源单元与荧光信号采集单元的光学中心汇聚于一点,位于试纸条上。在步进电机的带动下,试纸条匀速平移过该汇聚点。激发光源单元激发试纸条上的荧光标记物,同时荧光信号采集单元检测荧光的光强,完成对试纸条的扫描。

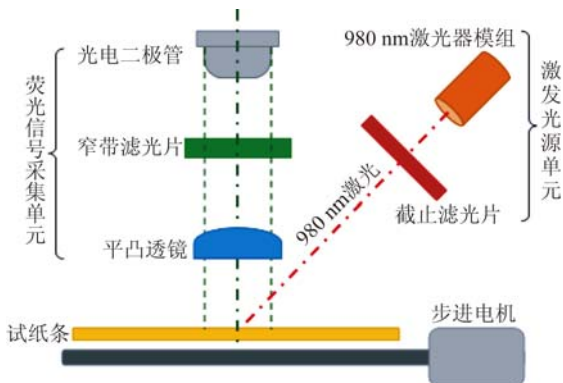


图 2 光学扫描检测系统结构

Fig. 2 Schematic diagram of optical scanning system

激发光源单元由 980 nm 激光器模组和长波通截止滤光片组成,用于激发试纸条上的荧光标记物。长波通截止滤光片的透过率曲线如图 3 所示,其截止波长为 950 nm,在通带波长范围内,其透过率可达到 90%。虽然荧光在 980 nm 处的激发效率最高,但此单元并未选用中心波长为 980 nm 的窄带滤光片,是因为窄带滤光片的通带透过率通常低于截止滤光片。截止滤光片不但能在输出同等强度激光的同时降低激光器模组的功率,而且能极大地滤除激光器模组对荧光信号的杂光干扰。

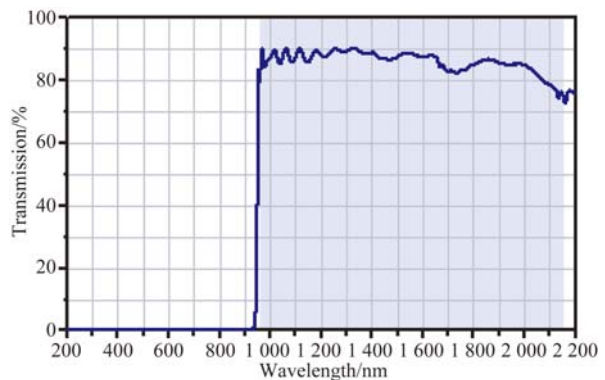


图 3 长波通滤光片透过率曲线

Fig. 3 Spectral transmission curve of long pass filter

平凸透镜、窄带滤光片和光电二极管组成了荧光信号采集单元。平凸透镜可以放大荧光光斑,便于信号检测。窄带滤光片的透过率曲线如图 4 所示,其通带中心波长约为 543 nm,半峰高 10 nm,峰值透过率为 54%,作用是保留波长在 540 nm 附近的绿色荧光信号并滤除其它波长的杂光干扰。荧光最终由光电二极管检测,光信号被转换为电信号。

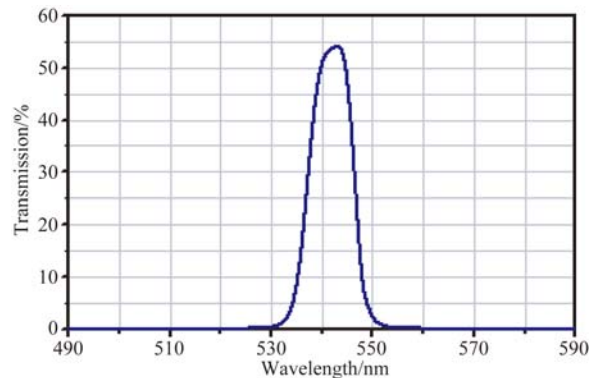


图 4 窄带滤光片透过率曲线

Fig. 4 Spectral transmission curve of bandpass filter

3.3 电路系统

电路系统由一个可充电电池驱动,保证检测仪的正常运行。该系统包括电机驱动单元、信号放大转换单元、中央处理器、存储单元、触控屏接口、打印机接口以及 Wi-Fi 模块接口,如图 5 所示。本检测仪选用 LPC2366 型芯片作为中央处理器,在其支配下,电机驱动单元驱动步进电机工作,带动试纸条完成扫描。信号放大转换单元先将光电二极管输出的电信号放大,再将该模拟量转变为数字量,供中央处理器处理。存储单元用于保存检测记录。触控屏接口、打印机接口和 Wi-Fi 模块接口用于实现连接人机交互及扩展功能。

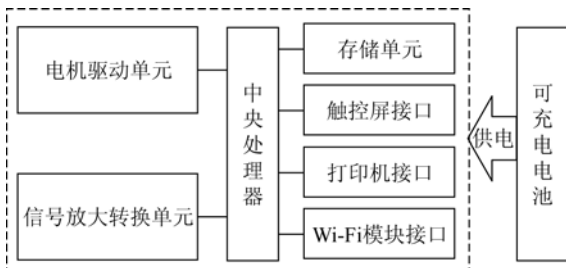


图 5 电路系统功能模块图

Fig. 5 Block diagram of electrical system

3.4 人机交互及扩展功能

本文所述仪器除了提供试纸条检测这一核心功能外,还具备检测信息存储、历史记录查询、检测结果打印和上传备份数据等附加功能。人机交互系统由 QT Creator 编写,界面如图 6 所示。



图 6 部分人机交互界面

Fig. 6 Parts of user interfaces

4 检测结果的处理与分析

4.1 检测结果处理

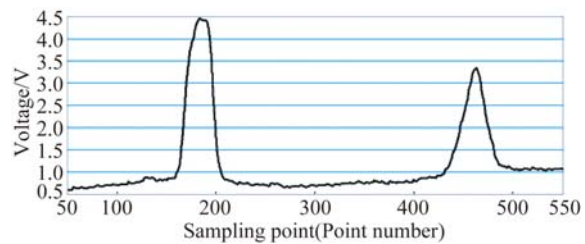
根据检测仪设计,完成了便携式上转换荧光试纸条检测仪的研制,样机如图 7 所示。



图 7 便携式上转换荧光试纸条检测仪样机外观及内部结构

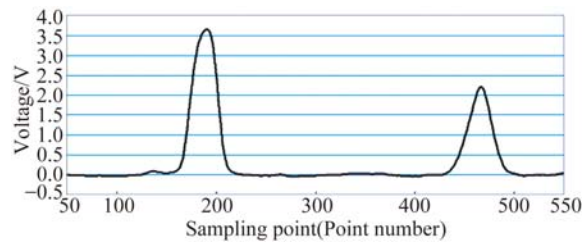
Fig. 7 Appearance and internal structure of portable up-conversion photoluminescence strip prototypical detector

用该仪器检测已滴加 $0.1 \mu\text{g}/\text{kg}$ 诺氟沙星标准品的试纸条,得到的原始数据曲线如图 8(a)所示,横坐标为测量点(截取 50~550 的有效采样点)。由图 8 可以清晰地观察到 T 线和 C 线对应的峰,但曲线不平滑,夹杂噪声,同时可见整条曲线有明显的基线漂移。这些问题都会影响浓度计算的准确性,需要用算法消除,算法流程如图 9 所示。



(a)原始数据曲线

(a)Original data



(b)处理后的数据曲线

(b)Processed data

图 8 已上样试纸条检测数据

Fig. 8 Data of upconversion photoluminescence strip test

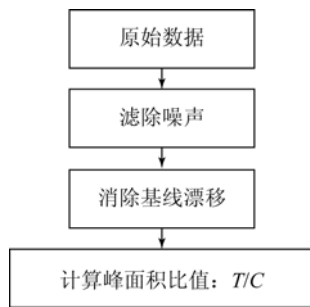


图 9 原始数据处理算法流程图

Fig. 9 Flow chart of original data processing algorithm

原始数据中的噪声主要来源于电路元件的噪声以及 NC 膜上沉积的微量荧光物质干扰,大多为随机噪声。滑动平均滤波法计算简便且消耗硬件资源少,适用于该类噪声的滤除。因此,本文选用了 5 点滑动平均滤波法处理原始数据,公式如下:

$$\bar{X}_i = \frac{1}{5} \sum_{j=0}^5 X_{i+j}, \{i = 50, 51, 52, \dots, 550\}. \quad (1)$$

下一步工作是消除基线漂移,首先要拟合出基线方程。T 线、C 线对应的两个峰以外的采样点能够体现基线的变化趋势。由于基线变化相对缓慢,粗略地估算出峰并保留两个峰以外的采样点即可。这里视 T 线、C 线两处的极大值为峰中心,设定 90 个采样点为峰宽,删除这些点,得到基线数据。对基线数据做 5 阶多项式最小二乘拟合,得到方程:

$$y = 4.596 + 2.741 \times 10^{-3} x + 1.07 \times 10^{-5} x^2 - 1.633 \times 10^{-7} x^3 + 4.751 \times 10^{-10} x^4 - 4.072 \times 10^{-13} x^5. \quad (2)$$

然后,用滤除噪声后的数据减去基线方程的对应值,得到滤除噪声、消除基线漂移的数据曲线,如图 8(b)所示。

本文采用扫描求面积的方法寻峰,该算法易于实现,优于现有的极大值搜寻法^[9,13]。其原因在于:第一,极大值未必在峰的几何中心;第二,当荧光信号微弱时,突变的噪声采样点容易混淆信号峰。因此,不能简单地通过极大值位置来精确定位峰。由于两峰的位置不会有大幅度的偏差,C 线的峰在采样点 50~275 内,T 线的峰在 275~550 内。以搜寻 C 线的峰(本文以半峰面积来代表 T 线和 C 线对应的光强)为例,以半峰宽 40 个采样点作为积分范围,分别以第 50, 51, 52 至 236 采样点为起点,利用辛普森积分公式计算面积^[15],可得出一个面积数组,其中最大值即为所

求。同理可求出 T 线对应的半峰面积,进而求得 T/C。

4.2 检测结果分析

以浓度为 0, 0.1, 0.5, 1, 3, 5 和 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的诺氟沙星溶液作为标准品,并给试纸条上样。分别对每种浓度的试纸条进行 5 次重复性测试,运用上述方法计算得到 T/C 值(保留小数点后 5 位),如表 1 所示。7 组测试数据的标准差均小于 0.004,说明该仪器具有良好的重复性。被测物浓度越高,T 线的荧光越弱,而 CV(变异系数)随浓度的升高呈增大趋势,说明仪器检测微弱光信号的能力还不理想,易受噪声干扰。

表 1 不同浓度试纸条重复测量求出的 T/C 值
Tab. 1 Results of repeated measurement for strips with different concentrations

实验次数	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$						
	0	0.1	0.5	1	3	5	10
1	0.558 05	0.480 78	0.286 46	0.159 94	0.079 99	0.051 64	0.000 49
2	0.562 24	0.483 43	0.288 42	0.160 05	0.077 84	0.049 34	0.000 54
3	0.560 37	0.484 89	0.288 50	0.162 40	0.073 05	0.047 71	0.000 47
4	0.559 28	0.484 50	0.292 16	0.157 41	0.074 27	0.046 12	0.000 57
5	0.560 29	0.483 69	0.290 05	0.166 13	0.076 83	0.045 53	0.000 49
平均值	0.560 05	0.483 46	0.289 12	0.161 19	0.076 40	0.048 07	0.000 51
标准差	0.001 55	0.001 44	0.002 13	0.003 28	0.002 78	0.002 49	0.000 04
CV/%	0.276	0.298	0.736	2.035	3.638	5.177	7.800

本文采用四参数 Logistic 拟合法绘制浓度标准曲线^[16],其数学模型为:

$$Y = (A - D) / [1 + (x/C)^B] + D. \quad (3)$$

根据表 1 中 7 组 T/C 数据的平均值拟合出的标准曲线方程为:

$$Y = 0.566 04 / (1 + 2.109 98 x^{1.115 13}) - 0.004 79. \quad (4)$$

决定系数 $R^2 = 0.996 3$,说明浓度-T/C 的拟合度良好,如图 10 所示。

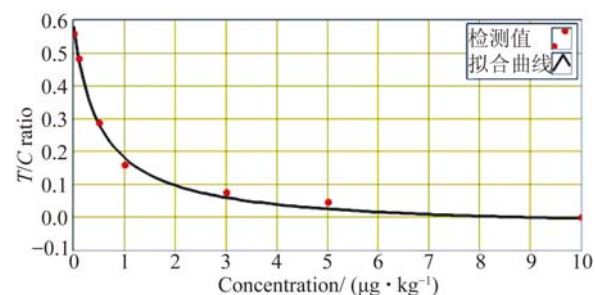


图 10 浓度标准拟合曲线

Fig. 10 Standard fitting curve of concentration

用浓度为 0.3, 2 和 7.5 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 的诺氟沙星溶液给试纸条上样, 计算检测仪的相对测量误差。同样进行 5 次测量, 用 T/C 值(保留小数点后 5 位)的平均值对比由浓度标准曲线推算出的理论值, 得到相对误差, 结果如表 2 所示。

表 2 浓度相对测量误差

Tab. 2 Relative errors of concentration measurement

测量次数	浓度/ $(\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1})$		
	0.3	2	7.5
1	0.370 92	0.088 12	0.022 26
2	0.368 83	0.087 20	0.022 32
3	0.368 88	0.087 25	0.022 30
4	0.368 80	0.087 86	0.021 99
5	0.369 15	0.087 48	0.022 14
平均值	0.369 32	0.087 58	0.022 02
推算值	0.360 16	0.096 82	0.022 23
相对误差/%	2.54	9.54	9.44

从以上分析结果可知, 本检测仪性能稳定, 在重复性、浓度-T/C 的拟合度方面具有良好的表

现, 相对测量误差小于 10%, 已具备定量检测上转换荧光试纸条的能力。

5 结 论

本文设计并研制了便携式上转换荧光试纸条检测仪, 通过光学系统、电路系统及数据处理算法的设计, 实现了定量检测荧光试纸条上待测物浓度的功能。该仪器结构精巧、功耗低、功能全面、性能稳定, 完全满足上转换荧光试纸条检测的需求。以诺氟沙星试纸条为对象进行了实验测试, 结果表明: 仪器重复性强, 7 组重复性检测的标准差均小于 0.004; 在 0~10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 浓度内仪器具有良好的 Logistic 拟合关系, 相对测量误差小于 10%。

我国荧光试纸条定量检测的潜在市场巨大, 因此性能优越、测量精确的定量检测仪器具有广阔的应用前景。不过本文设计的便携式上转换荧光试纸条检测仪还需完善, 下一步研究是提高微弱光信号的检测能力及噪声抑制能力。

参考文献:

- [1] ZHOU J, LIU Z, LI F Y. Upconversion nanophosphors for small-animal imaging [J]. *Chemical Society Reviews*, 2012, 41(3): 1323-1349.
- [2] GUAN Y L, QU S N, LI B, et al.. Ratiometric fluorescent nanosensors for selective detecting cysteine with upconversion luminescence [J]. *Biosensors & Bioelectronics*, 2016, 77: 124-130.
- [3] WANG F, LIU X G. Recent advances in the chemistry of lanthanide-doped upconversion nanocrystals [J]. *Chemical Society Reviews*, 2009, 38(4): 976-989.
- [4] HUA F, ZHANG P P, ZHANG F L, et al.. Development and evaluation of an up-converting phosphor technology-based lateral flow assay for rapid detection of *Francisella tularensis* [J]. *Scientific Reports*, 2015, 5: 17178.
- [5] NGOM B, GUO Y C, WANG X L, et al.. Development and application of lateral flow test strip technology for detection of infectious agents and chemical contaminants: a review [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2010, 397(3): 1113-1135.
- [6] YAN C L, DADVAND A, ROSEI F, et al.. Near-IR photoresponse in new up-converting CdSe/NaYF₄:Yb, Er nanoheterostructures [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 2010, 132(26): 8868-8869.
- [7] 李春风, 赵勇, 王晓英, 等. 基于上转换发光免疫层析技术的常见食源性致病菌快速检测方法研究与评价 [J]. *军事医学*, 2015, 39(2): 128-132.
- LI CH F, ZHAO Y, WANG X Y, et al.. Development of up-converting phosphor technology based lateral flow assay for quantitative detection of food-borne pathogens [J]. *Military Medical Sciences*, 2015, 39(2): 128-132. (in Chinese)
- [8] 李向丽, 谭贵良, 张娜, 等. 上转换发光纳米技术及其在食品安全检测中应用研究进展 [J]. *现代食品科技*, 2014, 30(8): 280-287.
- LI X L, TAN G L, ZHANG N, et al.. Upconversion fluorescent nanoparticles technology in food inspection [J]. *Modern Food Science and Technology*, 2014, 30(8): 280-287. (in Chinese)
- [9] 卢健, 周蕾, 赵永凯, 等. 上转换发光免疫试纸条扫描检测系统研究 [J]. *光子学报*, 2006, 35(4): 555-560.
- LU J, ZHOU L, ZHAO Y K, et al.. Scanning detection system of UPL-based immunoassay test strip [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, 35(4): 555-560. (in Chinese)

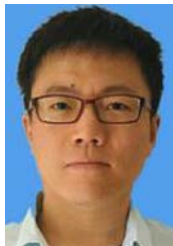
- [10] KETTLE J, CHANG S W, HORIE M. IR sensor based on low bandgap organic photodiode with up-converting phosphor [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2015, 15(6): 3221-3224.
- [11] 田青, 罗金平, 刘晓红, 等. 生物发光法细菌快速检测仪的研制及应用[J]. *光学精密工程*, 2010, 18(4): 771-778.
TIAN Q, LUO J P, LIU X H, *et al.*. Development and application of rapid detecting instrument for bacteria based on bioluminescence [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2010, 18(4): 771-778. (in Chinese)
- [12] 吴太虎, 毛佳文, 陈锋, 等. 痕量微生物快速检测系统[J]. *光学精密工程*, 2015, 23(11): 3061-3068.
WU T H, MAO J W, CHEN F, *et al.*. Rapid trace microbia detection system [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2015, 23(11): 3061-3068. (in Chinese)
- [13] LI X T, JIANG K, WANG P. Research of quantitative analyzer for fluorescence immune chromatography strips[J]. *Applied Mechanics & Materials*, 2013, 373-375: 1000-1006.
- [14] 顾雯雯. 微流控细胞芯片 LED 诱导透射式荧光检测微系统[J]. *光学精密工程*, 2014, 22(8): 2159-2165.
Gu W W. LED induced transmitted fluorescence detector integrated in microfluidic cell chip [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2014, 22(8): 2159-2165. (in Chinese)
- [15] 李庆扬, 王能超, 易大义. 数值分析[M]. 第五版. 北京: 清华大学出版社, 2014.
LI Q Y, WANG N CH, YI D Y. *Numeric Analysis* [M]. Fifth Edition. Beijing: Tsinghua University Press, 2014. (in Chinese)
- [16] 肖友益. 化学发光免疫分析标准曲线拟合模式选择[J]. *现代检验医学杂志*, 2009, 24(5): 157.
XIAO Y Y. Selection of chemiluminescence immune assay standard curve fitting model [J]. *Journal of Modern Laboratory Medicine*, 2009, 24(5): 157. (in Chinese)

作者简介:



董国亚(1971—),女,河北石家庄人,博士,副教授,硕士生导师,1994年于河北工业大学获得学士学位,1999年于北京理工大学获得硕士学位,2003年于清华大学获得博士学位,主要从事生物医学信号处理,生物电磁场计算和光电信号检测等方面的研究。E-mail: dongguo-ya71@163.com

通讯作者:



孙传强(1988—),男,山东潍坊人,博士研究生,2009年于山东大学获得学士学位,2012年于天津大学获得硕士学位,主要从事质谱、光谱检测技术与仪器方面的研究。E-mail: suncq@tju.edu.cn