

基于显微镜数字图像的荧光免疫层析定量检测方法

李婷婷¹, 冯大伟^{1*}, 李琦¹, 向阳¹, 贾强², 路雨桐¹, 赵阳¹

¹长春理工大学光电工程学院, 吉林 长春 130022;

²中国科学院上海光学精密机械研究所空间激光工程技术实验室, 上海 201800

摘要 荧光免疫层析定量检测技术已被广泛应用于临床检测领域,如新型冠状病毒肺炎的筛查和检测。为了提高检测精准度,提出了基于荧光显微镜数字图像处理的荧光免疫层析定量检测方法。首先构建了显微系统的光通量损失方程,然后根据面阵 CCD 输出的数字图像特征提取原始图像中的 RGB 分量并对其进行加权处理,之后拟合了面阵 CCD 的量子响应速率曲线,获得了荧光信号的相对强度。根据荧光信号强度即可反演出待测物的浓度。实验验证后可知,检测结果的变异系数为 3.04%,线性拟合系数大于 0.99。本检测方法可对最低质量浓度为 0.1 ng/mL 的待测物进行准确检测,适用于 CCD 成像型荧光显微镜系统,对荧光检测具有一定的参考意义。

关键词 生物光学; 光通量损失; 数字图像处理; 面阵 CCD; 定量检测; 荧光免疫层析

中图分类号 O432

文献标志码 A

doi: 10.3788/CJL202047.1107001

Quantitative Detection Method of Fluorescence Immunochromatography Based on Microscopic Digital Image

Li Tingting¹, Feng Dawei^{1*}, Li Qi¹, Xiang Yang¹, Jia Qiang², Lu Yutong¹, Zhao Yang¹

¹School of Opto-Electronic Engineering, Changchun University of Science and Technology,
Changchun, Jilin 130022, China;

²Laboratory of Space Laser Engineering, Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics,
Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China

Abstract Fluorescence immunochromatographic quantitative detection technology has been widely used in the field of clinical detection, such as for the screening and detection of the new coronavirus pneumonia. To improve the detection accuracy, a fluorescence immunochromatographic quantitative detection method based on fluorescence microscope digital image processing is proposed. Initially, the luminous flux loss equation of the microscopy system is constructed. Then, the RGB components in the original image are extracted according to the digital image features output by the area array CCD, and the quantum response rate curve of the area array CCD is fitted after weighting to compensate. Finally, the relative intensity of the fluorescence signal is obtained, and the concentration of the analyte is inverted according to the intensity of the fluorescence signal. After experimental verification, it can be observed that the coefficient of variation of the test results is 3.04%, and the linear fitting coefficient is > 0.99 . This detection method can accurately detect the analyte with a minimum mass concentration of 0.1 ng/mL. It is suitable for CCD imaging fluorescent microscope system and has certain reference significance for fluorescence detection.

Key words biotechnology; luminous flux loss; digital image processing; area array CCD; quantitative detection; fluorescence immunochromatography

OCIS codes 030.5620; 100.2000; 040.1520

1 引 言

荧光免疫层析试纸检测技术是基于免疫层析

技术发展而来的,该技术用荧光标记抗原或抗体,通过检测荧光强度就可以实现待测物浓度的检测^[1-2]。目前,荧光免疫层析定量检测可分为光电

收稿日期: 2020-05-09; 修回日期: 2020-06-16; 录用日期: 2020-06-28

基金项目: 吉林省科技发展计划(20160203009YY)

* E-mail: livid_david@163.com

检测法和成像式检测法。光电检测法将光电二极管或光电倍增管作为探测器, ESE Quant 定量侧向层析检测仪^[3-4]是其中最具代表性的设备。这类分析仪利用步进电机带动试纸条运动, 并利用扫描镜头对检测试纸进行扫描, 然后将光信号转化为电信号, 根据输出的电压值计算被测样品的荧光强度^[5-7]。成像式检测法是在成像系统后利用 CCD 获取试纸条的荧光图像^[8-10], 然后对图像进行处理得到荧光强度信息。2018 年, 徐笑晗等^[11]利用手持显微镜和 CCD 设计了荧光免疫层析试纸条成像检测系统, 此系统采用算法提取图像中的荧光面积, 然后根据图像的平均灰度值推算荧光强度。光电检测法对机械扫描系统稳定性的要求较高, 且容易受背景光的影响。成像式检测方法则忽略了系统的光通量损失, 并且将彩色图像整体转化为灰度图像, 细分度只有 256 级^[12-13], 对试纸条最

低灵敏度的检测精度有待提高。

本文首先利用荧光显微镜系统对荧光物质进行激发和探测, 建立显微系统的光通量损失方程, 计算待测荧光到达 CCD 像面过程中的光通量损失, 然后基于 CCD 像元的光电转化特性提取数字图像的 RGB 分量并对其进行加权处理, 最后拟合了面阵 CCD 的量子响应速率曲线。通过计算补偿后的 RGB 分量亮度加权值来确定荧光强度, 然后就可以反演出待测物的浓度。

2 光通量损失方程的建立

光学系统具有一定的透过率, 输出的光通量要比输入的光通量少, 光能损失会使光学系统成像的光能量降低。为了获得准确的光强信息, 根据几何光学及光度学^[14-15]可得到光学成像系统的数学模型, 如图 1 所示。

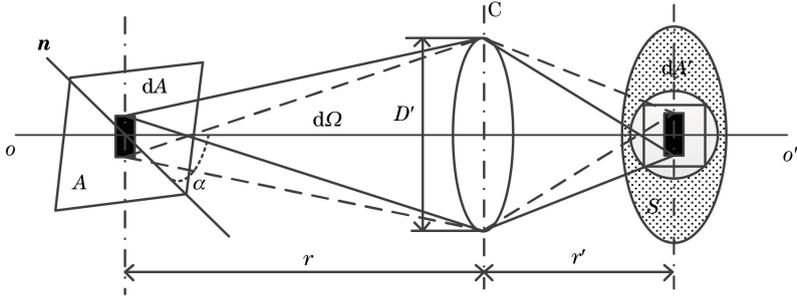


图 1 光学成像系统数学模型示意图

Fig. 1 Schematic of optical system imaging

当发光面与探测面 S 不平时, 元发光面的法线 n 与中心光轴 oo' 的夹角为 α 。若元立体角 $d\Omega$ 内发出的光通量为 $d\Phi_V$, 则发光面的光亮度 L_V 为

$$L_V = \frac{d\Phi_V}{\cos \alpha dA d\Omega}, \quad (1)$$

式中: $\frac{d\Phi_V}{d\Omega} = I_V$, 相当于发光面在 α 方向的发光强度; dA 为发光面的元面积。故(1)式所示的光亮度公式可以写成

$$L_V = \frac{I_V}{\cos \alpha dA}. \quad (2)$$

透镜 C 与发光面立体角 ω 之间的关系为

$$\omega \approx \frac{\pi D'^2}{4r^2} = \frac{\pi D'^2}{4r^2}, \quad (3)$$

式中: D' 为孔径光阑的直径; r 为物距。因透镜存在一定的透过率, 故而光在传输过程中会产生一定程度的能量损失。根据光的传播规律, 探测面 S 处的光通量 Φ_V 为

$$\Phi_V = I_V \times \omega \tau = L_V \cdot \cos \alpha \cdot dA \cdot \frac{\pi D'^2}{4r^2} \tau, \quad (4)$$

式中: τ 为透镜 C 的透过率。由几何关系可得

$$\frac{dA'}{dA \cos \alpha} = \frac{r'^2}{r^2}, \quad (5)$$

则探测面 dA' 的照度 E_V 为

$$E_V = \frac{\Phi_V}{dA'} = \frac{\pi \tau D'^2}{4r'^2} L_V. \quad (6)$$

(6) 式为光通量损失基本方程。针对荧光显微镜系统的结构特征(发光面与探测面平行, 且激发与探测同光路), 设计了光学传输模型。根据光通量损失基本方程分析荧光显微系统的光通量损失。图 2 为检测系统结构示意图。

激发光源采用高压汞灯与窄带滤光片的组合, 窄带滤光片的中心波长为 365 nm, 半带宽为 10 nm。激发后的荧光经过二向色镜和阻断滤光片后由 CCD 接收。考虑到荧光显微镜系统中的二向色镜和阻断滤光片都会使光在传输过程中产生一定

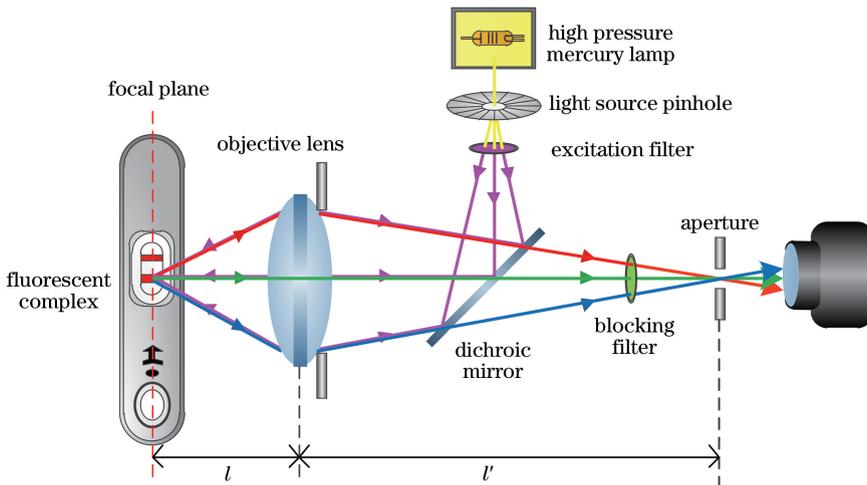


图 2 检测系统光学结构示意图

Fig. 2 Schematic of optical structure of detection system

的损失,根据光通量损失基本方程,建立了荧光显微系统的光通量损失方程,即

$$E_Y = \frac{\pi\tau\varepsilon\gamma}{4f_m^2} \left(1 - \frac{f}{l}\right)^2 L_0, \quad (7)$$

式中: E_Y 为 CCD 像面上接收的照度; L_0 为荧光亮度; ε 为二向色镜的透过率; γ 为阻断滤光片的透过率; f 为物镜的焦距; l 为物镜的物距; f_m 为物镜的 F 数。

在进行检测时,系统中的 l 及 f 保持不变,则

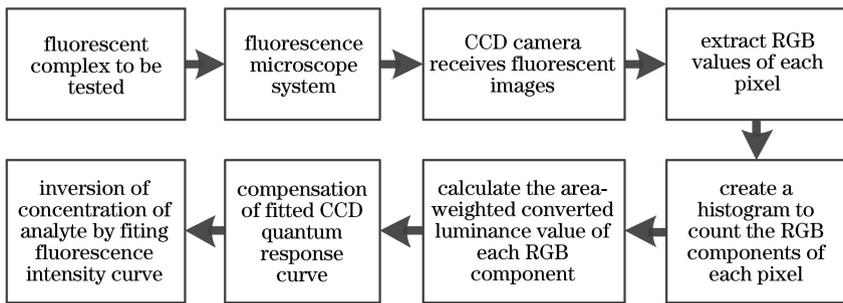


图 3 检测方法流程图

Fig. 3 Flow chart of detection method

(7)式中的 $\frac{\pi\tau\varepsilon\gamma}{4f_m^2} \left(1 - \frac{f}{l}\right)^2$ 是一个常数。在激发光强度不变的情况下,CCD 像面上的照度与检测试纸的荧光亮度呈线性关系,通过确定像面的照度就可以计算出荧光亮度值。通过(7)式可以计算出显微系统在实际检测中的光通量损失,从而能准确计算待测试纸的荧光强度,提升检测准确度。此外,在设计过程中选用透过率高的光学材料可以减少光通量损失。本文检测方法流程图如图 3 所示。

3 CCD 数字图像的处理方法

本文使用维视图像 MV-EM510M/C 型工业相机采集荧光信息,表 1 为 CCD 的相关参数。

面阵 CCD 的每一个像元都可以看作是一个光电二极管^[16]。本文所用工业 CCD 的像元尺寸为 $3.45 \mu\text{m} \times 3.45 \mu\text{m}$,有效感光面积为 $8.5 \text{ mm} \times 7.1 \text{ mm}$,可以简单地将其看成是由 500 万个光电二极管组成的面阵探测器。面阵 CCD 成像原理如图 4 所示。

表 1 CCD 相关参数

Table 1 CCD related parameters

Parameter	Content
Highest resolution	2456×2058
Optical size	2/3
Maximum frame rate / (frame·s ⁻¹)	15
Exposure time / μs	30-5000000
Pixel size / (μm×μm)	3.45×3.45
Photosensitive area / (mm×mm)	8.5×7.1
Data bits	8/14

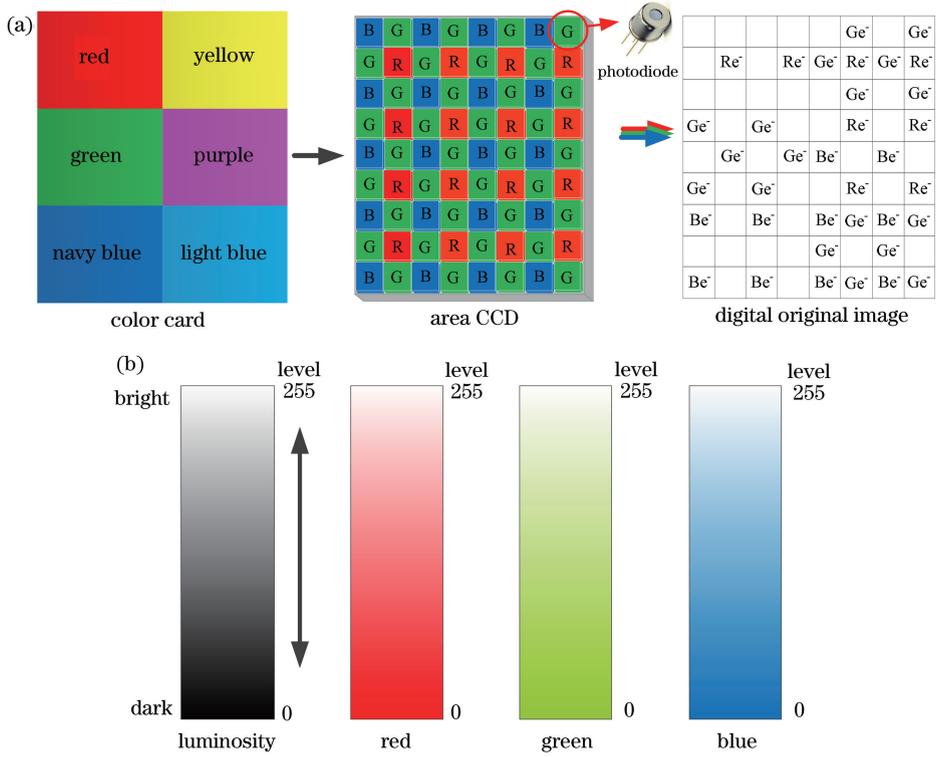


图 4 面阵 CCD 成像原理示意图。(a) CCD 成像原理简图；(b) RGB 亮度阶梯

Fig. 4 Schematics of area array CCD imaging. (a) Schematic of CCD imaging principle; (b) RGB brightness ladder

维视图像 MV-EM510M/C 型工业相机的拜耳滤光片以 BGGR 方式排列,图 4(a)是成像原理简图。由 CCD 获得色卡上的数字图像信息,CCD 的处理单元对数字图像信息进行空间色彩插值运算^[17],最终输出图像。在图 4(b)中可以看到,传感器的亮度值分为 256 个阶梯,每个 RGB 通道也可以分为 256 个亮度阶梯。如果将亮度区间范围加大,

就可提高检测的精准度。

利用 CCD 输出的数字图像信息得到原始图像的 RGB 分量,然后再对每个 RGB 像元的亮度值进行统计分析。利用 MATLAB 统计质量浓度为 50 ng/mL 尿孕酮标准检测样品的数字图像信息后,就可以计算得到 RGB 像元亮度直方图,如图 5 所示。

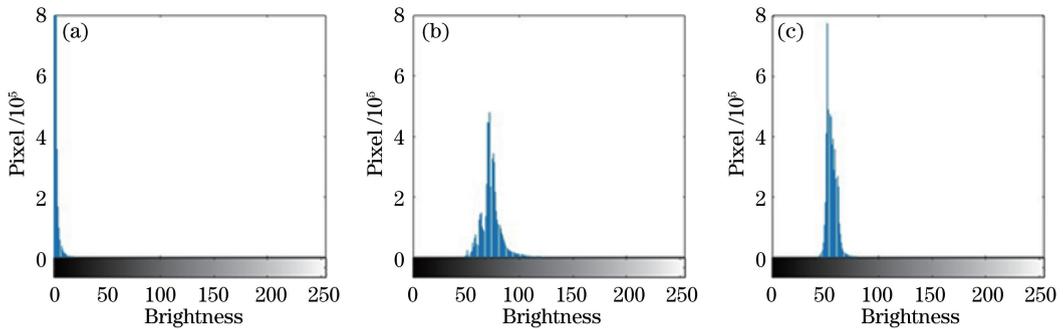


图 5 RGB 像元亮度直方图。(a) R 分量像元亮度直方图；(b) G 分量像元亮度直方图；(c) B 分量像元亮度直方图

Fig. 5 RGB component pixels brightness histogram. (a) R component pixel brightness histogram; (b) G component pixel brightness histogram; (c) B component pixel brightness histogram

图 5(a)为 R 分量的亮度直方图,纵坐标表示所占的像元数,横坐标表示亮度值,R 分量所占的亮度范围在 0~40 之间,相对亮度较弱。图 5(b)与图 5(c)分别为 G 分量和 B 分量的亮度直方图,其中 G 分量所占的亮度范围在 50~150 之间,B 分量所占

的亮度范围在 40~100 之间,且相对亮度较强。

为了提升亮度区间范围,将亮度值与像元数做乘积运算,得到 RGB 分量的亮度加权值,利用加权后的亮度值计算 CCD 像面上的电子响应亮度值 E'_Y 。通常使用常规色域系统的数字亮度方程描述

RGB 信号与亮度信号的关系^[18], 即

$$E'_Y = 0.299E'_R + 0.587E'_G + 0.114E'_B, \quad (8)$$

式中: E'_R 、 E'_G 、 E'_B 分别为 R、G、B 分量的亮度加权值。经计算可知 $E'_R = 65.16385 \times 10^5$, $E'_G = 3973.60052 \times 10^5$, $E'_B = 3148.34580 \times 10^5$, 从而可以得到 CCD 像面上的电子响应亮度值 $E'_Y = 2170.90190 \times 10^5$ 。

此外, 由于 CCD 存在一定的量子转化效率, 在将光子转化为电子的过程中, 接收的光子数和响应的电子数会受到入射波长的影响。为了减小检测误差, 需要对 CCD 像面上的电子响应亮度值进行补偿, 其中 CCD 的量子响应速率曲线如图 6 所示。

激发后的荧光的中心波长为 615 nm, 其对应的量子响应速率接近 0.8。拟合量子响应速率曲线后, CCD 像面上接收的照度 E_Y 为

$$E_Y = \frac{E'_Y}{0.8}. \quad (9)$$

经计算可知 $E_Y = 3388.62737 \times 10^5$, 将其代入荧光显微系统的光通量损失方程, 可求得荧光亮度 L_0 。

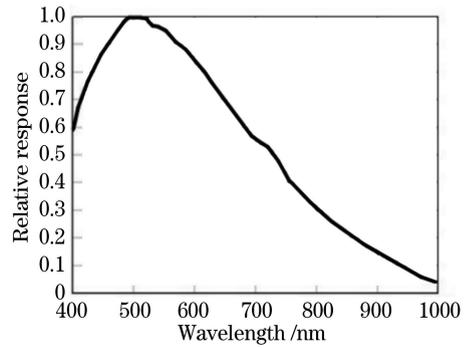


图 6 量子响应速率曲线

Fig. 6 Quantum response rate curve

4 实验结果及分析

常用的免疫荧光层析法有竞争法和夹心法。竞争法的待检分子浓度与荧光强度呈负相关, 而夹心法与竞争法相反, 待检分子数越多, 激发的荧光越强^[19-20]。用竞争法标记的尿孕酮(P)标准样品的荧光免疫反应原理如图 7 所示。

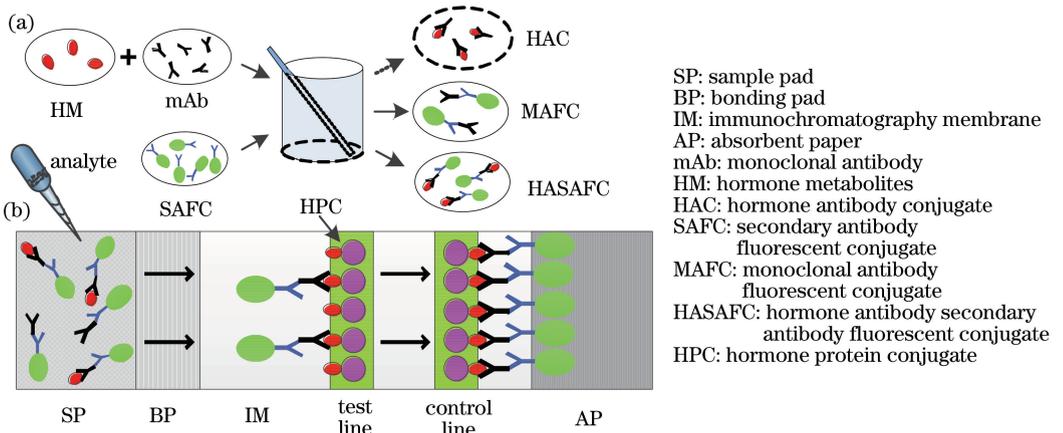


图 7 荧光免疫反应原理。(a)待测溶液的制备;(b)试纸结构

Fig. 7 Principle of fluorescence immunity reaction. (a) Preparation of test solution; (b) structure of test paper

首先需要配制待测溶液, 如图 7(a) 所示。第一步, 在烧杯中加入浓度未知的激素代谢物(HM)和浓度已知的单抗(mAb)。为了实现有效检测, 确保在试纸检测范围内每个激素代谢物(HM)都可以与单抗(mAb)反应, 加入单抗(mAb)的量要与事先固定在试纸检测线上的激素-蛋白结合物(HPC)相等。此时, 所有激素代谢物(HM)与单抗抗体(mAb)结合生成激素抗体结合物(HAC)。第二步, 在烧杯中加入与单抗(mAb)等量的二抗荧光结合物(SAFC), 二抗荧光结合物(SAFC)与第一步反应剩余的单抗抗体(mAb)结合成单抗-二抗-荧光结合物(MAFC); 与此同时, 二抗荧光结合物(SAFC)与第

一步反应生成的激素抗体结合物(HAC)结合, 生成激素抗体-二抗-荧光结合物(HASAFC)。

图 7(b) 为标准检测试纸。该试纸可检测的质量浓度范围是 0.1~100 ng/mL, 试纸的主要结构有样品垫(SP)、结合垫(BP)、层析膜(IM)、检测线 T、质控线 C、吸水纸(AP)等, 其中在检测线 T(以下简称“T 线”)上事先固定了激素-蛋白结合物(HPC), 并对质控线 C(以下简称“C 线”)进行了荧光标记。将配制好的待测溶液滴在样品垫(SP)上, 待测溶液在虹吸力作用下向吸水纸(AP)方向移动。当待测溶液流经 T 线时, 单抗-二抗-荧光结合物(MAFC)会与事先固定在检测线上的激素-蛋白结

合物(HPC)结合,其余物质继续向前层析。最后通过检测荧光亮度进行定量检测,荧光亮度值与激素代谢物(HM)的浓度成反比,激素代谢物(HM)的浓度越高,荧光亮度越低。

激素代谢物(HM)的浓度与荧光亮度之间的关系式为

$$\eta_0 = \eta - \frac{L_0}{K_e}, \quad (10)$$

式中: η_0 为激素代谢物(HM)的分子数; η 为单抗(mAb)的分子数; K_e 为发光系数。激素代谢物(HM)的分子数和与之结合的单抗分子数一致,而剩余的单抗分子数可以通过检测 T 线的荧光亮度获得,因此可以计算得到激素代谢物(HM)的浓度。

第一次实验时,将质量浓度远超 100 ng/mL 的尿孕酮激素代谢物溶液滴入空白试纸上,C 线发光,T 线不发光。保持荧光显微镜的光源亮度值恒定,分别检测 C 线和 T 线的荧光信号强度,并规定 C 线和 T 线的相对荧光信号强度值为 100000 和 0,则激素代谢物(HM)的相对荧光信号强度值在 0~100000 区间内。

选取 12 组不同浓度的尿孕酮(P)标准样品滴入空白试纸条上进行检测。根据相对荧光信号强度值与浓度的关系,采用最小二乘法进行线性回归分析,拟合后的数据如图8所示。为了检验测试结果

表 2 拟合结果

Table 2 Fitting result

Item	Our experiment	ESE Quant
Linear expression	$y_1 = -986.0339x_1 + 10.9533$	$y_2 = 34.37304x_2 + 0.6281$
Linear fit	$R_1^2 = 0.9986$	$R_2^2 = 0.9963$

再选取质量浓度为 0.5 ng/mL 的尿孕酮(P)标准样品,将其滴在空白试纸条上,在检测条件不变的情况下进行 12 次检测,得到的数据如图 9 所示。

的准确性,将本实验结果与 ESE Quant 定量侧向层析检测仪的测量结果进行对比。

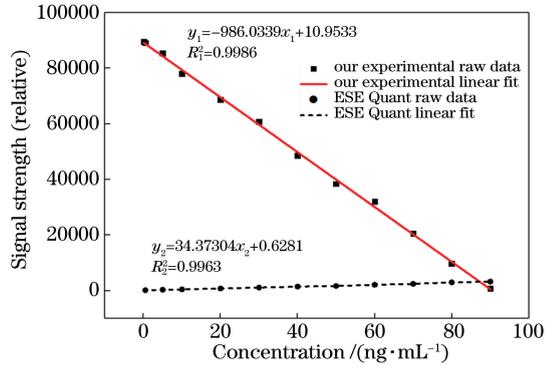


图 8 不同浓度尿孕酮(P)分子的荧光信号强度曲线
Fig. 8 Fluorescence signal intensity curves of urine progesterone (P) molecule with different mass concentrations

图 8 中的黑色虚线表示 ESE Quant 定量侧向层析检测仪的检测结果,实线表示本文检测结果。由于将亮度进行了加权处理,扩大了亮度区间,因此,可以明显看出实线上每个采样点的纵坐标相距更远,具有较高的细分度。分析计算后得到的数据拟合结果如表 2 所示,ESE Quant 定量侧向层析检测仪的线性拟合度 $R_2^2 = 0.9963$,本文检测方法的线性拟合度 $R_1^2 = 0.9986$ 。可见,本文方法得到的激素代谢物(HM)浓度与荧光亮度信号具有更高的线性拟合度。

式中: $\sigma(X)$ 表示样本数据的标准差; $E(X)$ 表示样本数据的平均值。经计算可知 C_v 值为 3.04%,满足检测标准。

5 结 论

本文介绍了基于荧光显微镜数字图像处理的荧光免疫层析定量检测方法。本文首先构建了显微系统的光通量损失方程,然后对提取的 RGB 分量进行加权处理,增大亮度区间的范围,之后拟合了面阵 CCD 的量子响应速率曲线,最后获得了荧光强度值,并根据荧光强度反演出了待测物尿孕酮(P)的浓度。经计算可知检测结果的变异系数为 3.04%,相关拟合系数大于 0.99。

本文检测方法具有较好的重复性和线性拟合度,对荧光检测具有一定的参考价值。

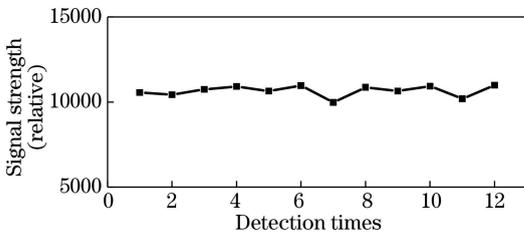


图 9 检测结果

Fig. 9 Test results

检测结果的变异系数(C_v)为

$$C_v = \frac{\sigma(X)}{E(X)}, \quad (11)$$

参 考 文 献

- [1] Choi S, Choi E Y, Kim D J, et al. A rapid, simple measurement of human albumin in whole blood using a fluorescence immunoassay (I) [J]. *Clinica Chimica Acta*, 2004, 339(1/2): 147-156.
- [2] Steichen S D, Caldorera-Moore M, Peppas N A. A review of current nanoparticle and targeting moieties for the delivery of cancer therapeutics [J]. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2013, 48(3): 416-427.
- [3] Euler M, Wang Y J, Otto P, et al. Recombinase polymerase amplification assay for rapid detection of *Francisella tularensis* [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 2012, 50(7): 2234-2238.
- [4] Jin L Z, Jun H, Xiao C L. Comparative study between ABBOTTi2000 automatic luminometer and immuno i-CHROMA reader immunofluorescence analyzer in the detection of total prostate-specific antigen [J]. *Chinese Journal of New Clinical Medicine*, 2011, 4(4): 179-187.
- [5] Huang L H, Zhou L, Zhang Y B, et al. A simple optical reader for upconverting phosphor particles captured on lateral flow strip [J]. *IEEE Sensors Journal*, 2009, 9(10): 1185-1191.
- [6] Wang Y F, Yu D S, Chen H Y, et al. Portable rapid microRNA detection system [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2018, 26(3): 541-547.
王燕飞, 余东升, 陈海燕, 等. 便携式 MicroRNA 快速检测系统 [J]. *光学精密工程*, 2018, 26(3): 541-547.
- [7] Wang S S, Huang K, Li M, et al. Quantitative optical detection method of hemoglobin based on BP neural network [J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(7): 0717002.
王姗姗, 黄凯, 李铭, 等. 基于 BP 神经网络的血红蛋白定量光学检测方法 [J]. *光学学报*, 2018, 38(7): 0717002.
- [8] Liu J, Zhao J B, Liu W J, et al. Gene chip microarray fluorescent spots images CCD scanning and acquiring system [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2010, 37(2): 505-509.
刘军, 赵吉宾, 刘伟军, 等. 基因芯片荧光靶点阵列图像 CCD 扫描采集系统 [J]. *中国激光*, 2010, 37(2): 505-509.
- [9] Zhang Q, Liang D, Bai L H, et al. Long-time stabilization imaging by light sheet fluorescent microscope [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2019, 46(4): 0407001.
张球, 梁东, 白丽华, 等. 光片荧光显微镜长时间的
- 稳定成像 [J]. *中国激光*, 2019, 46(4): 0407001.
- [10] Gui C, Wang K, Li C, et al. A CCD-based reader combined with CdS quantum dot-labeled lateral flow strips for ultrasensitive quantitative detection of CagA [J]. *Nanoscale Research Letters*, 2014, 9(1): 57.
- [11] Xu X H, Xia G, Jing S Q, et al. Design of imaging detection system for fluorescent immunochromatographic test strip [J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2018, 45(4): 0407005.
徐笑晗, 夏果, 金施群, 等. 荧光免疫层析试条成像检测系统的设计 [J]. *中国激光*, 2018, 45(4): 0407005.
- [12] Zheng Y P, Chen C B. Study on a new algorithm for gray image representation [J]. *Chinese Journal of Computers*, 2010, 33(12): 2397-2406.
郑运平, 陈传波. 一种新的灰度图像表示算法研究 [J]. *计算机学报*, 2010, 33(12): 2397-2406.
- [13] Feng W, Qu X H, Wang W J, et al. Research on response curve calibration method of imaging system based on digital micromirror device [J]. *Acta Optica Sinica*, 2018, 38(4): 0411006.
冯维, 曲兴华, 王惟婧, 等. 基于数字微镜成像系统的响应曲线标定方法研究 [J]. *光学学报*, 2018, 38(4): 0411006.
- [14] Herzberger M, Chako N. Modern geometrical optics [J]. *Physics Today*, 1959, 12(6): 50-52.
- [15] Maitre H. Radiometry and photometry [M]//From Photon to Pixel. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2015: 109-143.
- [16] Ma J, Xiao X Z, Lang J W, et al. Study on selection of CCD detector of space-borne hyper-spectral imager [J]. *Acta Optica Sinica*, 2014, 34(10): 1011001.
马骏, 肖喜中, 郎均慰, 等. 航空推扫高光谱成像仪 CCD 探测器选型研究 [J]. *光学学报*, 2014, 34(10): 1011001.
- [17] Adams J E, Jr. Design of practical color filter array interpolation algorithms for digital cameras [J]. *Proceedings of SPIE*, 1997, 3028: 117-125.
- [18] International Telecommunication Union. Recommendation ITU-R: BT. 601-7 [S]. [S. 1.]: Radiocomm-unication Sector of ITU, 2011.
- [19] Chen X J, Xu Y Y, Yu J S, et al. Antigen detection based on background fluorescence quenching immunochromatographic assay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2014, 841: 44-50.
- [20] Arao S, Matsuura S, Nonomura M, et al. Measurement of urinary lactoferrin as a marker of urinary tract infection [J]. *Journal of Clinical Microbiology*, 1999, 37(3): 553-557.