

上转换磷光生物传感器信号处理算法

谢承科^{1,2}, 张友宝¹, 黄立华^{1,2}, 屈建峰¹, 郭小娴^{1,2}, 黄惠杰^{1,†}

(1 中国科学院上海光学精密机械研究所, 上海 201800)

(2 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 为了提高上转换磷光生物传感器的工作效率和自动化程度, 将互相关滤波技术用于对传感器采集到的信号进行预处理, 基于预处理后的信号特征提出了一种简单有效的自适应边界提取算法. 该算法可对免疫层析试纸条功能带(包括检测带 T 和质控带 C)的边界线进行自动定位, 并根据这些边界线计算出检测结果. 实验结果表明: 该算法在多种测试条件下对 0~450ng/ml 系列浓度标准样品进行检测, 具有良好的稳定性和可靠性; 且结果的重复性远优于 10%, 满足生物医学检测的要求.

关键词: 光学传感器; 上转换磷光技术; 互相关滤波; 自适应边界提取算法; 重复性

中图分类号: Q631

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2009)12-3256-5

0 引言

上转换磷光生物传感器 (Up-converting Phosphor Technology-based biosensor, UPT) 是一种以上转换磷光材料 (Up-Converting Phosphor, UCP) 为标记物的新型免疫生物传感器. UCP 在红外光激发下可发射出可见光, 其基本原理是 UCP 通过吸收两个或多个低能量光子, 而发出高能量的可见光^[1-4]. 本研究采用的 UCP 为 NaYF₄: Yb³⁺, Er³⁺, 在 980 nm 红外光的激发下发出主峰值波长为 541.5 nm 的可见光^[5]. UCP 作为标记物具有传统标记物所无法比拟的优势, 即高度的敏感性、灵活性、稳定性和安全性; 与胶体金标记技术相比, 采用 UCP 标记技术可进行定量分析和多重分析, 且其灵敏度是前者的 100 倍^[5-6]. 上转换磷光生物传感器可广泛应用于生物医学检测、食品安全和生化反恐等领域.

随着现代电子仪器的发展, 人们对仪器仪表智能化的要求越来越高. 我单位以前研制的 UPT 生物传感器, 在检测过程中工作人员需要频繁地进行免疫层析试纸条功能带边界线的定位, 工作效率低, 操作麻烦. 为提高仪器的操作简便性, 减少检测过程中的人工干预, 本文提出先采用互相关滤波技术对采集到的信号进行预处理, 再进行免疫层析试纸条功能带自适应边界提取, 最后根据这些边界线计算出检测结果.

1 传感器原理简介

1.1 免疫层析试纸条

UPT 生物传感器的检测对象是免疫层析试纸条, 如图 1, 主要由 5 个部分组成-样品垫、结合垫、膜、吸水垫和朔料基板. 检测过程中, 将样品滴加到样品垫上, 样品通过渗透与虹吸作用进入结合垫, 其中 UCP-抗体结合物重新溶解游离, 并与样品中可能存在的被检物发生免疫反应; 生成的免疫复合物以及游离的 UCP-抗体结合物将和功能带上的生物活性分子发生特异性反应. 从而将样品中被检物的浓度转化为检测带 T 和质控带 C 上 UCP 颗粒的含量^[7].

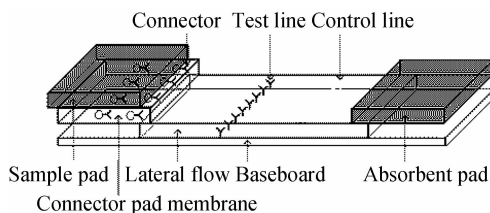


图 1 免疫层析试纸条

Fig. 1 Structure of the test strip

1.2 检测原理

980 nm 红外激发光照射在免疫层析试纸条上, 经生物反应结合上去的 UCP 颗粒发出可见磷光. 通过电机带动免疫层析试纸条进行扫描, 从而获得免疫层析试纸条上的磷光信号分布, 如图 2. 由于磷光信号的强弱与 UCP 颗粒的含量成正比, 因而免疫层析试纸条的功能带上的磷光信号分布也就间接地反映了被检物含量. 通过确定功能带的边界线位置, 分别计算出检测带 T 与质控带 C 的面积 S_T 和 S_C , 以 $R = S_T/S_C$ 作为最终检测结果.

[†] Tel: 021-69918820

Email: huanghuijie@siom.ac.cn

收稿日期: 2008-12-28

修回日期: 2008-11-28

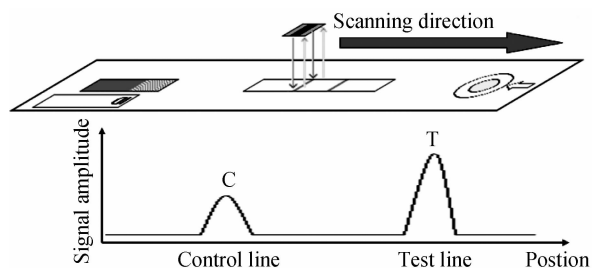


图2 上转换磷光生物传感器检测原理
Fig. 2 Detection principle of the UPT

2 互相关滤波

2.1 互相关滤波原理

互相关是分析两个信号之间相似程度的分析方法,可用于信号的检测、识别和提取等^[8].从本质上讲,互相关处理是基于信号和噪声的统计特性进行检测的.图3为互相关器的原理图.设输入信号为 $x(t)$ 和 $y(t)$,其中 $x(t)=s(t)+n(t)$. $s(t)$ 为被检测信号, $n(t)$ 为噪声信号, $y(t)$ 为参考信号.假设参考信号 $y(t)$ 与被检测信号 $s(t)$ 相关,而与噪声 $n(t)$ 不相关.

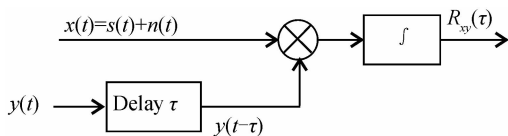


图3 互相关器
Fig. 3 Cross-correlator

互相关器的输出即为 $x(t)$ 和 $y(t)$ 的互相关函数

$$R_{xy}(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_0^T [s(t) + n(t)] y(t - \tau) dt = R_{sy}(\tau) + R_{ny}(\tau). \quad (1)$$

由于噪声信号 $n(t)$ 与参考信号 $y(t)$ 不相关,因此 $R_{ny}(\tau) = 0$.从而互相关器的输出 $R_{xy}(\tau) = R_{sy}(\tau)$,达到抑制噪声的目的^[9].

2.2 离散序列的互相关函数

定义

$$R_{xy}(m) = \sum_{n=-\infty}^{\infty} x(n)y(n+m) \quad (2)$$

式(2)为离散信号 $x(n)$ 和 $y(n)$ 的互相关函数.在实际工作中,信号 $x(n)$ 和 $y(n)$ 总是有限长的.假设 $n=0 \sim N-1$,则计算公式为

$$R_{xy}(m) = \frac{1}{N} \sum_{n=0}^{N-1-m} x(n)y(n+m) \quad (m = -(N-1) \sim (N-1)) \quad (3)$$

2.3 互相关滤波参考信号的选取

由本文可知,如果所选的参考信号与被测信号相关,而与噪声无关,通过互相关滤波就能达到抑制噪声的目的.

使用基于双抗体夹心模式的免疫层析试纸条对样品进行免疫检测,发生免疫反应后 UCP 颗粒在免疫层析试纸条的功能带上遵循正态分布规律.因此,通过激发 UCP 颗粒使其发射出可见磷光,经光电倍增管和 A/D 转换得到的采集信号在功能带附近也遵循正态分布规律,故可选取高斯函数作为参考信号.高斯函数原型为

$$f(x) = ae^{-\frac{(x-b)^2}{c^2}}$$

本文所研究的信号的各项功能带宽度约为 30 个采样点.实验仿真的结果表明,选取 $c^2 = 16$ 时可得到稳定可靠的检测结果.由于该算法所分析的数据只关心信号的相对大小而不是绝对大小,故可取 $a = 1$. b 取为总采样点数的一半.

2.4 信号的互相关滤波

将传感器采集到的原始信号与所选取的高斯函数参考信号进行互相关滤波.实验结果表明,互相关滤波能有效抑制噪声信号,如图4.

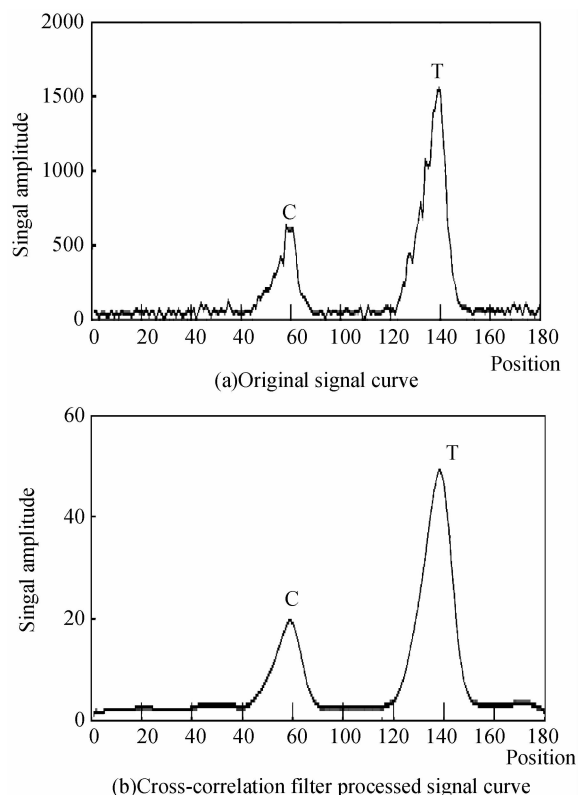


图4 原始和互相关滤波信号曲线

Fig. 4 Original and cross-correlation filter processed signal curve

3 自适应边界提取算法

由图4可知,经互相关滤波后的信号主要由本底信号、质控带C和检测带T组成.该信号有如下特征:1)质控带C位于检测带T之前;2)各功能带的宽度约为30个采样点距;3)两功能带的中心位置间距约为60个采样点距;4)功能带的信号幅度

大于本底信号；5)功能带的信号曲线呈正态分布；6)本底信号变化平缓。

基于信号的上述特征,本文提出了一种简单有效的分析方法:1)全局搜索,找到最大值 y_1 并记录该坐标位置 x_1 ;2)将该峰值区域附近的30个数据置0,再全局搜索,找到最大值 y_2 并记录其坐标位置 x_2 ;3)比较上述 x_1 和 x_2 的大小,较小的作为质控带 C 的峰值位置 C_MaxPos ,另外一个作为检测带 T 的峰值位置 T_MaxPos ,并确定其大小 C_Max 和 T_Max ;4)找质控带 C 的左边界:从 C 带峰值位置 C_MaxPos 向左搜索,判断相邻两点的数据的差值,若小于给定的幅度阈值 THR ,则计数器 cnt 的值加1.若某相邻两点的数据的差值大于阈值 THR ,则将 cnt 的值置0,重新开始计数;若 cnt 的值达到计数阈值 N ,则认为找到了边界,否则继续往下查找;5)找质控带 C 的右边界:在 C 带峰值 C_MaxPos 和 T 带峰值 T_MaxPos 之间搜索,方法与4)相同;6)找检测带 T 的边界:方法与 C 带的边界定位相同.图5为利用该算法进行功能带自适应边界提取的结果。

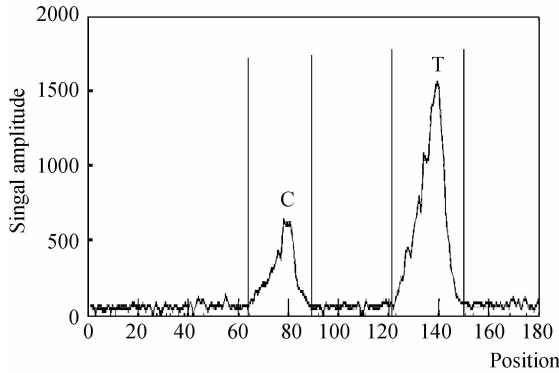


图5 功能带自适应边界提取的结果
Fig.5 Result processed by the adaptive borderline orientation algorithm

4 检测结果计算

当免疫反应完成,检测带 T 上附着有结合了目标待测物的 UCP 颗粒,质控带 C 上附着有游离的、未发生共价结合的 UCP 颗粒.因此,检测对象的浓度由检测带 T 上的 UCP 颗粒发光强度表征.但是由于不同免疫层析试纸条的沉积效应不尽相同,因此,得到的检测带信号无法直接与目标被检物浓度建立对应关系.考虑到同一免疫层析试纸条上质控带 C 与检测带 T 的反应条件相同,故采用检测带信号 S_T 与质控带信号 S_C 的比值 $R(R = S_T/S_C)$ 作为判断信息. R 的值与目标检测物的浓度之间存在一一对应的关系.因此,知道了 R 的值,根据标准工作曲线就可得知目标检测物的浓度。

检测带 T 和质控带 C 不是一个点而是一个区域.对检测而言,仪器本身和外界环境中存在一些不稳定的因素,比如供电电源的波动、光电倍增管的不稳定性、样品流过免疫层析试纸条过程中的非特异性滞留.所谓的非特异性滞留现象,指 UCP 颗粒并不是只在两条功能带的位置上才存在,而是在整个免疫层析试纸条上有一个逐渐减弱的本底分布^[7].这些因素将导致各种噪声,从而使检测信号偏离真值.如图6,检测得到的信号曲线2比理想曲线1偏高,可以用正斜率直线 AB 来校正^[10].

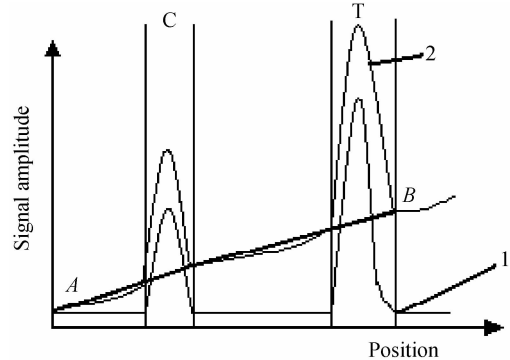


图6 结果计算
Fig.6 Calculation principle

根据上文确定的功能带边界线,对校正后的曲线在各功能带区域上分别进行面积积分,得到质控带信号 S_C 和检测带信号 S_T ,从而最终得到检测结果 $R = S_T/S_C$ 。

5 结果

为了考察上述算法的可靠性,用检测鼠疫抗原的系列浓度免疫层析试纸条进行了3组实验.免疫层析试纸条的描述如表1。

表1 免疫层析试纸条

| 序号 | 浓度/(ng · mL ⁻¹) | 序号 | 浓度/(ng · mL ⁻¹) |
|-----|-----------------------------|------|-----------------------------|
| 1-1 | 0 | 1-6 | 250 |
| 1-2 | 50 | 1-7 | 300 |
| 1-3 | 100 | 1-8 | 350 |
| 1-4 | 150 | 1-9 | 400 |
| 1-5 | 200 | 1-10 | 450 |

1)试验一:以1-3号免疫层析试纸条为样本,在10个不同的检测灵敏度条件下进行测试,得到的检测结果如表2,其变异系数 $CV = 3.24\%$ 。

表2 样本不变,检测灵敏度变化

| Test number | S_T/S_C | Test number | S_T/S_C |
|-------------|-----------|-------------|-----------|
| 1 | 1.900 8 | 6 | 1.959 1 |
| 2 | 1.962 3 | 7 | 2.078 4 |
| 3 | 2.082 0 | 8 | 1.959 8 |
| 4 | 2.055 3 | 9 | 2.046 9 |
| 5 | 2.006 8 | 10 | 2.072 5 |

2)试验二:以1-3号免疫层析试纸条为样本,检

测灵敏度不变,随机移动免疫层析试纸条在扫描平台上的位置,得到的检测结果如表 3,其变异系数 $CV=1.63\%$.

表 3 样本和检测灵敏度不变,移动免疫层析试纸条位置

| Test number | S_T/S_C | Test number | S_T/S_C |
|-------------|-----------|-------------|-----------|
| 1 | 2.082 4 | 6 | 2.167 1 |
| 2 | 2.140 8 | 7 | 2.064 6 |
| 3 | 2.088 9 | 8 | 2.093 1 |
| 4 | 2.132 3 | 9 | 2.128 3 |
| 5 | 2.075 5 | 10 | 2.140 5 |

3) 试验三:以 1-1~1-10 号免疫层析试纸条为样本,在相同的检测灵敏度条件下重复测试 10 次.以样品浓度为横坐标,检测结果 S_T/S_C 为纵坐标,结果如图 7.

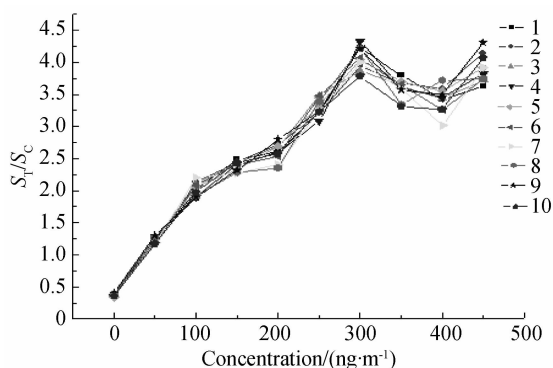


图 7 一致性测试

Fig. 7 Consistency test

对 10 次重复测试得到的结果分别用最小二乘法进行线性拟合,得到 S_T/S_C 与浓度之间的线性关系,其线性相关系数平方 R^2 如表 4. 各线性相关系数平方 R^2 之间的变异系数 $CV=3.82\%$,表明该算法具有良好的—致性.

表 4 系列免疫层析试纸条测试结果的线性相关系数平方

| Test number | R^2 | Test number | R^2 |
|-------------|----------|-------------|----------|
| 1 | 0.803 32 | 6 | 0.802 46 |
| 2 | 0.889 80 | 7 | 0.804 66 |
| 3 | 0.832 07 | 8 | 0.837 88 |
| 4 | 0.829 10 | 9 | 0.879 06 |
| 5 | 0.862 65 | 10 | 0.864 29 |

6 结论

针对经免疫反应后的免疫层析试纸条磷光信号分布的特点,本文用互相关滤波技术先对信号进行预处理,再根据处理后的信号特征提出了一种简单有效的自适应边界提取算法,最后根据功能带边界线计算出检测结果.

实验结果表明,利用该算法在多种测试条件下对免疫层析试纸条进行测试,检测结果的变异系数

远小于 10% ,符合免疫定量测试的要求.

免疫层析技术是生物医学检测中最常用的快速检测手段,各种方法的不同之处在于采用的标记物不同,而对试纸条检测结果的判读方式是相同的.所以,本文提出的数据处理算法对其他类型试纸条的信号处理同样适用.

参考文献

- [1] NIEDBALA R S, VAIL T L, FEINDT H, *et al.* Multiphoton up-converting phosphors for use in rapid immunoassays[C]. *SPIE*, 2000, **3913**: 193-203.
- [2] ZHAO Yong-kai, ZHOU Lei, HUANG Hui-jie, *et al.* Up-converting phosphor technology-based biosensor and its application[J]. *Acta Optica Sinica*, 2005, **25**(6): 841-847. 赵永凯,周蕾,黄惠杰,等.基于上转换发光技术生物传感器及其应用[J]. *光学学报*, 2005, **25**(6): 841-847.
- [3] ZHOU Wang, CHEN Lin-sen, YE Yan. Confocal optical sensor for detecting weak light of IR up-conversion ink[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2004, **33**(7): 814-817. 周望,陈林森,叶燕.共焦光学传感头用于红外上转换油墨的微弱光检测[J]. *光子学报*, 2004, **33**(7): 814-817.
- [4] YANG Yi-xin, YANG Yi-kang, ZHAO Tian-cheng, *et al.* Three-dimension fluorescence spectrum and three-dimension room temperature phosphorescence spectrum of benzimidazole[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2002, **31**(10): 1273-1276. 杨一心,杨宜康,赵天成,等.苯并咪唑的三维荧光光谱与三维室温磷光光谱[J]. *光子学报*, 2002, **31**(10): 1273-1276.
- [5] LU Jian, ZHOU lei, ZHAO Yong-kai, *et al.* Scanning detection system of UPT-based immunoassay test strip [J]. *Acta Photonica Sinica*, 2006, **35**(4): 555-560. 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.
- [6] ZARLING D A, ROSSI M J, REPPERS N A, *et al.* Up-converting reporters for biological and other assays using laser excitation techniques[P]. United States, **6537829**, 2003-03-25.
- [7] LIU Lei, ZHOU Lei, HUANG Li-hua, *et al.* CCD-based detection system for immunoassay test strip[J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2007, **28**(2): 246-251. 刘蕾,周蕾,黄立华,等.基于—维 CCD 的免疫层析试纸条检测系统[J]. *仪器仪表学报*, 2007, **28**(2): 246-251.
- [8] SUN Wei-min, LI Xiao-mei, ZENG You-min, *et al.* The application of cross-correlation analysis in the fiber fingerprint drop trace[J]. *Acta Photonica Sinica*, 2007, **36**(11): 2033-2036. 孙伟民,李小梅,曾佑民,等.互相关法在光纤液滴指纹图分析中的应用[J]. *光子学报*, 2007, **36**(11): 2033-2036.
- [9] 吉李满,张海军.基于互相关的信号检测研究与实现[J]. *吉林工程技术师范学院学报(工程技术版)*, 2004, **20**(6): 39-41.
- [10] YU Kun, ZHOU Lei, LIU Lei, *et al.* Up-converting phosphor technology-based biosensor[C]. *SPIE*, 2006, **6534**: 221-227.

Signal Processing Algorithm on Up-converting Phosphor Technology-based Biosensor

XIE Cheng-ke^{1,2}, ZHANG You-bao¹, HUANG Li-hua^{1,2}, QU Jian-feng¹,
GUO Xiao-xian^{1,2}, HUANG Hui-jie¹

(1 Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201800, China)

(2 Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: In order to improve the operating simplicity of the Up-converting Phosphor Technology-based biosensor (UPT-based biosensor), a novel signal processing algorithm is improved. The UPT-based biosensor is an optical biosensor, where a kind of up-converting phosphor (UCP) particle serves as the biological marker. The original signal is preprocessed by cross-correlation technique to get a copy of backup-data. These backup-data are used to fix on the borderlines of the function lines (the test line T and the control line C) of the UPT immune chromatographic test strip. And, the borderlines of the function lines are determined automatically with the adaptive borderline orientation algorithm. The areas of the graphics consisted of the borderlines, the signal curve and the position axis for each function line are calculated, and the test line signal S_T and the control line signal S_C are obtained. The ratio R of S_T to S_C , which is proportional to the concentration of the target analyte, is used as the judgment information. A group of standard samples are tested depend on the above algorithm in a series of experiments. It is proved to have high sensitivity ($\sim \text{ng/mL}$) and high stability ($CV < 5\%$), which can meet the need of biomedical detection.

Key words: Optical sensors; Up-converting phosphor technology; Cross-correlation filter; Adaptive borderline orientation algorithm; Repeatability



XIE Cheng-ke was born in 1982. He is a postgraduate student at Shanghai Institute of Optics and Fine Mechanics, CAS, and his research interests focus on optical biosensors.