

DOI: 10.13382/j.jemi.2017.11.010

酶免分析仪孵育过程的分段温控方法研究*

张津津 周哲海 祝连庆 贺庆 郭阳宽

(北京信息科技大学 光电测试技术北京市重点实验室 北京 100192)

摘要:针对酶免分析仪孵育过程耗时过长、温度稳定性差导致试剂反应差异性较大的问题,提出了一种基于改进型数字PID的分段温度控制方法。首先对孵育过程中试剂温度及孵育位温度变化曲线特性进行分析,确定预升温段及恒温段的分段控制温度参数;然后根据温度参数及各段控制指标,分别对孵育过程的不同温度变化段采用不同算法分阶段进行控制;最后基于酶免分析仪框架搭建了温控实验系统,对反应液温度上升时间及温度稳定性进行验证。实验结果表明,试剂由21℃升至37.5℃的温度上升时间为 239 ± 5 s,恒温阶段的温度偏差小于 ± 0.2 ℃。该方法可实现反应液迅速升温并且稳定恒温,保证了孵育过程中生物酶反应的快速及稳定。

关键词:酶免分析仪;酶活性;孵育系统;温度控制;分段算法

中图分类号: TH79 文献标识码: A 国家标准学科分类代码: 510.8040

Research on segmentation temperature control method of incubation process for ELISA analyzer

Zhang Jinjin Zhou Zhehai Zhu Lianqing He Qing Guo Yangkuan

(Beijing Key Laboratory for Optoelectronic Measurement Technology, Beijing Information Science & Technology University, Beijing 100192, China)

Abstract: The testing efficiency of ELISA analyzer is seriously affected the time-consuming incubation and the accuracy will be reduced by the differences in the degree of reagent reaction due to temperature instability. Aiming at these problems, a method of segmentation incubation based on the improved digital PID algorithm was proposed. Firstly, the temperature characteristics of reagent and incubation system were analyzed and the parameters in pre-heating and constant temperature stage were determined. Secondly, different algorithms were applied in the different sections of incubation process according to the parameters and control indicators. And then, the experiment system was set based on ELISA analyzer framework to verify the time of temperature rising and stability of reagent. The experiment results indicate that the reagent is heated up from 21℃ to 37.5℃ in 239 ± 5 seconds, meanwhile, the temperature deviation of isothermal segment is less than ± 0.2 ℃. The method proposed in this paper achieves fast and stable temperature control and ensures enzyme reaction fast and stable.

Keywords: ELISA analyzer; enzyme activity; incubate system; temperature control; segmentation algorithm

0 引言

酶免分析仪是一种基于酶联免疫吸附试验的临床检测仪器,广泛应用于传染病血清学标志物、肿瘤标志物及

内分泌指标物等各种免疫指标的检测^[1]。其中,孵育过程作为酶联免疫检测过程的重要步骤,用于保证抗体与组织样品/细胞中目标蛋白的充分结合,是整个检测过程中耗时最长的过程。孵育过程中样品/试剂的温度上升时间决定了整机测试时间从而决定了整机检测效率;另

收稿日期:2017-03 Received Date: 2017-03

* 基金项目:教育部“长江学者和创新团队”发展计划(IRT1212)、北京市属高等学校创新团队建设与教师职业发展计划(IDHT20130518)资助项目

外,恒温段温度的稳定性将直接影响生化反应中生物酶的活性及反应程度的差异性。对孵育过程中温度的快速、稳定控制方法进行研究对于提高酶免测试效率及结果准确性具有重要意义。

国内外在温度控制方面进行了很多研究,并取得了一些重要成果。文献[2-6]用模糊自整定 PID 算法对孵育过程的温度进行了采集和控制,其采用模糊自整定 PID 算法, PID 的 3 个参数具有自适应的特性,实验结果使得反应液从室温加热至 37℃ 恒温用时 310 s,加热过程中控制器由于控制结构的原因无法最大化输出控制量,虽然结果无超调,但加热过程耗时过长,酶活性的反应差异性无法达到最小化。陈世泽等人^[7]通过有限元分析对温度场进行了建模分析。周良等人^[8]和张军等人^[9]对孵育过程的温度补偿进行了研究。许秀锋等人^[10-11]用史密斯预估器结合 PID 控制对温度滞后问题进行了研究。Rivas-Perez 等人^[12]和 Feliu-battle 等人^[13]用两自由度多阶史密斯预估器对 PID 算法进行改进,降低了温度控制的迟滞量,使得温控过程更加稳定。以上研究均采用单一控制方法,无法解决升温过程慢、调节时间长等问题,并且未对恒温段的温度稳定性进行分析,因此难以在孵育过程中达到良好的控制效果。

本文根据孵育过程温度上升时间及恒温段温度稳定性的需求,针对酶免分析仪的孵育位结构,提出了一种分段温度控制方法,实现试剂快速升温以及恒温段温度的稳定。

1 孵育位结构及温度变化特性分析

1.1 孵育位结构

在反应液温度较低时,生物酶活性与温度大致呈线性关系;当反应液温度达到接近人体体温的 37℃ 时,酶活性达到最佳。所以,孵育过程的核心是使反应液温度快速升至最佳温度,并保持该最佳温度一定时间段内的

稳定性,从而保证生物酶的最大活性,进而保证酶分子与抗体分子最大程度的共价结合。

酶免分析仪的试剂反应均在 96(8×12)孔微孔板中发生,通常直接将微孔板置于孵育位中,反应液逐渐升温,直至达到孵育时间后将微孔板移出。孵育位结构如图 1 所示,孵育位下部为塑料底座,用以支撑加热铝板以及容纳控制电路,加热铝板下表面固定 PTC 陶瓷加热片,上表面放置 96 孔微孔板,温度传感器置于加热铝板侧壁。

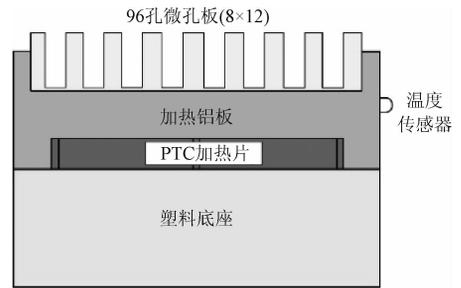


图 1 孵育位结构

Fig. 1 Schematic diagram of incubation system structure

1.2 孵育位及反应液温度变化特征分析

根据整个孵育位结构的特点,为了使反应液升温过程尽可能快,可在微孔板置入前对孵育位进行预升温。预升温初始阶段可采用全功率加热算法,为了使达到设定温度值时系统不发生震荡并且限制正向超调,可采用适当闭环控制算法使得孵育位升温至恒温段的整个过程迅速且平稳。当微孔板置入孵育位后,由于两者之间的热传递,孵育位温度下降,微孔板内的反应液温度上升。进入恒温阶段后需要避免扰动造成的控制输出量突变,使得恒温阶段温度值的波动控制在理想范围内,保证生物酶活性的稳定。孵育过程中孵育位与微孔板中反应液的温度变化曲线如图 2 所示,其中实线为孵育位温度曲线,虚线为反应液温度曲线。

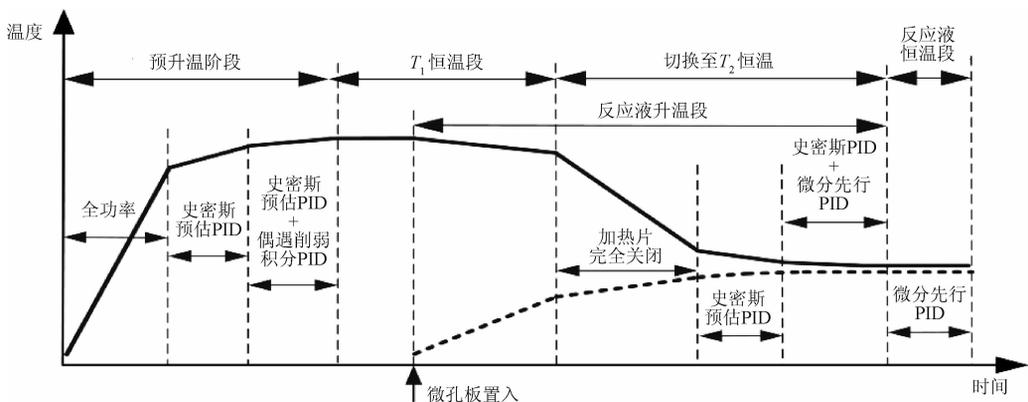


图 2 孵育系统在 96 微孔板放入前后的温度变化

Fig. 2 Temperature change of incubation system before and after loading 96-micro-porous plate

2 分段温控方法研究

本方法使用的算法均以数字 PID 为基础:

$$u(k) = K_p \left\{ e(k) + \frac{T}{T_i} \sum_{j=0}^k e(j) + \frac{T_D}{T} [e(k) - e(k-1)] \right\} \quad (1)$$

式中: $u(k)$ 为输出量, $e(k)$ 为偏差量, $K_p e(k)$ 为比例部分, $K_p \frac{T}{T_i} \sum_{j=0}^k e(j)$ 为积分部分, $K_p \frac{T_D}{T} [e(k) - e(k-1)]$ 为微分部分。

2.1 算法研究

本方法中整个孵育过程有两个恒温段,即为了加速反应液升温的预升温 T_1 恒温段和为了保持酶活性的 T_2 恒温段。

当温度值和设定值相差较大时,为了提高加热速度将全功率加热,算法表示为:

$$u(k) = 1, |y(k) - r(k)| \geq T_s \quad (2)$$

式中: T_s 表示启用全功率加热的温度差阈值。 T_1 恒温初始阶段温度值与设定值差值大于 T_s 时启用全功率加热。

温控系统是典型的迟滞系统。当预升温段和 T_2 恒温段中温度值与设定值的差值小于或等于 T_s 时切换为史密斯预估 PID 算法。首先预估出系统在扰动下的动态响应,建立预估模型对时间滞后部分进行补偿,补偿器与被控对象共同构成没有时间滞后的部分^[14]。此算法可有效提高抗迟滞能力,提前预估将要达到的温度值。经补偿后的系统闭环传递函数为:

$$\phi(s) = \frac{D(s)G_p(s)}{1 + D(s)G_p(s)} e^{-\tau s} \quad (3)$$

式中: $G_p(s)$ 为被控对象中不含时间滞后部分, $e^{-\tau s}$ 为时间滞后部分。

当温度值与设定值很接近时,为了减少系统因控制量累积积分项而产生的超调或震荡,在使用史密斯预估 PID 算法基础上增加遇限削弱积分 PID 算法,使得最终的控制结果会逐渐趋于平稳。遇限削弱积分 PID 算法可表示为:

$$u(k) = K_p \left\{ e(k) + \beta \frac{T}{T_i} \sum_{j=0}^k e(j) + \frac{T_D}{T} [e(k) - e(k-1)] \right\} \quad (4)$$

其中 β 为积分项的开关系数,计算如下:

$$\beta = \begin{cases} 0, & e(k) \geq 0 \\ 1, & e(k) < 0 \end{cases} \quad (5)$$

算法中设定了两个温度阈值 T_H 和 T_L ,在预升温过程中,当温度值逐渐升高并高于 T_H 时,以及在放入 96 微孔板后孵育系统温度逐渐降低并低于 T_L 时,输出的积分

项只累计反向偏差而不累计正向偏差,以减少正向超调,使系统快速进入稳定状态。

当系统进入孵育恒温状态时,为了避免输出量突变,确保酶活性长期稳定的处于最佳状态,切换为微分先行 PID 算法。该算法只对温度测量值微分,而不对温度偏差值微分,此算法微分部分的传递函数为:

$$\frac{U_D(s)}{H(s)} = \frac{T_D S + 1}{\gamma T_D S + 1} \quad (6)$$

式中: γ 为微分增益系数, PID 算法的微分环节被移到了测量值与设定值的比较点之前。

2.2 算法实现

当温度值与设定值相差大于 T_s 时全功率加热,温差达 T_s 时切换为史密斯预估 PID 算法,温度达 T_H 时增加遇限削弱积分 PID 算法,直至平稳升温至 T_1 则进入恒温。

微孔板置入孵育位后,孵育位温度达到切换算法的设定值 T_c 时切换至 T_2 恒温;当温度值与设定值相差达 T_s 时启用史密斯预估 PID 算法;达到 T_L 时增加遇限削弱积分 PID 算法,直至孵育位达到 T_2 设定值,同时切换为微分先行 PID 算法保持恒温。

孵育完成后微孔板被移出,将重新循环进入预升温段。分段温度控制算法流程如图 3 所示。

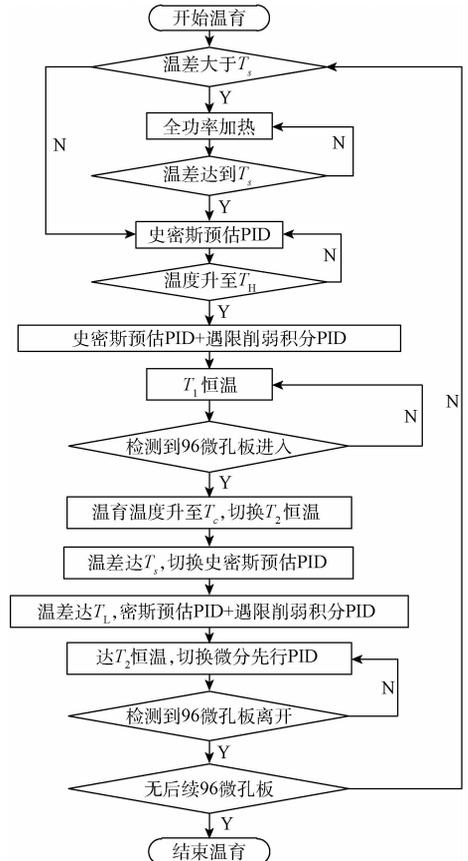


图3 分段温度控制算法流程

Fig. 3 Flow chart of segmentation temperature control algorithm

3 实验系统搭建及结果分析

基于以上理论分析,搭建了孵育实验系统如图 4 所示。利用 DS18B20 对加热铝板及反应液同时进行温度测量,STC89C51 作为主控芯片进行温控调节,L1602 对当前温度值进行实时显示。

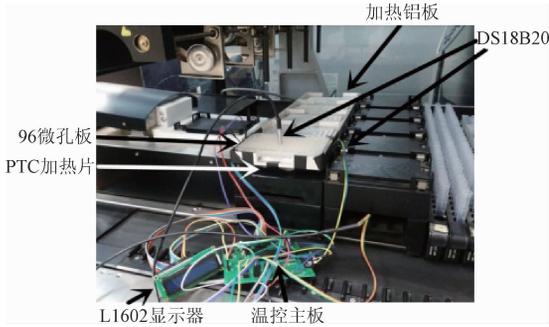


图 4 孵育实验系统实物照片

Fig. 4 The photo of experiment system of incubation

3.1 参数确定

经过大量标定实验^[15],得到 PID 整定参数分别为 $K_p = 2, T_i = 0.15, T_d = 0.02$ 。

孵育位初始温度越高,反应液相应的升温速度越快。图 5 所示为实验测得的孵育位初始恒定温度 50、60、70、80 °C 下反应液的升温曲线。由图 5 可知,反应液从室温 21 °C 升至 37.5 °C 耗时分别为 321、256、203 和 191 s。考虑到微孔板的耐高温特性等因素,将预升温目标温度值 T_1 设定为 80 °C。

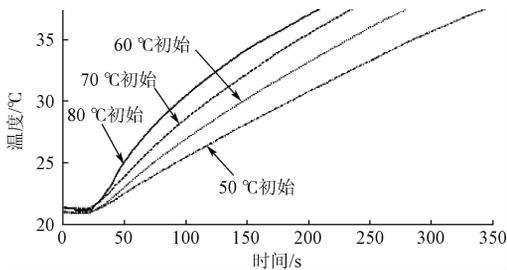


图 5 不同初始温度对应的反应液升温曲线

Fig. 5 Heating-up curves of reaction liquid with different initial temperature

假定室温为 21 °C,反应液目标温度为 37.5 °C,大量标定试验结果表明,温度值与设定值差值的阈值为 5 °C 时,史密斯预估 PID 算法可有效抑制系统迟滞,即 $T_s = 5$ °C;孵育位铝板恒温阶段的目标温度值 T_2 需设定为 40 °C;当温度值和目标值的差值为 2 °C 时增加遇限削弱积分 PID 算法可有效减少超调,即预升温调节起始温度 T_H 设定为 78 °C,反应液升温调节起始温度 T_L 设定为 42 °C。

3.2 反应液温度上升速度分析

为了减小反应液温度上升时间,提高升温速度,在反应液升温过程中进行算法切换。微孔板置入孵育位后,温控算法保持 $T_1 = 80$ °C 恒温,由于孵育位与反应液之间的热传递,孵育位温度下降,反应液温度上升。若反应液升至 31.5 °C 后仍不切换 $T_2 = 40$ °C 恒温,最终反应液恒温温度将超过 37.5 °C。因此,算法切换点为反应液升温至 31.5 °C 所对应的孵育系统温度 $T_c = 74$ °C。图 6 所示为两种切换算法对应的反应液升温曲线。

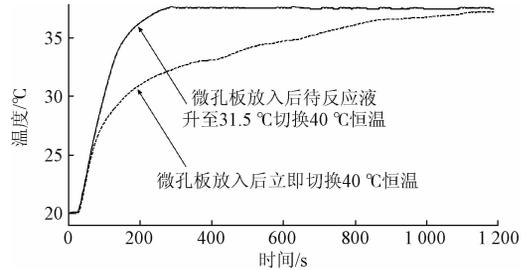


图 6 两种切换算法反应液温度变化曲线

Fig. 6 Curves of reaction liquid temperature change of two types of switching algorithm

由图 6 可知,从记录数据的 25 s 将微孔板置入孵育位。反应液温度达到 31.5 °C 时切换 $T_2 = 40$ °C 恒温,反应液升温至 37.5 °C 耗时 239 s;微孔板置入孵育位后立即切换 40 °C 恒温算法,则反应液达到 37.5 °C 耗时 180 s。由此可知,本文方法中采用的切换算法有效减小了反应液温度上升时间,提高了升温速度。

3.3 恒温段温度稳定性分析

孵育过程中分别对铝板侧边、铝板底面及微孔板内反应液的温度进行采样。孵育过程中各采样点的温度变化曲线如图 7 所示。

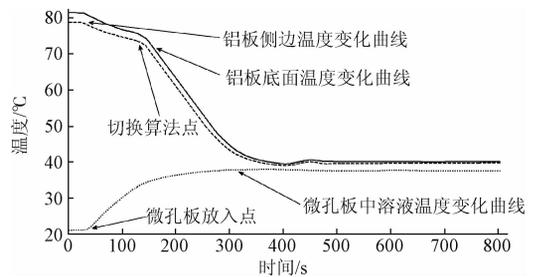


图 7 3 个测温点的温度曲线

Fig. 7 Temperature curves of three temperature measuring points

由图 7 可知,在恒温稳定阶段,孵育位与反应液的温度差为 2.5 °C;微孔板内反应液温度波动较小,500 s 内反应液的温度波动情况如表 1 所示。

表1 恒温阶段反应液温度波动值

Table 1 Temperature fluctuation of reaction solution in the constant temperature stage

时间区间/s	平均温度/℃	波动范围/℃	波动差值/℃
0 ~ 50	37.55	37.33 ~ 37.77	0.44
50 ~ 100	37.52	37.33 ~ 37.70	0.37
100 ~ 200	37.51	37.40 ~ 37.63	0.23
200 ~ 500	37.51	37.40 ~ 37.63	0.23

由表1可知反应液达到37.5℃后恒温阶段的0~50s,反应液温度波动差值最大为0.44℃;随着孵育位与反应液之间热传递迟滞效应的减弱,反应液温度波动逐渐减小。在100~200s时间范围内,反应液温度波动差值减小至0.23℃并保持稳定。由此可知,本文方法可将控温误差控制在±0.2℃范围内,具有较好的温度稳定性。

另外,为了证明本文分段温控方法的有效性及其可靠性,以HAMILTON酶免之星孵育模块为硬件平台进行了温控对比实验。两种温控方法的温度曲线如图8所示。

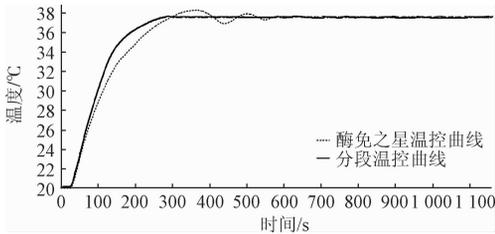


图8 不同孵育方法的温度曲线对比

Fig.8 Comparison of temperature curves of different incubation methods

如图8所示,两种温控方法均从第25s开始进入升温状态;利用分段温控方法达到恒温段耗时239s,且恒温段温度波动范围小于0.3℃;利用HAMILTON原机温控方法,达到恒温设定值耗时251s,并经过一段时间震荡状态后在613s达到恒温段,恒温期间的温度波动差值为0.5℃。由此可知,分段温控方法在升温速度和恒温稳定性两方面均优于HAMILTON酶免之星酶免分析仪原机的孵育模块温度控制方法。

4 结论

酶免分析仪孵育过程的时间及温度稳定性对于整机的检测效率及检测结果准确性具有决定性影响。本文基于孵育位结构特点及温控要求提出了一种结合多种数字PID算法的分段温控方法。有效的提高了酶免分析仪孵育阶段的升温速度,增强了恒温阶段的稳定性。实验结果表明,试剂由21℃升至37.5℃的温度上升时间为

239±5s,恒温阶段的温度偏差小于±0.2℃。分段温控算法有效缩短了孵育时间,并减小了试剂孵育过程由于温度不稳定导致的反应差异性,为提高酶免分析仪的测量快速性及准确性奠定了基础。另外,本文分段温控方法作为一种通用温度控制方法,同样适用于其他临床检验仪器的孵育过程温度控制。

参考文献

- [1] 祝连庆,温英利,王君,等.全自动酶免分析仪通信系统的设计与实现[J].电子测量与仪器学报,2013,27(2):179-183.
ZHU L Q, WEN Y L, WANG J, et al. Design and implementation of communication system for automatic enzyme immunoassay instrument [J]. Journal of Electronic Measurement and Instrument, 2013, 27(2): 179-183.
- [2] 潘爱先,赵卫华,陈得增.基因扩增(PCR)分析仪温度控制[J].中国海洋大学学报:自然科学版,2008,38(5):823-827.
PAN AI X, ZHAO W H, CHEN D Z. Research on the temperature control of PCR analysis instrument [J]. Periodical of Ocean University of China: Natural Science, 2008, 38(5): 823-827.
- [3] 廖红华.芯片级PCR仪温度模糊PID控制器设计与仿真[J].仪表技术与传感器,2012(5):85-88.
LIAO H H. Design and simulation of fuzzy adaptive PID controller for microchip level PCR instrument [J]. Instrument Technique and Sensor, 2012(5): 85-88.
- [4] 李莉,朱灵,江琴,等.微流控PCR温度控制算法设计[J].农业机械学报,2012,43(Z1):295-299.
LI L, ZHU L, JIANG Q, et al. Simulation of temperature control algorithm in microflow-through PCR system [J]. Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery, 2012, 43(Z1): 295-299.
- [5] 戴俊珂,姜海明,钟奇润,等.基于自整定模糊PID算法的LD温度控制系统[J].红外与激光工程,2014(10):3287-3291.
DAI J K, JIANG H M, ZHONG Q R, et al. LD temperature control system based on self-tuning fuzzy PID algorithm [J]. Infrared and Laser Engineering, 2014(10): 3287-3291.
- [6] 刘晓宇,郭阳宽,祝连庆,等.全自动酶免仪孵育模块温度模糊自适应控制[J].现代电子技术,2014(3):97-99,104.
LIU X Y, GUO Y K, ZHU L Q, et al. Fuzzy adaptive control on temperature of automatic enzyme immunoassay instrument incubation unit [J]. Modern Electronics Technique, 2014(3): 97-99, 104.

- [7] 陈世泽,陈章位,黄靖,等. PCR仪温度控制均匀性研究与仿真分析[J]. 中国生物医学工程学报,2009,28(4):610-614.
CHEN SH Z, CHEN ZH W, HUANG J, et al. Research and simulation on the temperature uniformity control of PCR instrument [J]. Chinese Journal of Biomedical Engineering,2009, 28(4):610-614.
- [8] 周良,黎海文,吴一辉. 具有温度补偿的小型生化分析仪温度控制系统的研究[J]. 传感技术学报,2008,21(11):1831-1834.
ZHOU L, LI H W, WU Y H. Study of the temperature-controlling system for mini clinical biochemical analyzer capable of temperature compensation [J]. Chinese Journal of Sensors and Actuators, 2008, 21(11):1831-1834.
- [9] 张军,张侃瑜. 温室温度控制系统不确定性与干扰的灰色预测补偿算法[J]. 农业工程学报,2013,29(10):225-233.
ZHANG J, ZHANG K Y. Grey prediction compensation algorithm for the uncertainty and interference of greenhouse temperature control system[J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2013, 29(10):225-233.
- [10] 许秀峰,陆敏恂,周爱国,等. 基于Smith预估器的PCR仪时滞温控系统[J]. 同济大学学报:自然科学版,2015,43(2):0293-0298.
XU X F, LU M X, ZHOU A I G, et al. Time-delay control system of PCR instrument based on Smith predictor [J]. Journal of Tongji University: Natural Science,2015, 43(2):0293-0298.
- [11] 屈毅,宁铎,赖展翹,等. 温室温度控制系统的神经网络PID控制[J]. 农业工程学报,2011,27(2):307-311.
QU Y, NING D, LAI ZH CH, et al. Neural networks based on PID control for greenhouse temperature [J]. Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering,2011,27(2):307-311.
- [12] RIVAS-PEREZ R, FELIU-BATLLE V, CA-STILLOGARCIA F J, et al. Temperature control of a crude oil preheating furnace using a modified Smith predictor improved with a disturbance rejection term[C]. IFAC Proceedings Volumes,2014.
- [13] FELIU-BATLLE V, RIVAS-PEREZ R, CASTILLO-GARCÍA F J. Simple fractional order controller combined with a Smith predictor for temperature control in a steel slab reheating furnace [C]. International Journal of Control, Automation and Systems,2013.
- [14] 张海涛,李珍. 基于Smith预估补偿的网络控制系统仿真研究[J]. 计算机工程与应用,2012,48(8):243-245.
ZHANG H T, LI ZH. Simulation of networked control system based on Smith prediction compensation [J]. Computer Engineering and Applications,2012, 48(8):243-245.
- [15] 黄峰,汪岳峰,顾军,等. 模糊参数自整定PID控制器的设计与仿真研究[J]. 光学精密工程,2004,12(2):235-239.
HUANG F, WANG Y F, GU J, et al. Design and simulation study of fuzzy parameter self-tuning PID controller [J]. Optics and Precision Engineering,2012, 12(2):243-245.

作者简介



张津津,1985年出生,现为北京信息科技大学硕士研究生,主要研究方向为生物医学检测技术与仪器。

E-mail: zhangjinjin1129@126.com

Zhang Jinjin was born in 1985. He is a M. Sc. candidate in Beijing Information Science and Technology University now. His main research interest is biomedical detection technology and instrument.



祝连庆(通讯作者),分别在1982和1989年于合肥工业大学获得学士学位和硕士学位,2013年于哈尔滨工业大学获得博士学位。现为北京信息科技大学教授,博士生导师。主要研究方向为生物医学检测技术与仪器、光电精密测试技术。

E-mail: zhulianqing@sina.com

Zhu Lianqing (Corresponding author) received B. Sc. and M. Sc. both from Hefei University of Technology in 1982 and 1989, and Ph. D. from Harbin Institute of Technology in 2013, respectively. Now he is a professor and Ph. D. supervisor in Beijing Information Science and Technology University. His main research interest is biomedical detection technology, and photoelectric precision measurement technology.