



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 118392835 B

(45) 授权公告日 2024.10.29

(21) 申请号 202311563627.3

G01N 33/58 (2006.01)

(22) 申请日 2023.11.22

G01N 35/10 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 118392835 A

(56) 对比文件

CN 103131760 A, 2013.06.05

CN 1282378 A, 2001.01.31

(43) 申请公布日 2024.07.26

审查员 刘佳伦

(73) 专利权人 南京艾拓生命科技有限公司

地址 211100 江苏省南京市江宁区福英路

1001号联东U谷二期18幢

(72) 发明人 夏智敏

(74) 专利代理机构 嘉兴瑞诚专利代理事务所

(普通合伙) 33519

专利代理师 向维登

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

权利要求书2页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

全自动液态悬浮芯片检测方法

(57) 摘要

本发明公开了一种全自动液态悬浮芯片检测方法,依次包括吸样、样本处理、二次吸样、固定磁珠位置、采集照片信息、图片处理、确定微球群对应项目、确定报告灰度值、获取定标曲线方程及计算浓度值等步骤。本发明该检测方法具有自动化、高灵敏度、多参数分析、定量测量、高效、自动校正、高通量等优点,适用于高效、准确地进行多项目检测和浓度测量。



1. 一种全自动液态悬浮芯片检测方法,其特征在于,步骤如下:

步骤一,自动吸取预设体积和位置信息的待测样本;

步骤二,样本处理:按照预定顺序,对待测样本进行自动处理,使样本和试剂中的磁珠抗体相结合,并通过SAPE放大荧光信号;

步骤三,二次吸样:将处理完成的样本引入后续处理分析环节;

步骤四,固定磁珠位置:利用磁力将磁珠吸附到检测池的预定位置;

步骤五,采集照片信息:点亮红光,激发磁珠生成一束红光、一束红外光,相机分别与红光滤波片、红外滤波片配合,采集微珠生成的红光照片与红外光照片;点亮绿光,相机与报告值滤波片配合,采集微珠的报告值照片;

步骤六,图片处理:对红光照片与红外光照片进行处理,输出灰度图片,具体为:

S6.1,灰度化处理:

通过平均算法将红光照片与红外光照片的RGB值转换灰度值,

$$I(x, y) = \frac{I_R(x, y) + I_G(x, y) + I_B(x, y)}{3}$$

其中, I 表示当前坐标点 (x, y) 的灰度值, I_R 、 I_G 、 I_B 分别为红色分量、绿色分量、蓝色分量的值;

S6.2,高斯滤波处理:

用一个3x3模板扫描图像中的每一个像素,用模板确定的领域内像素的加权平均灰度值去替代模板中心像素点的值,高斯滤波的3x3的匹配模板如下,

$$\begin{vmatrix} I(i-1, j-1) & I(i-1, j)*2 & I(i-1, j+1) \\ I(i, j-1)*2 & I(i, j)*4 & I(i, j+1)*2 \\ I(i+1, j-1) & I(i+1, j)*2 & I(i+1, j+1) \end{vmatrix} \div 16$$

其中, $I(i, j)$ 表示当前像素;

离散化窗口滑窗卷积实现高斯滤波,卷积中每个像素点的值由其本身和领域内的其他像素经过加权平均后得到,上述匹配模板为二维数组所存放的系数,对于大小为 $(2k+1) \times (2k-1)$ 的窗口模板,各个元素的计算公式为,

$$H(i, j) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(i-k-1)^2 + (j-k-2)^2}{2\sigma^2}}$$

其中, $H(i, j)$ 表示当前窗口模板中第 i 行、第 j 列像素点的元素值, k 表示窗口模板的取值, σ 表示标准差;

S6.3,伽马变换图像校正:

对原图像上每一个像素值做乘积运算,

$$G = c * r^\gamma$$

其中, c 为常数系数, r 为图像的像素值,取值范围0~255, γ 为伽马变换因子, γ 值以1为分界,值越小,对图像低灰度部分的扩展作用就越强,值越大,对图像高灰度部分的扩展作用就越强的图像增强效果明显;

S6.4, JPEG压缩;

步骤七, 确定微球群对应项目: 根据灰度图片计算红光和红外光的灰度值, 由红光和红外光的灰度值形成微球的种类分布图, 获取微球群所对应的项目;

步骤八, 确定报告灰度值: 根据报告值照片, 计算每个点的报告值灰度, 采用中位数的方法得到每个项目微球群的报告灰度值;

步骤九, 获取定标曲线方程: 利用已知浓度值的试剂定标品, 通过对报告灰度值与浓度值进行回归分析, 获得定标曲线方程; 具体采用Logistic回归模型拟合定标曲线方程,

$$y = A + (B - A) / (1 + e^{-a * x + b})$$

其中, y 表示因变量即浓度值, x 表示自变量即报告灰度值, A 表示曲线的下限或起始值, B 表示曲线的上限或饱和值, a 表示曲线的斜率参数, b 表示曲线的平移参数;

步骤十, 计算浓度值: 根据步骤八的报告灰度值, 使用步骤九的定标曲线方程, 计算出对应的浓度值。

2. 根据权利要求1所述的全自动液态悬浮芯片检测方法, 其特征在于,

步骤二中, 包括样品预处理、试剂添加、混匀、反应、洗涤和分离。

3. 根据权利要求1所述的全自动液态悬浮芯片检测方法, 其特征在于,

步骤五中, 红光滤波片、红外滤波片及报告值滤波片配有切换装置, 用于将任一滤波片调整至至光学轴线上。

4. 根据权利要求1所述的全自动液态悬浮芯片检测方法, 其特征在于, 步骤九中, 同一张照片被激发出来的荧光值与靶值的偏差超过10%时, 根据校准的数据及偏差自动将超过10%的荧光值进行区域划分, 得到新的定标曲线方程, 后续测量使用对应的定标曲线方程。

全自动液态悬浮芯片检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗检测技术领域,具体涉及一种全自动液态悬浮芯片检测方法。

背景技术

[0002] 液态悬浮芯片检测是一种综合了分子生物学、免疫学、高分子化学、光学检测技术、微流体技术以及计算机技术等多个领域的高通量多参数检测技术。这一技术与传统流式细胞仪相比,具有高通量、多指标检测、高敏感性、高特异性、宽线性范围、反应迅速、重复性好以及操作简便等优点。因此,它已经广泛应用于免疫学分析、DNA杂交分析、以及蛋白质和基因表达谱的分子检测等领域的临床诊断。

[0003] 传统的悬浮式液态生物芯片所采用的流式点阵法是将磁珠依次流经鞘流池,通过红激光进行分类,绿激光进行报告值激发,APD/PMT进行数据的采集,从而实现多重项目的检测,具有对安装调试对人员要求高,液路复杂,故障率高,维护保养不便,成本高等特点。因此,实际应用中迫切需要一种特异性灵敏度高、成本低、自动化程度高且操作简单的悬浮式液态生物芯片检测方法。

发明内容

[0004] 为了实现高效准确的实现液态悬浮芯片检测,本发明提供了一种全自动液态悬浮芯片检测方法。

[0005] 本发明采用的技术方案如下:一种全自动液态悬浮芯片检测方法,步骤如下:

[0006] 步骤一,吸样:自动吸取预设体积和位置信息的待测样本;

[0007] 步骤二,样本处理:按照预定顺序,对待测样本进行处理,使样本和试剂中的磁珠抗体相结合,并通过SAPE放大荧光信号;

[0008] 步骤三,二次吸样:将处理完成的样本引入后续处理分析环节;

[0009] 步骤四,固定磁珠位置:利用磁力将磁珠吸附到检测池的预定位置;

[0010] 步骤五,采集照片信息:点亮红光,激发磁珠生成一束红光、一束红外光,相机分别与红光滤波片、红外滤波片配合,采集微珠生成的红光照片与红外光照片;点亮绿光,相机与报告值滤波片配合,采集微珠的报告值照片;

[0011] 步骤六,图片处理:对红光照片与红外光照片进行处理,输出灰度图片;

[0012] 步骤七,确定微球群对应项目:根据灰度图片计算红光和红外光的灰度值,由红光和红外光的灰度值形成微球的种类分布图,获取微球群所对应的项目;

[0013] 步骤八,确定报告灰度值:根据报告值照片,计算每个点的报告值灰度,采用中位数的方法得到每个项目微球群的报告灰度值;

[0014] 步骤九,获取定标曲线方程:利用已知浓度值的试剂定标品,通过对报告灰度值与浓度值进行回归分析,获得定标曲线方程;

[0015] 步骤十,计算浓度值:根据步骤八的报告灰度值,使用步骤九的定标曲线方程,计算出对应的浓度值。

[0016] 优选的,步骤二中,包括样品预处理、试剂添加、混匀、反应、洗涤和分离。

[0017] 优选的,步骤五中,红光滤波片、红外滤波片及报告值滤波片配有切换装置,用于将任一滤波片调整至至光学轴线上。

[0018] 优选的,步骤六具体为:

[0019] S6.1,灰度化处理:

[0020] 通过平均算法将红光照片与红外光照片的RGB值转换灰度值,

$$[0021] \quad I(x, y) = \frac{I_R(x, y) + I_G(x, y) + I_B(x, y)}{3}$$

[0022] 其中, I 表示当前坐标点 (x, y) 的灰度值, I_R 、 I_G 、 I_B 分别为红色分量、绿色分量、蓝色分量的值;

[0023] S6.2,高斯滤波处理:

[0024] 用一个3x3模板扫描图像中的每一个像素,用模板确定的领域内像素的加权平均灰度值去替代模板中心像素点的值,高斯滤波的3x3的匹配模板如下,

$$[0025] \quad \begin{vmatrix} I(i-1, j-1) & I(i-1, j)*2 & I(i-1, j+1) \\ I(i, j-1)*2 & I(i, j)*4 & I(i, j+1)*2 \\ I(i+1, j-1) & I(i+1, j)*2 & I(i+1, j+1) \end{vmatrix} \div 16$$

[0026] 其中, $I(i, j)$ 表示当前像素;

[0027] 离散化窗口滑窗卷积实现高斯滤波,卷积中每个像素点的值由其本身和领域内的其他像素经过加权平均后得到,上述匹配模板为二维数组所存放的系数,对于大小为 $(2k+1) \times (2k-1)$ 的窗口模板,各个元素的计算公式为,

$$[0028] \quad H(i, j) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(i-k-1)^2 + (j-k-2)^2}{2\sigma^2}}$$

[0029] 其中, $H(i, j)$ 表示当前窗口模板中第 i 行、第 j 列像素点的元素值, k 表示窗口模板的取值, σ 表示标准差;

[0030] S6.3,伽马变换图像校正:

[0031] 对原图像上每一个像素值做乘积运算,

$$[0032] \quad G = c * r^\gamma$$

[0033] 其中, c 为常数系数, r 为图像的像素值,取值范围0~255, γ 为伽马变换因子, γ 值以1为分界,值越小,对图像低灰度部分的扩展作用就越强,值越大,对图像高灰度部分的扩展作用就越强的图像增强效果明显;

[0034] S6.4, JPEG压缩。

[0035] 优选的,步骤九中,采用Logistic回归模型拟合定标曲线方程,

$$[0036] \quad y = A + (B - A) / (1 + e^{-a*x+b})$$

[0037] 其中, y 表示因变量即浓度值, x 表示自变量即报告灰度值, A 表示曲线的下限或起始值, B 表示曲线的上限或饱和值, a 表示曲线的斜率参数, b 表示曲线的平移参数。

[0038] 优选的,步骤九中,同一张照片被激发出来的荧光值与靶值的偏差超过10%时,根

据校准的数据及偏差自动将超过10%的荧光值进行区域划分,得到新的定标曲线方程,后续测量使用对应的定标曲线方程。

[0039] 本发明具有如下有益效果:

[0040] 1. 自动化:利用自动化设备进行样本处理和分析,减少了人工操作的误差,提高了检测的准确性和可重复性;

[0041] 2. 灵敏度高:通过将待测样本与试剂中的磁珠抗体相互作用,并通过SAPE放大荧光信号,可以提高检测的灵敏度,使得低浓度目标物也能够被准确检测到;

[0042] 3. 多项目、多参数分析:能够同时检测多个项目,通过灰度图像的分析和计算,最多可进行50种微球的正常分类,可以确定微球的种类分布图,并计算出每个项目微球的报告灰度值;

[0043] 4. 高效:分为红光光源和绿光光源,红光光源进行分类,绿光光源进行报告值的采集,一分钟内对2000个混合微球进行分类,并精确采集每种微球的报告值;

[0044] 5. 定量测量:通过使用定标曲线方程,根据报告灰度值计算出对应的浓度值,实现了目标物浓度的定量测量;

[0045] 6. 自动校正:根据校准的数据及偏差自动将超过10%的荧光值进行区域划分,得到不同的方程,保证测量的精确性;

[0046] 7. 高通量:该方法能够同时处理多个样本,提高了检测效率,通过批量处理样本,可以大大缩短检测时间,仪器具有100个样本孔位,可在1.5个小时之内全部出结果。

附图说明

[0047] 图1为本发明实施例检测方法的流程示意图。

[0048] 图2为本发明实施例检测方法中液态悬浮芯片检测仪的示意图。

[0049] 图3为本发明实施例中液态悬浮芯片检测仪的滤光片组件的示意图。

[0050] 图4为本发明实施例中确定微球群对应项目的示意图。

[0051] 图5为本发明实施例中确定报告灰度值的示意图。

[0052] 相机1,滤光片组件2,镜头组件3,成像室组件4,检测池组件5,光源组件6,焦距调节组件7,底座8。

具体实施方式

[0053] 下面结合实施例与附图,对本发明作进一步说明。

[0054] 如图1所示,为一种全自动液态悬浮芯片检测方法的流程图,现对其详细步骤介绍如下。

[0055] 步骤一,吸样。

[0056] 使用自动化系统或设备从待测样本中抽取适当的体积。利用系统的吸液器、液体工作站和样品架等设备,将待测试剂(混合微球,抗体,SAPE)放置在试剂区域,待检测样本放置在样本区域,仪器能自动吸样吸取试剂和样本。根据预设的程序、液体体积和位置信息来准确地吸取待测样本。具有高精度、高速度和高重复性的特点。

[0057] 步骤二,样本处理。

[0058] 使用液体处理系统、微流控芯片或其他自动化设备进行全自动样本处理。包括样

品预处理、试剂添加、混匀、反应、洗涤和分离等步骤。全自动样本处理可以通过程序控制，按照预定的时间和顺序进行各个步骤的操作，对样品的高效处理，实现样本和试剂中的磁珠抗体相结合，并通过SAPE放大荧光信号。

[0059] 具体的，配套试剂盒中含有多种具有不同荧光编码的聚苯乙烯磁性微球，微球表面分别偶联了不同的检测抗体，微球上的捕获抗体分别与待测样本中对应的抗原特异性结合后，再分别与12种对应的生物素标记的抗体结合，形成双抗夹心免疫复合物，最后12种检测抗体上的生物素与SAPE（链霉亲和素-藻红蛋白）结合，形成最终免疫复合物（聚苯乙烯磁性微球+捕获抗体+待测物质+生物素标记的抗体+SA-PE）。

[0060] 步骤三，二次吸样。

[0061] 经过样本处理步骤后，同样使用自动化设备将处理完成的样品吸取到下一个处理或分析环节，即图2所示的液态悬浮芯片检测仪中。

[0062] 步骤四，固定磁珠位置。

[0063] 利用磁力将磁珠吸附到检测池的预定位置。检测池作为仪器液路的一部分，通过进样接头与出样接头接入液路中。当带有磁珠的试剂流经检测池时，磁珠被吸附在检测池靠近磁性件的部位，液体试剂正常流出检测池。此处的磁性件可采用永磁体，利用马达伸缩靠近检测池，也可采用电磁体的形式来实现。

[0064] 步骤五，采集照片信息。

[0065] 参考图2、3，各照片的采集步骤具体如下：

[0066] S5.1，先启动光源组件中的红光源组件，红色LED点亮，激发磁珠生成一束红光，一束红外光，滤光片组件2的红光滤光片调整至相机1和镜头组件3之间，采集微珠生成的红光照片；

[0067] S5.2，滤光片组件2的红外光滤光片调整至相机1和镜头组件3之间，采集微珠生成的红外光照片；

[0068] S5.3，启动光源组件6中的绿光源组件，将滤光片组件2的报告值滤光片调整至相机1和镜头组件3之间，采集微珠的报告值照片。

[0069] 步骤六，图片处理。

[0070] S6.1，灰度化处理。

[0071] 相机1的CMOS传感器采集出来的图像是RGB值，通过平均算法将红光照片与红外光照片的RGB值转换灰度值，

$$[0072] \quad I(x, y) = \frac{I_R(x, y) + I_G(x, y) + I_B(x, y)}{3}$$

[0073] 其中， I 表示当前坐标点 (x, y) 的灰度值， I_R 、 I_G 、 I_B 分别为红色分量、绿色分量、蓝色分量的值。

[0074] S6.2，高斯滤波处理。

[0075] 高斯滤波是将图像频域处理和时域处理相联系，作为低通滤波器使用，可以将低频能量滤去，起到图像平滑作用。高斯滤波是一种线性平滑滤波，是对整幅图像进行加权平均的过程，每一个像素点的值，都由其本身和模板领域内的其他像素值经过加权平均后得到。

[0076] 高斯滤波的具体操作是：用一个3x3模板扫描图像中的每一个像素，用模板确定的

领域内像素的加权平均灰度值去替代模板中心像素点的值,高斯滤波的3x3的匹配模板如下,

$$[0077] \quad \begin{vmatrix} I(i-1, j-1) & I(i-1, j)*2 & I(i-1, j+1) \\ I(i, j-1)*2 & I(i, j)*4 & I(i, j+1)*2 \\ I(i+1, j-1) & I(i+1, j)*2 & I(i+1, j+1) \end{vmatrix} \div 16$$

[0078] 其中, $I(i, j)$ 表示当前像素。

[0079] 高斯滤波有两种实现方式,一是用离散化窗口滑窗卷积,另一种通过傅里叶变换。本实施例采用离散化窗口滑窗卷积实现,卷积中每个像素点的值都是由其本身和领域内的其他像素经过加权平均后得到。上述匹配模板为二维数组所存放的系数,对于大小为 $(2k+1) \times (2k-1)$ 的窗口模板,各个元素的计算公式为,

$$[0080] \quad H(i, j) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} e^{-\frac{(i-k-1)^2 + (j-k-2)^2}{2\sigma^2}}$$

[0081] 其中, $H(i, j)$ 表示当前窗口模板中第 i 行、第 j 列像素点的元素值, k 表示窗口模板的取值, σ 表示标准差。

[0082] S6.3,伽马变换图像校正。

[0083] 伽马变换主要用于图像的校正,将灰度过高或者灰度过低的图片进行修正,增强对比度,简单的说就是让图像从曝光强度的线性响应变得更接近人眼感受的响应。变换公式就是对原图像上每一个像素值做乘积运算,

$$[0084] \quad G = c * r^\gamma$$

[0085] 其中, c 为常数系数, r 为图像的像素值,取值范围0~255, γ 为伽马变换因子, γ 值以1为分界,值越小,对图像低灰度部分的扩展作用就越强,值越大,对图像高灰度部分的扩展作用就越强的图像增强效果明显。通过不同的 γ 值,就可以达到增强低灰度或者高灰度部分细节的作用。伽马变化对于图像对比度偏低,并且整体亮度值偏高情况下的图像增强效果明显。

[0086] S6.4, JPEG压缩。

[0087] JPEG 压缩标准是一个用于灰度或彩色图象的压缩标准,它使用离散的余玄变换(DCT)、量化、行程和哈夫曼编码等技术,是一种混合编码标准。

[0088] JPEG 定义了如下两种基本的压缩算法:基于空间线性预测技术,即 PCM 的无失真压缩算法;基于 DCT的有失真压缩算法,并进一步应用行程编码和熵编码。PCM 的无失真压缩算法具有硬件实现容易、重见图象质量好的优点,本实施例采用的即是该方法。

[0089] 步骤七,确定微球群对应项目。

[0090] 参考图4,根据灰度图片计算红光和红外光的灰度值,由红光和红外光的灰度值形成微球的种类分布图,则每个微球群对应的项目是已知的。

[0091] 步骤八,确定报告灰度值。

[0092] 参考图5,计算每个点的报告值灰度,采用中位数的方法得到每个项目微球群的报告灰度值。

[0093] 步骤九,获取定标曲线方程。

[0094] 利用已知浓度值的试剂定标品,通过对报告灰度值与浓度值进行回归分析,获得定标曲线方程。具体的,采用Logistic回归模型拟合定标曲线方程,

$$[0095] \quad y = A + (B - A) / (1 + e^{-a*x+b})$$

[0096] 其中, y 表示因变量即浓度值, x 表示自变量即报告灰度值, A 表示曲线的下限或起始值, B 表示曲线的上限或饱和值, a 表示曲线的斜率参数, b 表示曲线的平移参数。

[0097] 在实践过程中会遇到同一张照片被激发出来的荧光值与靶值的偏差超过10%的情况,主要原因是激发光源的亮度值有差异,后果是引起数据的错误。本实施例根据校准的数据及偏差自动将超过10%的荧光值进行区域划分,从而得到新的定标曲线方程,后续测量均会使用对应的方程。

[0098] 步骤十,计算浓度值。

[0099] 根据步骤八的报告灰度值,使用步骤九的定标曲线方程,即可计算出对应的浓度值。

[0100] 显然,本发明的上述实施例仅仅是为了说明本发明所做的举例,而并非对本发明的实施方式的限定。其他由本发明的实质精神所引申出的显而易见的变化或变动仍属于本发明的保护范围。

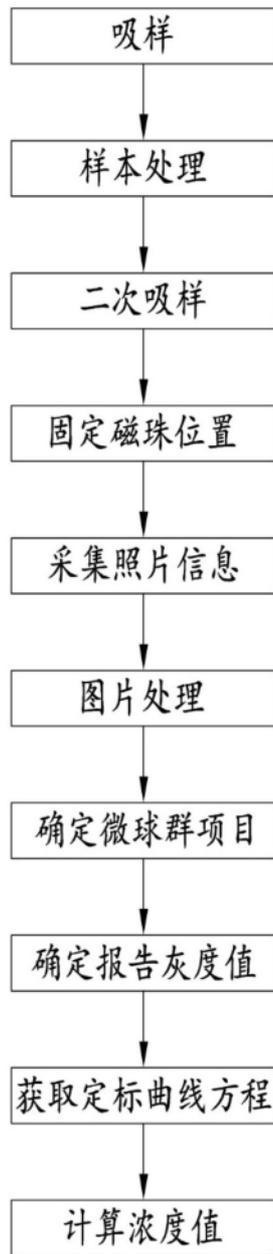


图1

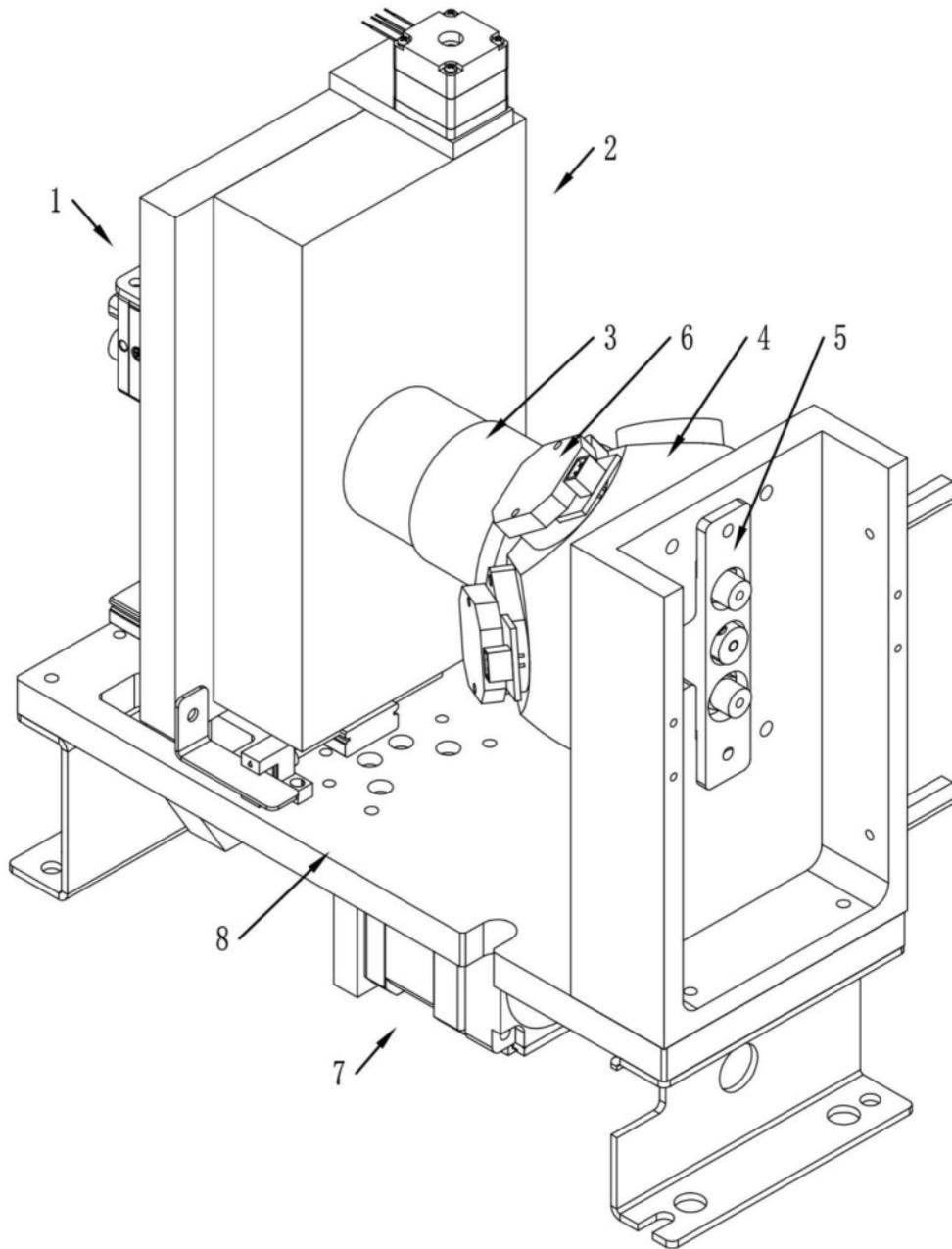


图2

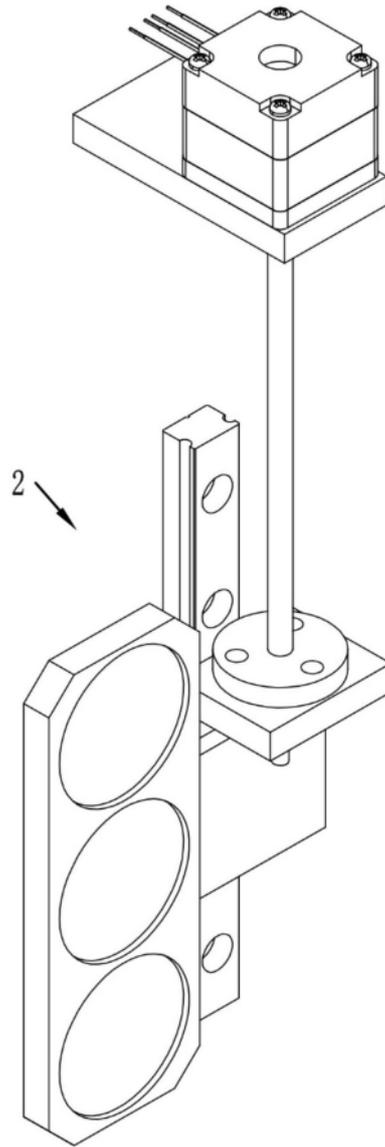


图3

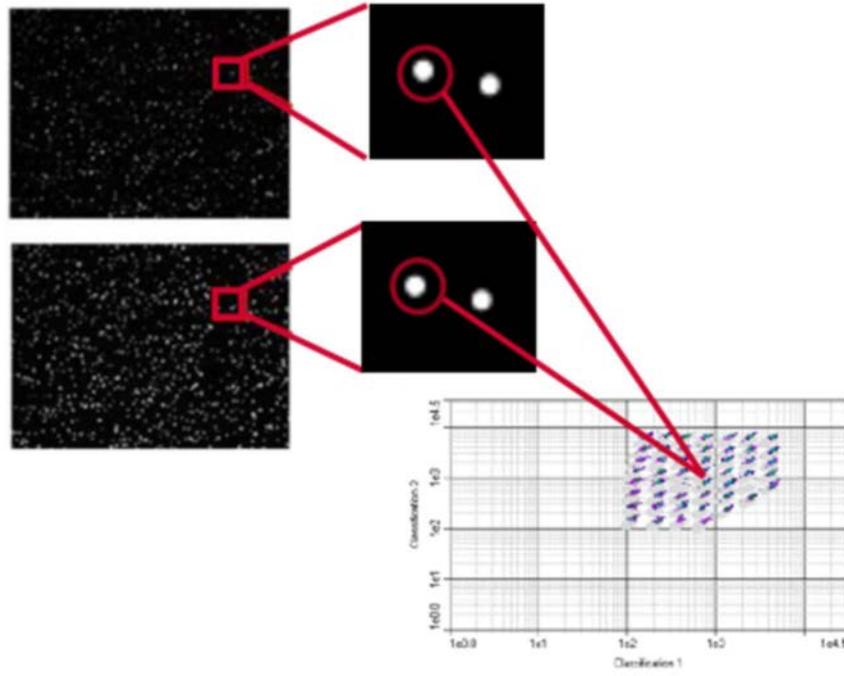


图4

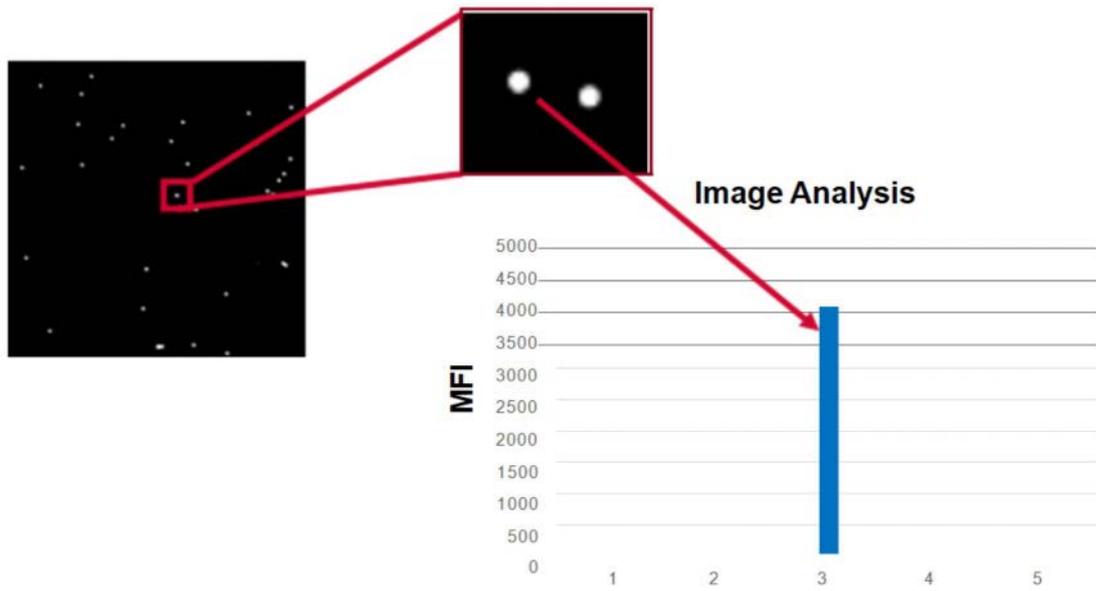


图5