

## 摘要

食品安全是民生问题之一，与人们的生活密不可分。大肠杆菌 O157:H7 是一种典型的致病菌。但是，大多数的大肠杆菌检测方式过程繁琐、检测周期长且需要专业的技术人员，如何能进行大范围、快速、易操作的大肠杆菌检测是亟待解决的问题。本文通过差分脉冲伏安法检测大肠杆菌浓度与电流的关系，设计和构建电化学集成免疫分析平台，提出基于电化学和嵌入式单片机 STM32 的快速检测方法。

主要工作如下：根据系统的功能要求，确立了总体设计方案。研究了不同浓度、不同温度下大肠杆菌 O157:H7 与抗菌肽、抗体的结合程度。通过实验发现，温度、浓度会对实验结果较大的影响，研究了这些参数对实验的影响程度，总结了反应的最佳条件。利用电化学工作站采用差分脉冲伏安法探究了大肠杆菌浓度和电流大小的定量关系，为后续工作奠定基础。设计电化学生物传感器，制备了电化学横向免疫分析平台。设计了基于 STM32F407 芯片的嵌入式检测系统。开发了一套功能完善的 APP 软件，可实现底层通信、自动存储数据、结果判别等功能。

该检测系统主要包括三部分：电化学集成横向流动免疫分析平台、嵌入式检测系统以及手机 APP 功能模块。电化学横向免疫分析平台由样品垫、结合垫、测试条、吸收垫和丝网印刷电极构成；样品垫可吸收滴加的大肠杆菌 O157:H7 溶液，结合垫和测试条为平台提供电化学反应环境，丝网印刷电极提供电流回路。嵌入式检测系统综合了检测、分析和通信功能，可实现数据的检测、处理和发送，主要包括 I/V 转换放大电路、滤波电路、A/D 转换电路、系统电源电路、主控模块等部分；I/V 转换电路可将电化学集成横向流动免疫分析平台输出的电流信号放大转化为可检测的电压信号；滤波电路可提高信噪比，减小实验干扰；A/D 转换电路可将模拟信号转换为主控芯片可识别的数字信号；主控模块采用 STM32 单片机作为底层控制中枢，控制嵌入式系统的运行并与手机 APP 进行实时信息传输。手机 APP 功能模块基于 Android studio 开发人机交互界面，包含 1 个主功能界面与 5 个子菜单功能界面，软件嵌入了数据处理与结果判别模型，增强了系统自动化分析能力。

经测试，该系统线性检测范围为  $10^2$ - $10^9$  CFU/mL，最低检测浓度为  $10^2$  CFU/mL 检测误差小于 4.5%，系统重复误差小于 4%。在系统性能优化中，进行了小波算法软件处理，减弱了系统基础噪声的影响；系统采用基线漂移、曲线波峰校准及重构算法消减了系统的特异性误差，并以 MATLAB 数据拟合建立判别模型，均获得较好的区分效果，说明该系统可有效用于大肠杆菌的检测。

**关键词：**大肠杆菌 O157:H7；差分脉冲伏安法；快速定量检测；横向流动免疫分析；STM32F407

## Abstract

Food safety is one of the livelihood issues, and is closely related to people's lives. *Escherichia coli* O157:H7 is a typical pathogenic bacterium. However, most *E. coli* testing laboratories cooperate with professional technicians. How to carry out large-scale, fast and easy to operate *E. coli* detection is an urgent problem to be solved. In this paper, cyclic voltammetry is used to detect the relationship between the concentration and current of *E. coli*, design and construct an electrochemical integrated immunoassay platform, and propose a rapid detection method based on electrochemistry and embedded microcontroller STM32.

The main work is as follows: according to the functional requirements of the system, established the overall design scheme. The binding degree of *Escherichia coli* O157:H7 to antimicrobial peptides and antibodies at different concentrations and temperatures was studied. Through the experiment, it is found that temperature and concentration will have a great impact on the experimental results. The influence of these parameters on the experiment is studied, and the optimal conditions for the reaction are summarized. Cyclic voltammetry was used to explore the quantitative relationship between *E. coli* concentration and current, which laid a foundation for the subsequent work. The electrochemical biosensor was designed and the electrochemical horizontal immunoassay platform was prepared. An embedded detection system based on STM32F407 chip is designed. A set of APP software with perfect functions is developed, which can realize the functions of underlying communication, automatic data storage, result discrimination and so on.

The detection system mainly consists of three parts: electrochemical integrated lateral flow immunoassay platform, embedded detection system and mobile APP function module. The electrochemical horizontal immunoassay platform consists of sample pad, binding pad, test strip, absorption pad and screen-printed electrode. The sample pad can absorb the drip added *E. coli* O157:H7 solution. The combination of the pad and test strip provides an electrochemical reaction environment for the platform, and the screen-printed electrode provides a current loop. Embedded detection system integrates detection, analysis and communication functions, which can realize data detection, processing and sending, including I/V conversion circuit, filter circuit, A/D conversion circuit, system power circuit, main control module and so on. The I/V conversion circuit can amplify the current signal output by the electrochemical integrated lateral flow immunoassay platform into a detectable voltage signal. The filter circuit can improve the signal-to-noise ratio and reduce the experimental interference. A/D conversion circuit can convert the analog signal to the digital signal recognized by the main control chip. The main control module uses STM32 microcontroller as the bottom control center, which controls the operation of embedded system and transmits real-time information with mobile APP. The mobile APP function

module is based on Android studio to develop human-computer interaction interface, including one main functional interface and five sub-menus functional interface. The software is embedded with data processing and result discrimination model, which enhances the automatic analysis ability of the system.

After testing, the linear detection range of the system is  $10^2$ - $10^9$  CFU/mL, the lowest detection concentration is  $10^2$  CFU/mL, the detection error is less than 4.5%, and the system repetition error is less than 4%. In the optimization of system performance, the wavelet algorithm software processing is carried out to reduce the influence of basic noise of the system. The system uses baseline drift, curve crest calibration and reconstruction algorithms to reduce the specific errors of the system, and uses MATLAB data fitting to establish a discrimination model. All of the results show that the system can be effectively used for the detection of Escherichia coli.

**Keywords:** E. coli O157: H7; Differential pulse voltammetry; Rapid quantitative testing; Lateral flow immunoassay; STM32F407

# 目 录

摘 要 .....	I
ABSTRACT .....	II
目 录 .....	IV
第 1 章 绪论 .....	1
1.1 课题研究背景及意义 .....	1
1.2 国内外研究现状 .....	3
1.2.1 大肠杆菌检测方法研究现状 .....	3
1.2.2 大肠杆菌电化学生物传感器研究现状 .....	4
1.2.3 大肠杆菌检测仪器研究现状 .....	5
1.3 论文主要内容及章节安排 .....	6
1.3.1 论文主要研究内容 .....	6
1.3.2 论文结构安排 .....	6
第 2 章 大肠杆菌快速检测系统总体设计方案 .....	8
2.1 检测原理 .....	8
2.2 大肠杆菌快速检测系统功能需求 .....	8
2.3 大肠杆菌快速检测系统整体设计 .....	9
2.4 本章小结 .....	10
第 3 章 电化学集成横向流动免疫分析平台设计 .....	11
3.1 相关理论 .....	11
3.1.1 电化学集成横向流动免疫分析技术 .....	11
3.1.2 电化学生物传感器 .....	12
3.1.3 分子识别元件 .....	12
3.1.4 电子媒介体 .....	14
3.2 电化学集成横向流动免疫分析平台结构 .....	15
3.3 电化学集成横向流动免疫分析平台制备 .....	15
3.3.1 丝网印刷电极的设计 .....	15
3.3.2 横向流动装置的制作 .....	16
3.3.3 测试条的功能化 .....	17
3.4 本章小结 .....	17
第 4 章 大肠杆菌快速检测系统硬件电路设计 .....	18
4.1 I/V 转换放大电路设计 .....	18
4.2 滤波电路设计 .....	19

4.3 A/D 转换电路设计 .....	19
4.4 LCD 显示电路设计 .....	20
4.5 蓝牙通信电路设计 .....	21
4.6 STM32 最小系统电路设计 .....	22
4.6.1 主控芯片选择 .....	22
4.6.2 芯片引脚分配 .....	22
4.7 系统电源电路设计 .....	23
4.8 本章小结 .....	25
<b>第 5 章 大肠杆菌快速检测系统软件程序设计 .....</b>	<b>26</b>
5.1 嵌入式检测系统软件设计 .....	26
5.1.1 系统初始化程序设计 .....	26
5.1.2 信号采集程序设计 .....	29
5.1.3 数据处理程序设计 .....	31
5.1.4 结果显示程序设计 .....	35
5.1.5 蓝牙通信程序设计 .....	38
5.2 手机 APP 程序设计 .....	39
5.2.1 开发环境与编译工具介绍 .....	40
5.2.2 SQLite 数据库 .....	40
5.2.3 APP 程序设计与实现 .....	41
5.3 本章小结 .....	45
<b>第 6 章 系统调试与结果分析 .....</b>	<b>46</b>
6.1 系统组装与调试 .....	46
6.2 电化学集成横向流动免疫分析平台电化学测试 .....	46
6.2.1 可行性测试 .....	46
6.2.2 灵敏性测试 .....	47
6.2.3 特异性测试 .....	48
6.2.4 浓度表达式拟合 .....	48
6.3 电化学集成横向流动免疫分析平台条件优化 .....	49
6.3.1 最佳样品溶液量的条件优化 .....	49
6.3.2 最佳抗体浓度的条件优化 .....	49
6.3.3 最佳抗菌肽浓度的条件优化 .....	50
6.3.4 最佳反应时间的条件优化 .....	51
6.4 嵌入式检测系统测试 .....	51
6.4.1 系统检测精度测试 .....	51

6.4.1 系统误差测试.....	52
6.4.2 系统重复性测试.....	52
6.5 本章小结.....	53
<b>第 7 章 总结与展望.....</b>	<b>54</b>
7.1 总结.....	54
7.2 展望.....	55
参考文献.....	56
攻读硕士学位期间取得的成果 .....	60
致 谢.....	61

## 第1章 绪论

### 1.1 课题研究背景及意义

“民以食为天，食以安为先”，近年来，经常会看到某些学校因食物不卫生导致大批学生出现呕吐、发烧的新闻，而这些事件的“幕后真凶”就是致病性大肠杆菌。在过去大肠杆菌一直被认为是正常的肠道菌，不仅不具有致病性，而且能促进维生素 B 的合成、抑制微生物的生长、减少蛋白质分解产物对人体的危害<sup>[1]</sup>。但是，后来人们发现一些特殊血清型的大肠杆菌（如大肠杆菌 O157:H7）具有致病性，能导致腹泻或败血症，严重时还能危及生命<sup>[2,3]</sup>。

据世界卫生组织统计，全世界每年有 6 亿人因致病性细菌、化学品等感染中毒性疾病，有 40 多万人死于食物中毒，其中 5 岁以下的儿童约占 30%。非洲和中东地区因为卫生条件差、水资源短缺等问题，食物中毒状况尤为严重。即便在西方发达国家，食物中毒问题也不容小觑<sup>[4]</sup>。据德国风险评估局报道，德国每年大约有 20 万例食物中毒事件，其中大多是由大肠杆菌和沙门氏菌所致。据美国疾病控制中心报道，美国每年约有 5000 万人出现食物中毒，占人口总数的 16%，死亡人数达 3000 人。2018 年美国的大肠杆菌疫情涉及 25 个州，其中部分感染者出现了溶血性尿毒症综合征，从而导致肾衰竭。尽管美国政府发出了警告并提出了建议，但仍无法阻止疫情的扩散。据统计日本每年也有将近 12000 人感染食物中毒，中毒事件多发生在餐饮店、学校和养老院等场所。2020 年 7 月，日本的埼玉县 15 所中小学发生集体食物中毒事件，这些学校中超过半数的学生、老师出现了呕吐、腹泻的症状，总人数达到了 3453 人。

近年来，中国不断加强食品安全防控，保障人民的食品安全，取得了显著的成果<sup>[5]</sup>，但是疫情仍然有很强的反扑势头，不可掉以轻心。2012-2021 年全国食物中毒情况如图 1.1 和图 1.2 所示，2012 年到 2018 年期间，全国食物中毒起数和中毒人数相对稳定，但 2019 和 2020 年，全国食物中毒人数大幅度上升，中毒人数分别达到 38797 和 37454 人，可见食品安全防控形势依然严峻。

图 1.3 为全国食物中毒原因统计图。由图可知，由大肠杆菌 O157:H7 等微生物导致的食物中毒人数占比最多，达到 50% 以上；以毒蘑菇为代表的有毒动植物次之，占比达到 20%；另外，食品添加剂导致的食物中毒人数也占到了 15%。相较于毒蘑菇和一些禁用的食品添加剂，大肠杆菌 O157:H7 更为常见，厨房中未洗净的蔬菜、腌制的酸菜、变质的肉类和奶类、未煮熟的饭菜都用可能残留大肠杆菌<sup>[6-8]</sup>。因此，切断大肠杆菌的传播途径，加大食物中大肠杆菌的检测力度，具有重要的现实意义。

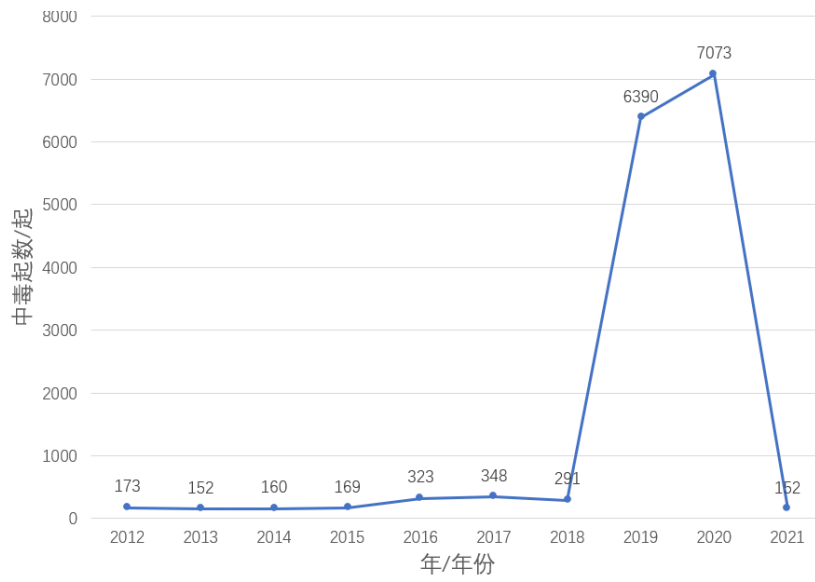


图 1.1 2012-2021 年全国食物中毒起数

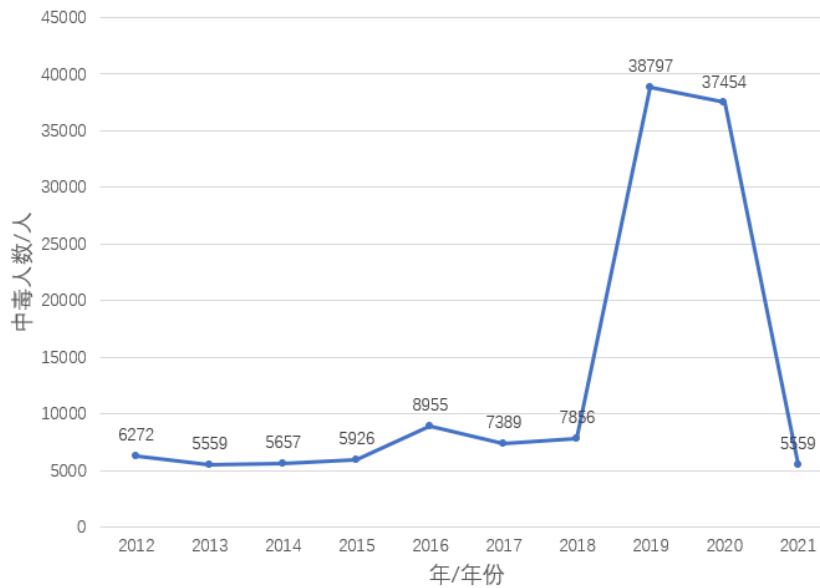


图 1.2 2012-2021 年全国食物中毒人数

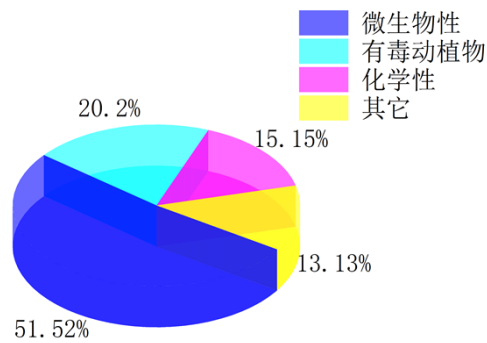


图 1.3 全国食物中毒原因人数占比



大肠杆菌的检测主要采用培养基培养<sup>[9]</sup>、酶联免疫吸附试验（ELISA）<sup>[10,11]</sup>和聚合酶链式反应（PCR）<sup>[12]</sup>等，这些方法虽然准确性高，但是比较耗时且需要专业人员，难以实现大规模的快速病原菌检测。随着科技的发展，生物传感器技术也越来越成熟。生物传感器具有接收信号并转换和放大信号的能力，对生物物质极其敏感并且可将浓度信号转换为电信号进行检测<sup>[13]</sup>。它相较于传统的检测法，具有操作简单、灵敏度高、检测时间短的优点。它的这些特性正好满足了检测食品中大肠杆菌的需求，即为了确保食品的安全与新鲜，检测要方便而且检测要快速。因此，利用生物传感器设计一套轻便的可快速检测病原菌的系统具有非常重要的现实意义。

## 1.2 国内外研究现状

### 1.2.1 大肠杆菌检测方法研究现状

随着人们对大肠杆菌研究的不断深入，其检测方法不断的发展，且每种方法都有其各自的优点，并逐渐得到完善。任宝红等人利用荧光 PCR 检测方法，基于大肠杆菌特异性基因设计引物和探针，完成了对大肠杆菌 O157:H7 的快速检测，该方法特异性好、稳定性高，但是需要在生物实验室中完成<sup>[14]</sup>。苑宁等人利用环介导等温扩增技术实现了大肠杆菌 O157:H7 的快速检测，检出限为 5.1 CFU/mL，该方法简化了操作步骤，可在 1 小时内完成大肠杆菌检测<sup>[15]</sup>。Hu Jinqiang 等人建立了一种检测大肠杆菌的新型重组聚合酶扩增测试试纸方法，该方法检测速度快、灵敏性较高，可实现大肠杆菌的现场检测，但是该方法只能定性，无法实现定量检测<sup>[16]</sup>。Miotto Marilia 等人利用叠氮溴化丙锭可与 DNA 结合、光敏感的特性，采用定量 PCR 检测方法，实现了大肠杆菌的定量分析，检测范围为  $10^3$ - $10^7$  CFU/mL<sup>[17]</sup>。P.Baraily 等人分别利用环介导等温扩增技术和 PCR 技术对大肠杆菌进行检测，证明环介导等温扩增技术的灵敏性和特异性更高，检测灵敏度为  $10^2$  CFU/mL<sup>[18]</sup>。Jin-Hee Kim 等人采用环介导等温扩增-测流免疫分析法，制作免疫分析试剂条，实现了大肠杆菌的快速定性检测，检测范围为  $30$ - $10^7$  CFU/mL<sup>[19]</sup>。

表 1.1 大肠杆菌检测方法对比表

作者	检测方法	检测限	特点
任宝红	荧光 PCR 检测法	$10^2$ CFU/mL	特异性好，稳定性高 需在实验室内完成
苑宁	环介导等温扩增 检测法	5.1 CFU/mL	灵敏度高，操作简单 检测相对迅速，需在 实验室内完成
Hu Jinqiang	聚合酶扩增试纸 检测法	$4.4 \times 10^2$ CFU/mL	检测速度快，可现场 检测，定性检测

Miotto Marilia	定量 PCR 检测法	$10^3$ CFU/mL	定量检测
P.Baraily	环介导等温扩增 检测法	$10^2$ CFU/mL	灵敏性和特异性高 需在实验室内完成
Jin-Hee Kim	环介导等温扩增-横流 流免疫分析法	30 CFU/mL	检测迅速, 可现场检 测, 定性检测

### 1.2.2 大肠杆菌电化学生物传感器研究现状

近年来, 生物传感器技术发展迅速, 已广泛应用于大肠杆菌的检测中。相较于传统的大肠杆菌检测方式, 生物传感器检测具有检测迅速, 操作简单, 可与嵌入式设备结合的优点。“生物传感器”一词由克拉克 (Clark) 提出, 1962 年克拉克发明了氧电极, 该电极可测量血氧水平, 并迅速在外科手术领域普及, 由此, 开启了生物传感器的研究历史。王春皓等人利用链霉亲和素和纳米 ZnO 材料设计了一种微叉指阻抗生物传感器, 该传感器对大肠杆菌 O157:H7 的线性检测范围为  $40\sim 4\times 10^4$  CFU/mL, 检测限为 40 CFU/mL<sup>[20]</sup>; 鲁文杰等人利用金纳米粒子标记物配合修饰电极完成了电化学免疫传感器的设计, 可检测淤泥中大肠杆菌, 该传感器的检测线性范围为  $10^2\sim 10^6$  CFU/mL, 检测限为 70 CFU/mL<sup>[21]</sup>; Zhao Dong 等人利用表面应力的柔性稳定敏感元件设计了大肠杆菌 O157:H7 生物传感器, 其线性检测范围为  $10^3\sim 10^7$  CFU/mL, 检测限达到 43 CFU/mL<sup>[22]</sup>; Ping Geng 等人利用寡核苷酸作为 DNA 探针, 与大肠杆菌 DNA 序列进行杂交, 设计了大肠杆菌电化学生物传感器, 该传感器同样达到了较好的检测效果<sup>[23]</sup>; Ankan Dutta Chowdhury 等人基于导电聚苯胺膜表面共价连接抗体的抗体抗原结合法, 成功制备了电化学阻抗传感器, 该传感器成功检测到浓度低至  $10^2$  CFU/mL 的大肠杆菌 O157:H7, 检测上限为  $10^7$  CFU/mL<sup>[24]</sup>; Wen-Jie LU 等人提出了一种基于树枝状包裹金和增强纳米颗粒新型电化学免疫传感器, 用于城市污泥中大肠杆菌的检测, 检测范围为  $10^2\sim 10^6$  CFU/mL, 检测限为 70 CFU/mL<sup>[25]</sup>; Gayathri Chandran Hema 等人利用硫氨酸修饰复合玻碳电极, 设计了一种电化学免疫传感器, 可以快速、灵敏地检测水中的大肠杆菌, 传感器的线性检测范围为  $10^2\sim 10^9$  CFU/mL, 电流灵敏度达到  $7.2\mu\text{A}$ <sup>[26]</sup>; Mohammed Sedki 等人将石墨烯-超支化壳聚糖纳米复合材料作为电极修饰剂, 该复合材料具有良好的电催化功能, 将生物传感器的检测灵敏度提高了 10 倍<sup>[27]</sup>; Haruki Shiraishi 等人用大肠杆菌的 16S rDNA 修饰电极制成了电化学生物传感器, 完成了对大肠杆菌 DNA 序列的检测<sup>[28]</sup>; Ahmet Güner 等人利用纳米复合材料修饰铅笔状石墨电极制成了一种新型免疫传感器, 该传感器具有较好的可重复性和稳定性, 检测范围为  $30\sim 3.0\times 10^7$  CFU/mL, 检测限为 30 CFU/mL<sup>[29]</sup>。

以上内容仅为本文档的试下载部分，为可阅读页数的一半内容。如要下载或阅读全文，请访问：<https://d.book118.com/566235103030011002>