



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110470830 A

(43)申请公布日 2019.11.19

(21)申请号 201810448792.7

(22)申请日 2018.05.11

(71)申请人 北京信息科技大学

地址 100192 北京市海淀区清河小营桥东
路12号

(72)发明人 孔全存 郭尚伟 刘桂礼 樊夏辉
杨海涛 赵双琦

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事
务所(普通合伙) 11201

代理人 张润

(51)Int.Cl.

G01N 33/533(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

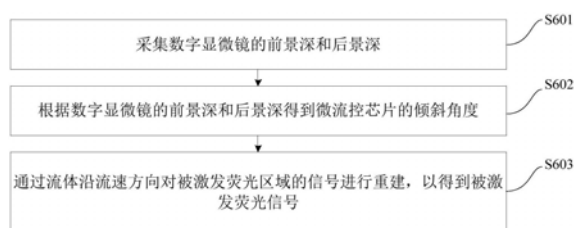
权利要求书4页 说明书12页 附图11页

(54)发明名称

用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法
方法及装置

(57)摘要

本发明公开了一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法及装置,其中,方法包括以下步骤:采集数字显微镜的前景深和背景深;根据数字显微镜的前景深和背景深得到微流控芯片的倾斜角度;通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,以得到被激发荧光信号。该方法测量速度快、精确,重建信号的可靠度高、误差小,有效提高后续浓度测量的精度,且运算速度快。



1. 一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,其特征在于,包括以下步骤:
采集数字显微镜的前景深和后景深;

根据所述数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度;以及

通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,以得到被激发荧光信号。

2. 根据权利要求1所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,其特征在于,所述根据所述数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度,进一步包括:

对所述微流控芯片的待观测区域进行对焦,以得到区域图像 x_0 ,且所述数字显微镜的位置记为 X, Y 轴零位点;

将载物台沿 X 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 x_1 ,且重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 x_i 其中, N 为正整数;

驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X, Y 轴零位点;

将所述载物台沿 X 轴负方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-x_1$,重复 N 次,以得到所述第 i 次移动后采集的图像 $-x_i$;

驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X, Y 轴零位点;

将所述载物台沿 Y 轴正方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 y_1 ,重复 N 次,以得到所述第 i 次移动后采集的图像 y_i ;

驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X, Y 轴零位点;

将所述载物台沿 Y 轴负方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-y_1$,重复 N 次,并得到所述第 i 次移动后采集的图像 $-y_i$;

将沿 X 轴拍摄的图像记为集合 U_x ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对所述集合 U_x 进行计算,并记为 $F_x = F(u)$, $u \in U_x$,以计算后绘制函数坐标图,且沿 Y 轴拍摄的图像记为集合 U_y ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(y)$ 对所述集合 U_y 进行计算,并记为 $F_y = F(u)$, $u \in U_y$,以计算后绘制函数坐标图;

在 F_x 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,且在 F_y 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点;

获取沿 X, Y 轴的夹角 θ_x 和夹角 θ_y ;

根据所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 。

3. 根据权利要求2所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,其特征在于,在 F_x 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-x_{b1}$ 、 $-x_{b2}$ 、 x_{b3} 和 x_{b4} ,且在 F_y 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-y_{d1}$ 、 $-y_{d2}$ 、 y_{d3} 和 y_{d4} ,并且所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 的计算公式为:

$$\tan \theta_x = \frac{\delta}{(b_2 + b_3)t},$$

$$\tan \theta_y = \frac{\delta}{(d_2 + d_3)t},$$

其中, t 为载物台每次移动的步长, δ 为所述数字显微镜的总景深;

并且,当 $b_2 > b_3$ 时,所述微流控芯片在所述 X 轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $b_2 < b_3$ 时,所述微流控芯片在所述 X 轴上的夹角在顺时针方向为钝角,且当 $d_2 > d_3$ 时,所述微流控芯片在

所述Y轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $d_2 < d_3$ 时,所述微流控芯片在所述Y轴上的夹角在顺时针方向为钝角。

4. 根据权利要求1所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,其特征在于,所述通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,进一步包括:

利用所述数字显微镜采集液体在所述微流控芯片T区流动时,起始时刻 t_0 与完全反应 t_1 时的图像A和图像B;

对所述图像A和图像B的前沿液面进行n次多项式拟合,以分别获得拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 ;

连接所述拟合曲线 C_0 和所述拟合曲线 C_1 的峰值,由拟合曲线 C_0 的峰值到拟合曲线 C_1 的峰值确定为液体主流线的方向;

对所述图像B的上下边界进行最小二乘法拟合,以获得两拟合直线,并平移拟合直线到边界峰值,对所述图像B的图像边界进行切割,以获得图像 B_1 ;

以步长为N个像素向后平移拟合曲线 C_1 ,以得到曲线 C_2 ;

设所述图像 B_1 的上下边界与所述曲线 C_2 的交点为交点 E_1 与交点 E_2 ,沿所述曲线 C_2 ,先由所述交点 E_1 到所述交点 E_2 对所述图像 B_1 在曲线上的像素进行补偿判别,再由所述交点 E_2 到所述交点 E_1 对图像 B_1 在曲线上的像素进行判别;

在曲线 C_2 上的像素点全部判别完成后,重复上述平移过程,直至平移的曲线超出所述图像 B_1 的左边界;

重复上述平移过程,直至不存在无效信号区。

5. 根据权利要求4所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,其特征在于,所述补偿判别具体包括:

当遇到信号无效区域的无效像素点 Q_2 时,设无效像素点 Q_2 相邻上侧的沿主流线方向的有效信号像素点 P_1 和有效信号像素点 P_2 ;

若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线L上相邻所述无效像素点 Q_2 存在有效信号像素点 Q_1 ,则利用有效信号像素点 P_1 、有效信号像素点 P_2 和有效信号像素点 Q_1 对无效像素点 Q_2 的像素值进行补偿,补偿公式如下:

$$G_{Q_2} = \frac{G_{P_2} - G_{P_1}}{T} G_{Q_1} K \cos \theta,$$

其中, G_{Q_2} 为 Q_2 点的灰度值, T 为相邻两像素的空间距离, G_{Q_1} 为 Q_1 点的灰度值, K 为补偿系数, G_{P_2} 为 P_2 点的灰度值, G_{P_1} 为 P_1 点的灰度值, θ 为L与主流线方向的夹角;

若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线L上相邻所述无效像素点 Q_2 的不存在所述有效信号点为 Q_1 ,则不进行补偿。

6. 一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,其特征在于,包括:

采集模块,用于采集数字显微镜的前景深和后景深;

获取模块,用于根据所述数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度;

以及

重建模块,用于通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,以得到被激发荧光信号。

7. 根据权利要求6所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,其特征在于,

所述获取模块进一步用于对所述微流控芯片的待观测区域进行对焦,以得到区域图像 x_0 ,且所述数字显微镜的位置记为 X,Y 轴零位点,将载物台沿 X 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 x_1 ,且重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 x_i 其中, N 为正整数,驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X,Y 轴零位点,将所述载物台沿 X 轴负方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-x_1$,重复 N 次,以得到所述第 i 次移动后采集的图像 $-x_i$,驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X,Y 轴零位点,将所述载物台沿 Y 轴正方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 y_1 ,重复 N 次,以得到所述第 i 次移动后采集的图像 y_i ,驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X,Y 轴零位点,将所述载物台沿 Y 轴负方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-y_1$,重复 N 次,并得到所述第 i 次移动后采集的图像 $-y_i$,将沿 X 轴拍摄的图像记为集合 U_x ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对所述集合 U_x 进行计算,并记为 $F_x=F(u), u \in U_x$,以计算后绘制函数坐标图,且沿 Y 轴拍摄的图像记为集合 U_y ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(y)$ 对所述集合 U_y 进行计算,并记为 $F_y=F(u), u \in U_y$,以计算后绘制函数坐标图,在 F_x 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,且在 F_y 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,获取沿 X,Y 轴的夹角 θ_x 和夹角 θ_y ,根据所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 。

8. 根据权利要求7所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,其特征在于,在 F_x 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-x_{b1}、-x_{b2}、x_{b3}$ 和 x_{b4} ,且在 F_y 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-y_{d1}、-y_{d2}、y_{d3}$ 和 y_{d4} ,并且所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 的计算公式为:

$$\tan \theta_x = \frac{\delta}{(b_2 + b_3)t},$$

$$\tan \theta_y = \frac{\delta}{(d_2 + d_3)t},$$

其中, t 为载物台每次移动的步长, δ 为所述数字显微镜的总景深;并且,当 $b_2 > b_3$ 时,所述微流控芯片在所述 X 轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $b_2 < b_3$ 时,所述微流控芯片在所述 X 轴上的夹角在顺时针方向为钝角,且当 $d_2 > d_3$ 时,所述微流控芯片在所述 Y 轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $d_2 < d_3$ 时,所述微流控芯片在所述 Y 轴上的夹角在顺时针方向为钝角。

9. 根据权利要求1所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,其特征在于,所述重建模块进一步用于利用所述数字显微镜采集液体在所述微流控芯片 T 区流动时,起始时刻 t_0 与完全反应 t_1 时的图像 A 和图像 B ,对所述图像 A 和图像 B 的前沿液面进行 n 次多项式拟合,以分别获得拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 ,连接所述拟合曲线 C_0 和所述拟合曲线 C_1 的峰值,由拟合曲线 C_0 的峰值到拟合曲线 C_1 的峰值确定为液体主流线的方向,对所述图像 B 的上下边界进行最小二乘法拟合,以获得两拟合直线,并平移拟合直线到边界峰值,对所述图像 B 的图像边界进行切割,以获得图像 B_1 ,以步长为 N 个像素向后平移拟合曲线 C_1 ,以得到曲线 C_2 ,设所述图像 B_1 的上下边界与所述曲线 C_2 的交点为交点 E_1 与交点 E_2 ,沿所述曲线 C_2 ,先由所述交点 E_1 到所述交点 E_2 对所述图像 B_1 在曲线上的像素进行补偿判别,再由所述交点 E_2 到所述交点 E_1 对图像 B_1 在曲线上的像素进行判别,在曲线 C_2 上的像素点全部判别完成后,重复上述平移过程,直至平移的曲线超出所述图像 B_1 的左边界,重复上述平移过程,直至不存在

无效信号区。

10. 根据权利要求9所述的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,其特征在
于,所述补偿判别具体包括:

当遇到信号无效区域的无效像素点 Q_2 时,设无效像素点 Q_2 相邻上侧的沿主流线方向的
有效信号像素点 P_1 和有效信号像素点 P_2 ;

若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线 L 上相邻所述无效像素点 Q_2 存在有效信号
像素点 Q_1 ,则利用有效信号像素点 P_1 、有效信号像素点 P_2 和有效信号像素点 Q_1 对无效像素点
 Q_2 的像素值进行补偿,补偿公式如下:

$$G_{Q_2} = \frac{G_{P_2} - G_{P_1}}{T} G_{Q_1} K \cos \theta,$$

其中, G_{Q_2} 为 Q_2 点的灰度值, T 为相邻两像素的空间距离, G_{Q_1} 为 Q_1 点的灰度值, K 为补偿系
数, G_{P_2} 为 P_2 点的灰度值, G_{P_1} 为 P 点的灰度值, θ 为 L 与主流线方向的夹角;

若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线 L 上相邻所述无效像素点 Q_2 的不存在所述
有效信号点为 Q_1 ,则不进行补偿。

用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法及装置

技术领域

[0001] 本发明涉及医疗免疫检测技术领域,特别涉及一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法及装置。

背景技术

[0002] 目前,基于数字图像处理的芯片倾斜测量主要针对的是芯片在水平面的旋转产生一定的倾斜,如图1所示。相关技术的方法研究图像基于行、列方向像素灰度定义芯片图像的校正指标。优点在于能够快速准确的测量出芯片在水平面内的倾斜角度,并且能够给予准确的矫正。但是,其无法测量芯片与水平面的夹角,如图2所示。

[0003] 此外,相关技术的在显微系统中一种新型的物平面倾斜测量矫正方法,是在图片中选取一对的特征点,再让物面旋转一定的角度后,再次定位图片旋转前定义的特征点,通过两对特征点的在像平面形成的几何特征建立相应的数学模型进行计算。此方法虽然能够测量出芯片与水平面的夹角,但是其缺点是:1.需要提取特征点,对于特征不明显的图像难以实现。2.需要额外的旋转机构。3.计算复杂。

[0004] 在基于夹心法的荧光标记过程中,由于团聚与未偶联接枝,会造成信号分布不均匀。其中团聚会造成信号分布密集,未偶联接枝会造成信号分布稀疏。

[0005] 针对被激发荧光信号的重建,团聚与未偶联接枝造成的无效信号区域本质上为图片上信息的破损区域。对此区域的补偿属于图像修复的领域。目前主流的图像修复技术分为两大类。一类是用于修复小尺度缺损的数字图像修补(inpainting)技术,利用待修补区域的边缘信息,同时采用一种由粗到精的方法来估计等照度(isophote)的方向,并采用传播机制将信息传播到待修补的区域内,以便得到较好的修补效果。另一类是用于填充图像中大块丢失信息的图像补全(completion)技术。目前,这一类技术也包含以下两种方法:一种是基于图像分解的修复技术,其主要思想是将图像分解为结构部分和纹理部分,其中结构部分用inpainting算法修补,纹理部分用纹理合成方法填充以上的。以上的图像修复方法能够很好的修复带有纹理与规律的破损图片,如风景画,人物像等。但是对于微流控芯片检测区(T区)这类无规律与纹理的图像,并不具有相应的修复效果,而且使用时会引入相应的误差信号,给浓度测量带来相应的误差。

[0006] 综上,基因芯片光学扫描图像倾斜校正方法无法测量芯片与水平面的夹角;在显微系统中一种新型的物平面倾斜测量矫正方法进行倾角测量时需要提取额外特征点,对于特征不明显的图像难以实现,并且需要额外的旋转机构,计算复杂;现存的图像修复技术无规律与纹理的微流控芯片的T区图像进行修复时,导致测量精度低,误差大。

发明内容

[0007] 本申请是基于发明人对以下问题的认识和发现作出的:

[0008] 随着医疗体制改革的不断推进,以区域中心医院为中心组建覆盖社区和乡镇医院的基本卫生和医疗网络正在快速建设;同时,“小病不出乡,大病不出县,急病不耽误”的目

标正在逐步实现。即时检测(point-of-care testing, POCT)的出现可以切实强化基层首诊职能,提高基层医院的诊疗水平,解决中国医改困境。现场即时检测(Point of Care Testing, POCT)是进行现场采样由病人或者其他未受专业临床检验训练的人员进行检测,快速得到检测结果的一种检测方式。POCT检测仪器具有操作简单快捷、结果即时化等突出优点,是近年来体外诊断行业发展最快的细分行业之一。

[0009] 为了加快分级诊疗制度的建设和完善,以常见病、多发病、慢性病分级诊疗为突破口;通过非特异性指标(C-反应蛋白、血清淀粉样蛋白A、降钙素原等),辅助临床精准治疗感染类的挑战,快速确诊病人的感染菌种并以此来减少不必要的抗生素使用的临床要求,都促进了POCT行业及其细分领域的快速发展。

[0010] 微流控技术是实现POCT的重要方式。微流控技术是利用尺度在数十至数百微米的微通道结构,处理和操纵 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ mol/L流体的科学和技术。微流控芯片是实现微流控技术的主要平台,其容纳流体的有效结构(通道、反应室和其它某些功能部件)至少在一个纬度上为微米级尺度。将采样、稀释、加试剂、反应、分离、检测等集成在微芯片上,能有效减少待测样品消耗和快速、高效完成检测的一系列操作,且可以重复使用,是集医学检测、生命科学和微机电加工于一体的热点技术领域。

[0011] 微流控生物芯片由加样窗,液体调节器,检测区(T区),质控区(C区)以及废液仓组成。如图3所示。

[0012] 微流控芯片检测系统是用于检测微流控芯片的检测系统。根据检测器原理的不同,可分为电化学检测器、质谱检测器及光学检测器等。电化学检测具有灵敏度高、选择性好、装置简单等优点,缺点是要求被测样品有电化学活性且重现性较差。质谱检测能够提供试样组分中生物大分子的基本结构和定量信息,但是质谱检测仪器体积庞大、价格昂贵。光学检测器中的激光诱导荧光检测灵敏度高,其检测限可达到 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ mol/L,在微流控芯片检测中应用最为常见。光学检测器中的激光诱导荧光检测灵敏度高,其检测限可达到 $10^{-9} \sim 10^{-12}$ mol/L,在微流控芯片检测中应用最为常见。

[0013] 激光诱导荧光检测系统具有灵敏度高、选择性好、线性范围宽、响应速度快及体积小等优点,符合POCT的发展趋势,同时满足对病毒、细菌及其他待测物检测的需求。

[0014] 但是激光诱导荧光检测系统对微流控:(1)显微镜所观测的微流控芯片的装卡过程中,由于材料表面的粗糙等原因往往会导致芯片与水平面形成一定的夹角。此倾斜夹角会给后续的信号提取等带来较大的误差。能够对此倾斜角度进行测量对后续测量数据处理等问题起到至关重要的作用。因此,能够对微流控芯片的倾斜角度进行测量是一个整合免疫荧光分析法和微流控芯片技术的关键性技术问题。(2)在被激发荧光信号提取方面,微流控芯片检测区的被测物分布不均匀。由于生化反应不均匀,芯片会出现信号的无效区域如图4。检测区均匀信号如图5所示。能够利用有效信号区域去补偿无效信号区域对于提高测量精度起到重要的作用。因此,对被激发荧光信号的重建也是一个整合免疫荧光分析法和微流控芯片技术的关键性技术问题。

[0015] 本发明旨在至少在一定程度上解决相关技术中的技术问题之一。

[0016] 为此,本发明的一个目的在于提出一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,该方法测量速度快、精确,重建信号的可靠度高、误差小,有效提高后续浓度测量的精度,且运算速度快。

[0017] 本发明的另一个目的在于提出一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置。

[0018] 为达到上述目的,本发明一方面实施例提出了一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,包括以下步骤:采集数字显微镜的前景深和后景深;根据所述数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度;通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,以得到被激发荧光信号。

[0019] 本发明实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,在进行夹角测量时不需要额外的倾斜传感器,不需要额外的旋转部件,利用数字图像处理的方法,测量速度快、精确,并利用了显微镜前后景深大小不同的概念,在进行被激发荧光信号的重建时,重建信号的可靠度高、误差小,从而有效提高后续浓度测量的精度,且运算速度快。

[0020] 另外,根据本发明上述实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法还可以具有以下附加的技术特征:

[0021] 进一步地,在本发明的一个实施例中,所述根据所述数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度,进一步包括:对所述微流控芯片的待观测区域进行对焦,以得到区域图像 x_0 ,且所述数字显微镜的位置记为 X, Y 轴零位点;将载物台沿 X 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 x_1 ,且重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 x_i 其中, N 为正整数;驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X, Y 轴零位点;将所述载物台沿 X 轴负方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-x_1$,重复 N 次,以得到所述第 i 次移动后采集的图像 $-x_i$;驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X, Y 轴零位点;将所述载物台沿 Y 轴正方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 y_1 ,重复 N 次,以得到所述第 i 次移动后采集的图像 y_i ;驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X, Y 轴零位点;将所述载物台沿 Y 轴负方向进行所述步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-y_1$,重复 N 次,并得到所述第 i 次移动后采集的图像 $-y_i$;将沿 X 轴拍摄的图像记为集合 U_x ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对所述集合 U_x 进行计算,并记为 $F_x = F(u), u \in U_x$,以计算后绘制函数坐标图,且沿 Y 轴拍摄的图像记为集合 U_y ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(y)$ 对所述集合 U_y 进行计算,并记为 $F_y = F(u), u \in U_y$,以计算后绘制函数坐标图;在 F_x 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,且在 F_y 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点;获取沿 X, Y 轴的夹角 θ_x 和夹角 θ_y ;根据所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 。

[0022] 进一步地,在本发明的一个实施例中,在 F_x 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-x_{b1}, -x_{b2}, x_{b3}$ 和 x_{b4} ,且在 F_y 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-y_{d1}, -y_{d2}, y_{d3}$ 和 y_{d4} ,并且所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 的计算公式为:

$$[0023] \quad \tan \theta_x = \frac{\delta}{(b_2 + b_3)t},$$

$$[0024] \quad \tan \theta_y = \frac{\delta}{(d_2 + d_3)t},$$

[0025] 其中, t 为载物台每次移动的步长, δ 为所述数字显微镜的总景深;并且,当 $b_2 > b_3$ 时,所述微流控芯片在所述 X 轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $b_2 < b_3$ 时,所述微流控芯片在所述 X 轴上的夹角在顺时针方向为钝角,且当 $d_2 > d_3$ 时,所述微流控芯片在所述 Y 轴上的夹角在

顺时针方向为锐角,当 $d_2 < d_3$ 时,所述微流控芯片在所述Y轴上的夹角在顺时针方向为钝角。

[0026] 进一步地,在本发明的一个实施例中,所述通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,进一步包括:利用所述数字显微镜采集液体在所述微流控芯片T区流动时,起始时刻 t_0 与完全反应 t_1 时的图像A和图像B;对所述图像A和图像B的前沿液面进行 n 次多项式拟合,以分别获得拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 ;连接所述拟合曲线 C_0 和所述拟合曲线 C_1 的峰值,由拟合曲线 C_0 的峰值到拟合曲线 C_1 的峰值确定为液体主流线的方向;对所述图像B的上下边界进行最小二乘法拟合,以获得两拟合直线,并平移拟合直线到边界峰值,对所述图像B的图像边界进行切割,以获得图像 B_1 ;以步长为 N 个像素向后平移拟合曲线 C_1 ,以得到曲线 C_2 ;设所述图像 B_1 的上下边界与所述曲线 C_2 的交点为交点 E_1 与交点 E_2 ,沿所述曲线 C_2 ,先由所述交点 E_1 到所述交点 E_2 对所述图像 B_1 在曲线上的像素进行补偿判别,再由所述交点 E_2 到所述交点 E_1 对图像 B_1 在曲线上的像素进行判别;在曲线 C_2 上的像素点全部判别完成后,重复上述平移过程,直至平移的曲线超出所述图像 B_1 的左边界;重复上述平移过程,直至不存在无效信号区。

[0027] 进一步地,在本发明的一个实施例中,所述补偿判别具体包括:当遇到信号无效区域的无效像素点 Q_2 时,设无效像素点 Q_2 相邻上侧的沿主流线方向的有效信号像素点 P_1 和有效信号像素点 P_2 ;若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线 L 上相邻所述无效像素点 Q_2 存在有效信号像素点 Q_1 ,则利用有效信号像素点 P_1 、有效信号像素点 P_2 和有效信号像素点 Q_1 对无效像素点 Q_2 的像素值进行补偿,补偿公式如下:

$$[0028] \quad G_{Q_2} = \frac{G_{P_2} - G_{P_1}}{T} G_{Q_1} K \cos \theta,$$

[0029] 其中, G_{Q_2} 为 Q_2 点的灰度值, T 为相邻两像素的空间距离, G_{Q_1} 为 Q_1 点的灰度值, K 为补偿系数, G_{P_2} 为 P_2 点的灰度值, G_{P_1} 为 P_1 点的灰度值, θ 为 L 与主流线方向的夹角;若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线 L 上相邻所述无效像素点 Q_2 的不存在所述有效信号点为 Q_1 ,则不进行补偿。

[0030] 为达到上述目的,本发明另一方面实施例提出了一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,包括:采集模块,用于采集数字显微镜的前景深和后景深;获取模块,用于根据所述数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度;重建模块,用于通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,以得到被激发荧光信号。

[0031] 本发明实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,在进行夹角测量时不需要额外的倾斜传感器,不需要额外的旋转部件,利用数字图像处理的方法,测量速度快、精确,并利用了显微镜前后景深大小不同的概念,在进行被激发荧光信号的重建时,重建信号的可靠度高、误差小,从而有效提高后续浓度测量的精度,且运算速度快。

[0032] 另外,根据本发明上述实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置还可以具有以下附加的技术特征:

[0033] 进一步地,在本发明的一个实施例中,所述获取模块进一步用于对所述微流控芯片的待观测区域进行对焦,以得到区域图像 x_0 ,且所述数字显微镜的位置记为 X , Y 轴零位点,将载物台沿 X 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 x_1 ,且重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 x_i 其中, N 为正整数,驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述 X , Y 轴零位点,将所述载物台沿 X 轴负方向进行所述步长为 t 的移

动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-i$,重复N次,以得到所述第i次移动后采集的图像 $-x_i$,驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述X,Y轴零位点,将所述载物台沿Y轴正方向进行所述步长为t的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 y_1 ,重复N次,以得到所述第i次移动后采集的图像 y_i ,驱动所述载物台以使所述数字显微镜回到所述X,Y轴零位点,将所述载物台沿Y轴负方向进行所述步长为t的移动,并获取移动后由所述数字显微镜采集的图像 $-y_1$,重复N次,并得到所述第i次移动后采集的图像 $-y_i$,将沿X轴拍摄的图像记为集合 U_x ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对所述集合 U_x 进行计算,并记为 $F_x=F(u)$, $u \in U_x$,以计算后绘制函数坐标图,且沿Y轴拍摄的图像记为集合 U_y ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(y)$ 对所述集合 U_y 进行计算,并记为 $F_y=F(u)$, $u \in U_y$,以计算后绘制函数坐标图,在 F_x 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,且在 F_y 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,获取沿X,Y轴的夹角 θ_x 和夹角 θ_y ,根据所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 。

[0034] 进一步地,在本发明的一个实施例中,在 F_x 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-x_{b1}$ 、 $-x_{b2}$ 、 x_{b3} 和 x_{b4} ,且在 F_y 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-y_{d1}$ 、 $-y_{d2}$ 、 y_{d3} 和 y_{d4} ,并且所述夹角 θ_x 和所述夹角 θ_y 的计算公式为:

$$[0035] \quad \tan \theta_x = \frac{\delta}{(b_2 + b_3)t},$$

$$[0036] \quad \tan \theta_y = \frac{\delta}{(d_2 + d_3)t},$$

[0037] 其中,t为载物台每次移动的步长, δ 为所述数字显微镜的总景深;并且,当 $b_2 > b_3$ 时,所述微流控芯片在所述X轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $b_2 < b_3$ 时,所述微流控芯片在所述X轴上的夹角在顺时针方向为钝角,且当 $d_2 > d_3$ 时,所述微流控芯片在所述Y轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $d_2 < d_3$ 时,所述微流控芯片在所述Y轴上的夹角在顺时针方向为钝角。

[0038] 进一步地,在本发明的一个实施例中,所述重建模块进一步用于利用所述数字显微镜采集液体在所述微流控芯片T区流动时,起始时刻 t_0 与完全反应 t_1 时的图像A和图像B,对所述图像A和图像B的前沿液面进行n次多项式拟合,以分别获得拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 ,连接所述拟合曲线 C_0 和所述拟合曲线 C_1 的峰值,由拟合曲线 C_0 的峰值到拟合曲线 C_1 的峰值确定为液体主流线的方向,对所述图像B的上下边界进行最小二乘法拟合,以获得两拟合直线,并平移拟合直线到边界峰值,对所述图像B的图像边界进行切割,以获得图像 B_1 ,以步长为N个像素向后平移拟合曲线 C_1 ,以得到曲线 C_2 ,设所述图像 B_1 的上下边界与所述曲线 C_2 的交点为交点 E_1 与交点 E_2 ,沿所述曲线 C_2 ,先由所述交点 E_1 到所述交点 E_2 对所述图像 B_1 在曲线上的像素进行补偿判别,再由所述交点 E_2 到所述交点 E_1 对图像 B_1 在曲线上的像素进行判别,在曲线 C_2 上的像素点全部判别完成后,重复上述平移过程,直至平移的曲线超出所述图像 B_1 的左边界,重复上述平移过程,直至不存在无效信号区。

[0039] 进一步地,在本发明的一个实施例中,所述补偿判别具体包括:当遇到信号无效区域的无效像素点 Q_2 时,设无效像素点 Q_2 相邻上侧的沿主流线方向的有效信号像素点 P_1 和有效信号像素点 P_2 ;若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线L上相邻所述无效像素点 Q_2 存在有效信号像素点 Q_1 ,则利用有效信号像素点 P_1 、有效信号像素点 P_2 和有效信号像素点 Q_1 对无效像素点 Q_2 的像素值进行补偿,补偿公式如下:

$$[0040] \quad G_{Q_2} = \frac{G_{P_2} - G_{P_1}}{T} G_{Q_1} K \cos \theta,$$

[0041] 其中, G_{Q_2} 为 Q_2 点的灰度值, T 为相邻两像素的空间距离, G_{Q_1} 为 Q_1 点的灰度值, K 为补偿系数, G_{P_2} 为 P_2 点的灰度值, G_{P_1} 为 P 点的灰度值, θ 为 L 与主流线方向的夹角; 若所述曲线 C_2 在所述无效像素点 Q_2 处的垂线 L 上相邻所述无效像素点 Q_2 的不存在所述有效信号点为 Q_1 , 则不进行补偿。

[0042] 本发明附加的方面和优点将在下面的描述中部分给出, 部分将从下面的描述中变得明显, 或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0043] 本发明上述的和/或附加的方面和优点从下面结合附图对实施例的描述中将变得明显和容易理解, 其中:

[0044] 图1为相关技术的水平面内倾斜的芯片;

[0045] 图2为相关技术的竖直方向的芯片倾斜;

[0046] 图3为相关技术的微流控生物芯片示意图;

[0047] 图4为相关技术的带有团聚与未偶联接枝区域的T区图;

[0048] 图5为相关技术的检测区均匀信号分布;

[0049] 图6为根据本发明一个实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法的流程图;

[0050] 图7为根据本发明一个实施例的微流控芯片所在空间坐标图;

[0051] 图8为根据本发明一个实施例的完成N次图像采集完成微流控芯片每次被采集的部分 x_i 的示意图;

[0052] 图9为根据本发明一个实施例的芯片的倾斜与显微镜景深范围的关系的示意图;

[0053] 图10为根据本发明一个实施例的不同 $b_2, b_3; d_2, d_3$ 大小下微流控芯片与坐标轴夹角方向的示意图;

[0054] 图11为根据本发明一个实施例的对 t_0 时刻的T区图像A的示意图;

[0055] 图12为根据本发明一个实施例的对 t_1 时刻的T区图像B的示意图;

[0056] 图13为根据本发明一个实施例的对 t_0 时刻的T区图像A前沿液面进行多项式拟合的示意图;

[0057] 图14为根据本发明一个实施例的对 t_1 时刻的T区图像B前沿液面进行多项式拟合的示意图;

[0058] 图15为根据本发明一个实施例的主流速方向提取的示意图;

[0059] 图16为根据本发明一个实施例的对图像B的上下边界进行最小二乘拟合的示意图;

[0060] 图17为根据本发明一个实施例的利用拟合边界对图像B进行切割获得 B_1 的示意图;

[0061] 图18为根据本发明一个实施例的对曲线 C_i 进行上的像素点进行补偿判别的示意图;

[0062] 图19为根据本发明一个实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置

的结构示意图。

具体实施方式

[0063] 下面详细描述本发明的实施例,所述实施例的示例在附图中示出,其中自始至终相同或类似的标号表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。下面通过参考附图描述的实施例是示例性的,旨在用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0064] 下面参照附图描述根据本发明实施例提出的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,首先将参照附图描述根据本发明实施例提出的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法。

[0065] 图6是本发明一个实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法的流程图。

[0066] 如图6所示,该用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法包括以下步骤:

[0067] 在步骤S601中,采集数字显微镜的前景深和后景深。

[0068] 可以理解的是,本发明实施例采用数字显微镜存在景深,且前后的景深大小不同的特征。

[0069] 在步骤S602中,根据数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度。

[0070] 可以理解的是,本发明实施例对微流控芯片倾斜角度进行测量。

[0071] 进一步地,在本发明的一个实施例中,根据数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度,进一步包括:对微流控芯片的待观测区域进行对焦,以得到区域图像 x_0 ,且数字显微镜的位置记为 X, Y 轴零位点;将载物台沿 X 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 x_1 ,且重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 x_i 其中, N 为正整数;驱动载物台以使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点;将载物台沿 X 轴负方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 $-x_1$,重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 $-x_i$;驱动载物台以使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点;将载物台沿 Y 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 y_1 ,重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 y_i ;驱动载物台以使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点;将载物台沿 Y 轴负方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 $-y_1$,重复 N 次,并得到第 i 次移动后采集的图像 $-y_i$;将沿 X 轴拍摄的图像记为集合 U_x ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对集合 U_x 进行计算,并记为 $F_x = F(u), u \in U_x$,以计算后绘制函数坐标图,且沿 Y 轴拍摄的图像记为集合 U_y ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(y)$ 对集合 U_y 进行计算,并记为 $F_y = F(u), u \in U_y$,以计算后绘制函数坐标图;在 F_x 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,且在 F_y 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点;获取沿 X, Y 轴的夹角 θ_x 和夹角 θ_y ;根据夹角 θ_x 和夹角 θ_y 。

[0072] 在本发明的一个实施例中,在 F_x 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-x_{b1}, -x_{b2}, x_{b3}$ 和 x_{b4} ,且在 F_y 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-y_{d1}, -y_{d2}, y_{d3}$ 和 y_{d4} ,并且夹角 θ_x 和夹角 θ_y 的计算公式为:

$$[0073] \quad \tan \theta_x = \frac{\delta}{(b_2 + b_3)t},$$

$$[0074] \quad \tan \theta_y = \frac{\delta}{(d_2 + d_3)t},$$

[0075] 其中, t 为载物台每次移动的步长, δ 为数字显微镜的总景深; 并且, 当 $b_2 > b_3$ 时, 微流控芯片在 X 轴上的夹角在顺时针方向为锐角, 当 $b_2 < b_3$ 时, 微流控芯片在 X 轴上的夹角在顺时针方向为钝角, 且当 $d_2 > d_3$ 时, 微流控芯片在 Y 轴上的夹角在顺时针方向为锐角, 当 $d_2 < d_3$ 时, 微流控芯片在 Y 轴上的夹角在顺时针方向为钝角。

[0076] 具体而言, (1) 选用的数字显微镜的系统参数为, 例如: 物镜放大倍数 $\beta = 10$; 转接镜的放大倍数 $\beta_r = 1$; 物镜的数值孔径 $NA = 0.25$; 分辨率 $r = 14 \mu\text{m}$; 前景深 $\delta_{x1} = 2.8 \mu\text{m}$; 后景深 $\delta_{x2} = 8.8 \mu\text{m}$; 数字显微镜的线视场大小为 $10 \mu\text{m}$ 。

[0077] (2) 载物台的参数最小步长可以为 $1 \mu\text{m}$ 。具体包括:

[0078] 第一步: 如图7所示, 对微流控芯片的待观测区域进行对焦, 此区域图像记为 x_0 , 并将此时显微镜的位置记为 X, Y 轴零位点。

[0079] 第二步: 如图8所示, 载物台沿 X 轴正方向进行步长为 $10 \mu\text{m}$ 的移动, 移动后由数字显微镜采集图像并将图像记为 x_1 。重复以上步骤20次, 并将第 i 次移动后采集的图像分别记为 x_i 。

[0080] 第三步: 驱动载物台使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点。

[0081] 第四步: 如图9所示, 载物台沿 X 轴负方向进行步长为 $10 \mu\text{m}$ 的移动, 移动后由数字显微镜采集图像并将图像记为 $-x_1$ 。重复以上步骤20次, 并将第 i 次移动后采集的图像分别记为 $-x_i$ 。

[0082] 第五步: 驱动载物台使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点。

[0083] 第六步: 载物台沿 Y 轴正方向进行步长为 $10 \mu\text{m}$ 的移动, 移动后由数字显微镜采集图像并将图像记为 y_1 。重复以上步骤20次, 并将第 i 次移动后采集的图像分别记为 y_i 。

[0084] 第七步: 驱动载物台使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点。

[0085] 第八步: 载物台沿 Y 轴负方向进行步长为 $10 \mu\text{m}$ 的移动, 移动后由数字显微镜采集图像并将图像记为 $-y_1$ 。重复以上步骤20次, 并将第 i 次移动后采集的图像分别记为 $-y_i$ 。

[0086] 步骤一到步骤八中, 分别沿着倾斜芯片所在空间坐标系的 X, Y 轴的正向与负向, 等步长的采集多幅图片。

[0087] 第九步: 将上述的沿 X 轴拍摄的图像记为集合 U_x , 利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对上述函数集进行计算, 并记为 $F_x = F(u), u \in U_x$, 计算后绘制函数坐标图。沿 Y 轴拍摄的图像记为集合 U_y , 利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对上述函数集进行计算, 并记为 $F_y = F(u), u \in U_y$ 计算后绘制函数坐标图。

[0088] 第十步: 在 F_x 的坐标图中, 找到平行于横坐标的线段的端点。设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-x_{b1}, -x_{b2}, x_{b3}, x_{b4}$ 。同理, 在 F_y 的坐标图中, 找到平行于横坐标的线段的端点。设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-y_{d1}, -y_{d2}, y_{d3}, y_{d4}$ 。

[0089] 第十一步: 利用以下公式计算沿 X, Y 轴夹角 θ_x, θ_y

$$[0090] \quad \tan \theta_x = \frac{\delta}{(b_2 + b_3)t} t = 10 \mu\text{m} \text{—为载物台每次移动的补偿}$$

$$[0091] \quad \tan \theta_y = \frac{\delta}{(d_2 + d_3)t} \delta = 11.8 \mu\text{m} \text{—为数字显微镜的景深}$$

[0092] 第十二步:如图10所示,本发明实施例利用 b_2, b_3 的大小判别沿X轴倾角方向:

[0093] 当 $b_2 > b_3$ 时,微流控芯片在X轴上的夹角在顺时针方向为锐角;

[0094] 当 $b_2 < b_3$ 时,微流控芯片在X轴上的夹角在顺时针方向为钝角;

[0095] 同理,利用 d_2, d_3 的大小判别沿Y轴倾角方向。

[0096] 在步骤S603中,通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,以得到被激发荧光信号。

[0097] 可以理解的是,利用流体沿流速方向最能反映信息变化的特点,对被激发荧光区域的信号进行重建。

[0098] 进一步地,在本发明的一个实施例中,通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,进一步包括:利用数字显微镜采集液体在微流控芯片T区流动时,起始时刻 t_0 与完全反应 t_1 时的图像A和图像B;对图像A和图像B的前沿液面进行n次多项式拟合,以分别获得拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 ;连接拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 的峰值,由拟合曲线 C_0 的峰值到拟合曲线 C_1 的峰值确定为液体主流线的方向;对图像B的上下边界进行最小二乘法拟合,以获得两拟合直线,并平移拟合直线到边界峰值,对图像B的图像边界进行切割,以获得图像 B_1 ;以步长为N个像素向后平移拟合曲线 C_1 ,以得到曲线 C_2 ;设图像 B_1 的上下边界与曲线 C_2 的交点为交点 E_1 与交点 E_2 ,沿曲线 C_2 ,先由交点 E_1 到交点 E_2 对图像 B_1 在曲线上的像素进行补偿判别,再由交点 E_2 到交点 E_1 对图像 B_1 在曲线上的像素进行判别;在曲线 C_2 上的像素点全部判别完成后,重复上述平移过程,直至平移的曲线超出图像 B_1 的左边界;重复上述平移过程,直至不存在无效信号区。

[0099] 在本发明的一个实施例中,补偿判别具体包括:当遇到信号无效区域的无效像素点 Q_2 时,设无效像素点 Q_2 相邻上侧的沿主流线方向的有效信号像素点 P_1 和有效信号像素点 P_2 ;若曲线 C_2 在无效像素点 Q_2 处的垂线L上相邻无效像素点 Q_2 存在有效信号像素点 Q_1 ,则利用有效信号像素点 P_1 、有效信号像素点 P_2 和有效信号像素点 Q_1 对无效像素点 Q_2 的像素值进行补偿,补偿公式如下:

$$[0100] \quad G_{Q_2} = \frac{G_{P_2} - G_{P_1}}{T} G_{Q_1} K \cos \theta,$$

[0101] 其中, G_{Q_2} 为 Q_2 点的灰度值, T 为相邻两像素的空间距离, G_{Q_1} 为 Q_1 点的灰度值, K 为补偿系数, G_{P_2} 为 P_2 点的灰度值, G_{P_1} 为 P_1 点的灰度值, θ 为L与主流线方向的夹角;若曲线 C_2 在无效像素点 Q_2 处的垂线L上相邻无效像素点 Q_2 的不存在有效信号点为 Q_1 ,则不进行补偿。

[0102] 具体而言,被激发荧光区域的信号重建实例包括:

[0103] 第一步:如图11和图12所示,利用数字显微镜采集液体在微流控芯片T区流动时,起始时刻 t_0 ,以及完全反应 t_1 时的图像,分别记为图像A,图像B。

[0104] 第二步:如图13和图14所示,对图像A,B的前沿液面进行n次多项式拟合,分别获得拟合曲线,例如,对图像A,B的前沿液面进行4次多项式拟合,分别获得拟合曲线。分别记为曲线 C_0, C_1 。

[0105] 第三步:如图15所示,连接 C_0, C_1 的峰值,由 C_0 的峰值到 C_1 的峰值确定为液体主流线的方向。

[0106] 第四步:如图17所示,对图像B的上下边界进行最小二乘法拟合,获得两拟合直线。并如图18所示,平移拟合直线到边界峰值,对图像B的图像边界进行切割,获得图像 B_1 。

[0107] 第五步:以步长为N个像素,向后平移 C_1 ,得曲线 C_2 ,如,以步长为4个像素为例,向后平移 C_1 ,得曲线 C_2 。

[0108] 第六步:设图像 B_1 的上下边界与 C_2 的交点为 E_1 与 E_2 ,沿曲线 C_2 ,先由 E_1 到 E_2 对图像 B_1 在曲线上的像素进行补偿判别。再由 E_2 到 E_1 对图像 B_1 在曲线上的像素进行判别。

[0109] 如图18所示,补偿判别步骤:

[0110] 当遇到信号无效区域的无效像素点 Q_2 时:设 Q_2 相邻上侧(沿 C_2 的方向为由 E_2 到 E_1 时为相邻下侧)的沿主流线方向两有效信号像素点为 P_1, P_2 。

[0111] 若 C_2 在 Q_2 处的垂线 L 上相邻 Q_2 存在有效信号像素点 Q_1 ,则利用 P_1, P_2, Q_1 对 Q_2 的像素值进行补偿。

[0112] 补偿公式如下:
$$G_{Q_2} = \frac{G_{P_2} - G_{P_1}}{T} G_{Q_1} K \cos \theta,$$

[0113] 其中, G_{Q_2} 为 Q_2 点的灰度值, T 为相邻两像素的空间距离, G_{Q_1} 为 Q_1 点的灰度值, K 补偿系数, G_{P_2} 为 P_2 点的灰度值, G_{P_1} 为 P_1 点的灰度值, θ 为 L 与主流线方向的夹角。如 $K=0.05$ 。

[0114] 若 C_2 在 Q_2 处的垂线 L 上相邻 Q_2 的不存在有效信号点为 Q_1 ,则不进行补偿。重复上述补偿判别过程直至 C_2 上的像素点全部判别完成。

[0115] 若 C_2 在 Q_2 处的垂线 L 上相邻 Q_2 的不存在有效信号点为 Q_1 ,则不进行补偿。

[0116] 重复上述补偿判别过程直至 C_2 上的像素点全部判别完成。

[0117] 由于在微流控芯片中,沿液体流速方向的信号变化最为充分。但是每一点的流速不能精确的找出,而液体的主流速方向容易确定。距离主流速直线的点的流速与两者之间的距离成反比。比例系数可以用此点在拟合曲线 C_1 的垂线 L 与主流线的夹角 θ 的余弦值 $\cos \theta$ 乘以补偿系数 K 去表示。

[0118] 第七步:重复步骤五,步骤六。直至平移的曲线超出 B_1 的左边界。

[0119] 第八步:重复步骤五,六,七直至不存在无效信号区。

[0120] 当沿 C_1 进行像素补偿判别时,第一次遇到的无效信号像素点一定是无效信号区域的边界点,其附近一定存在有效信号像素点。而之后遇到的可能为位于无效信号区内的像素的,此类像素邻域均为无效信号像素点,所以无法进行补偿。每次重复完成步骤五,六,七时,无效信号区域都会向内部收缩。重复完成步骤五,六,七的过程类似于有效信号像素向无效信号像素区域的传递。

[0121] 综上,本发明实施例的方法采用数字显微镜存在景深,且前后的景深大小不同的特征,对微流控芯片倾斜角度进行测量;利用流体沿流速方向最能反映信息变化的特点,对被激发荧光区域的信号进行重建,从而解决了进行微流控芯片倾角测量与图像修复技术无法对无规律与纹理的微流控芯片的T区图像进行修复的问题。

[0122] 根据本发明实施例提出的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法,在进行夹角测量时不需要额外的倾斜传感器,不需要额外的旋转部件,利用数字图像处理的方法,测量速度快、精确,并利用了显微镜前后景深大小不同的概念,在进行被激发荧光信号的重建时,重建信号的可靠度高、误差小,从而有效提高后续浓度测量的精度,且运算速度快。

[0123] 其次参照附图描述根据本发明实施例提出的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置。

[0124] 图19是本发明一个实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置的结

构示意图。

[0125] 如图19所示,该用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置10包括:采集模块100、获取模块200和重建模块300。

[0126] 其中,采集模块100用于采集数字显微镜的前景深和后景深。获取模块200用于根据数字显微镜的前景深和后景深得到微流控芯片的倾斜角度。重建模块300用于通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建,以得到被激发荧光信号。本发明实施例的装置10测量速度快、精确,重建信号的可靠度高、误差小,有效提高后续浓度测量的精度,且运算速度快。

[0127] 进一步地,在本发明的一个实施例中,获取模块200进一步用于对微流控芯片的待观测区域进行对焦,以得到区域图像 x_0 ,且数字显微镜的位置记为 X, Y 轴零位点,将载物台沿 X 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 x_1 ,且重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 x_i 其中, N 为正整数,驱动载物台以使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点,将载物台沿 X 轴负方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 $-x_1$,重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 $-x_i$,驱动载物台以使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点,将载物台沿 Y 轴正方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 y_1 ,重复 N 次,以得到第 i 次移动后采集的图像 y_i ,驱动载物台以使数字显微镜回到 X, Y 轴零位点,将载物台沿 Y 轴负方向进行步长为 t 的移动,并获取移动后由数字显微镜采集的图像 $-y_1$,重复 N 次,并得到第 i 次移动后采集的图像 $-y_i$,将沿 X 轴拍摄的图像记为集合 U_x ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(x)$ 对集合 U_x 进行计算,并记为 $F_x = F(u), u \in U_x$,以计算后绘制函数坐标图,且沿 Y 轴拍摄的图像记为集合 U_y ,并利用改进的Brenner梯度函数 $F(y)$ 对集合 U_y 进行计算,并记为 $F_y = F(u), u \in U_y$,以计算后绘制函数坐标图,在 F_x 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,且在 F_y 的坐标图中,获取平行于横坐标的线段的端点,获取沿 X, Y 轴的夹角 θ_x 和夹角 θ_y ,根据夹角 θ_x 和夹角 θ_y 。

[0128] 进一步地,在本发明的一个实施例中,在 F_x 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-x_{b1}, -x_{b2}, x_{b3}$ 和 x_{b4} ,且在 F_y 的坐标图中,设沿坐标轴从左到右端点横坐标分别为 $-y_{d1}, -y_{d2}, y_{d3}$ 和 y_{d4} ,并且夹角 θ_x 和夹角 θ_y 的计算公式为:

$$[0129] \quad \tan \theta_x = \frac{\delta}{(b_2 + b_3)t},$$

$$[0130] \quad \tan \theta_y = \frac{\delta}{(d_2 + d_3)t},$$

[0131] 其中, t 为载物台每次移动的步长, δ 为数字显微镜的总景深;并且,当 $b_2 > b_3$ 时,微流控芯片在 X 轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $b_2 < b_3$ 时,微流控芯片在 X 轴上的夹角在顺时针方向为钝角,且当 $d_2 > d_3$ 时,微流控芯片在 Y 轴上的夹角在顺时针方向为锐角,当 $d_2 < d_3$ 时,微流控芯片在 Y 轴上的夹角在顺时针方向为钝角。

[0132] 进一步地,在本发明的一个实施例中,重建模块300进一步用于利用数字显微镜采集液体在微流控芯片 T 区流动时,起始时刻 t_0 与完全反应 t_1 时的图像A和图像B,对图像A和图像B的前沿液面进行 n 次多项式拟合,以分别获得拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 ,连接拟合曲线 C_0 和拟合曲线 C_1 的峰值,由拟合曲线 C_0 的峰值到拟合曲线 C_1 的峰值确定为液体主流线的方向,对图像B的上下边界进行最小二乘法拟合,以获得两拟合直线,并平移拟合直线到边界峰

值,对图像B的图像边界进行切割,以获得图像B₁,以步长为N个像素向后平移拟合曲线C₁,以得到曲线C₂,设图像B₁的上下边界与曲线C₂的交点为交点E₁与交点E₂,沿曲线C₂,先由交点E₁到交点E₂对图像B₁在曲线上的像素进行补偿判别,再由交点E₂到交点E₁对图像B₁在曲线上的像素进行判别,在曲线C₂上的像素点全部判别完成后,重复上述平移过程,直至平移的曲线超出图像B₁的左边界,重复上述平移过程,直至不存在无效信号区。

[0133] 进一步地,在本发明的一个实施例中,补偿判别具体包括:当遇到信号无效区域的无效像素点Q₂时,设无效像素点Q₂相邻上侧的沿主流线方向的有效信号像素点P₁和有效信号像素点P₂;若曲线C₂在无效像素点Q₂处的垂线L上相邻无效像素点Q₂存在有效信号像素点Q₁,则利用有效信号像素点P₁、有效信号像素点P₂和有效信号像素点Q₁对无效像素点Q₂的像素值进行补偿,补偿公式如下:

$$[0134] \quad G_{Q_2} = \frac{G_{P_2} - G_{P_1}}{T} G_{Q_1} K \cos \theta,$$

[0135] 其中,G_{Q₂}为Q₂点的灰度值,T为相邻两像素的空间距离,G_{Q₁}为Q₁点的灰度值,K为补偿系数,G_{P₂}为P₂点的灰度值,G_{P₁}为P点的灰度值,θ为L与主流线方向的夹角;若曲线C₂在无效像素点Q₂处的垂线L上相邻无效像素点Q₂的不存在有效信号点为Q₁,则不进行补偿。

[0136] 需要说明的是,前述对用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法实施例的解释说明也适用于该实施例的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,此处不再赘述。

[0137] 根据本发明实施例提出的用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测装置,在进行夹角测量时不需要额外的倾斜传感器,不需要额外的旋转部件,利用数字图像处理的方法,测量速度快、精确,并利用了显微镜前后景深大小不同的概念,在进行被激发荧光信号的重建时,重建信号的可靠度高、误差小,从而有效提高后续浓度测量的精度,且运算速度快。

[0138] 此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括至少一个该特征。在本发明的描述中,“多个”的含义是至少两个,例如两个,三个等,除非另有明确具体的限定。

[0139] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外,在不相互矛盾的情况下,本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0140] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例,可以理解的是,上述实施例是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

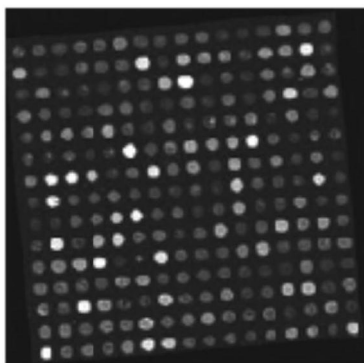


图1

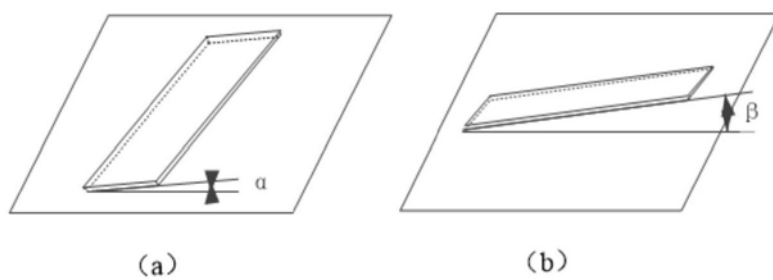


图2

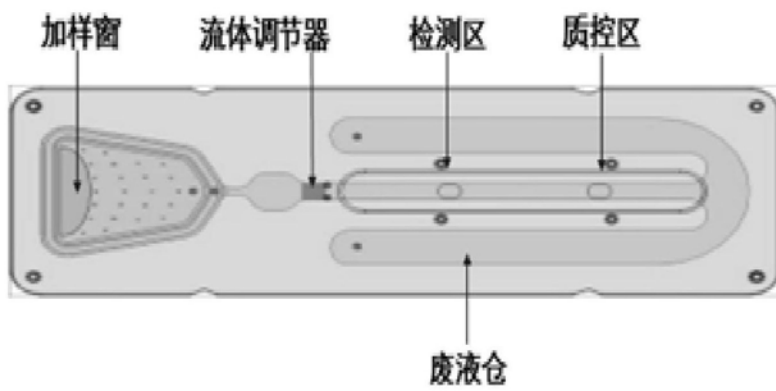


图3

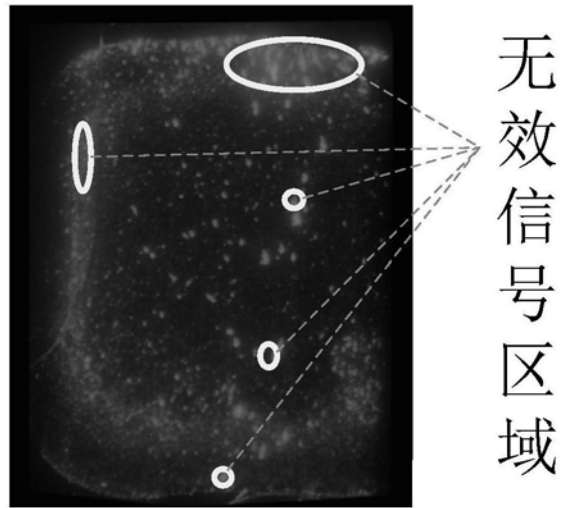


图4

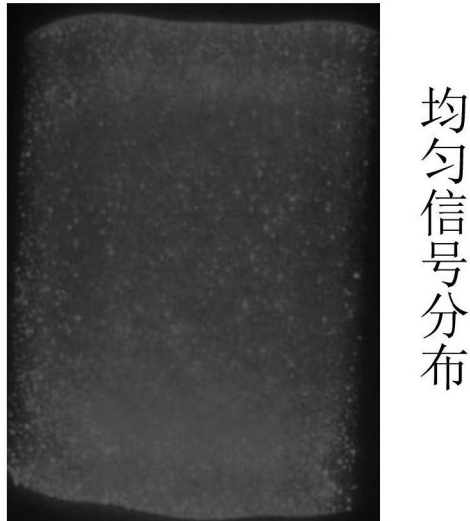


图5

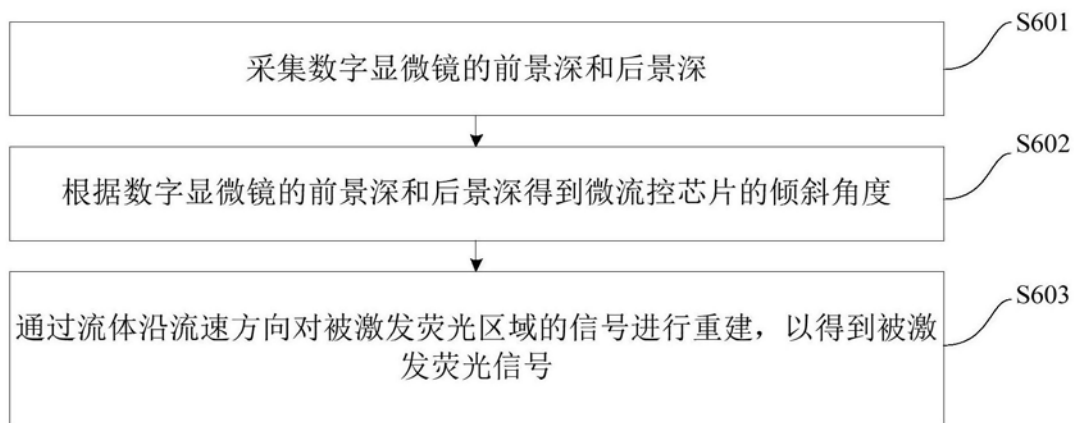


图6

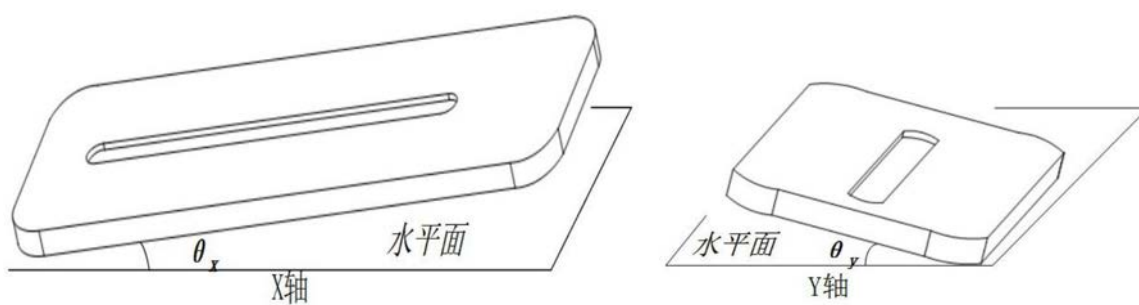


图7

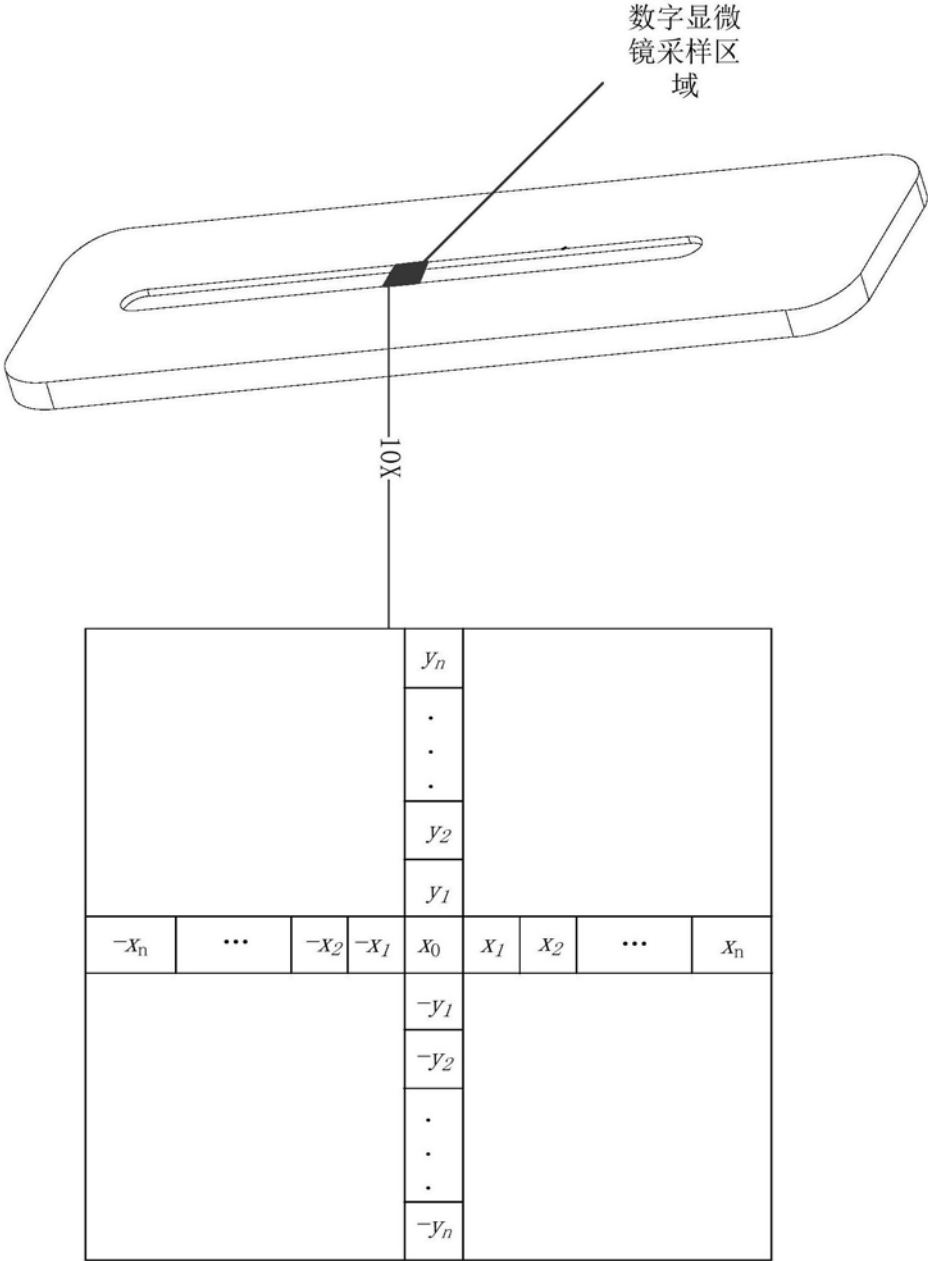


图8

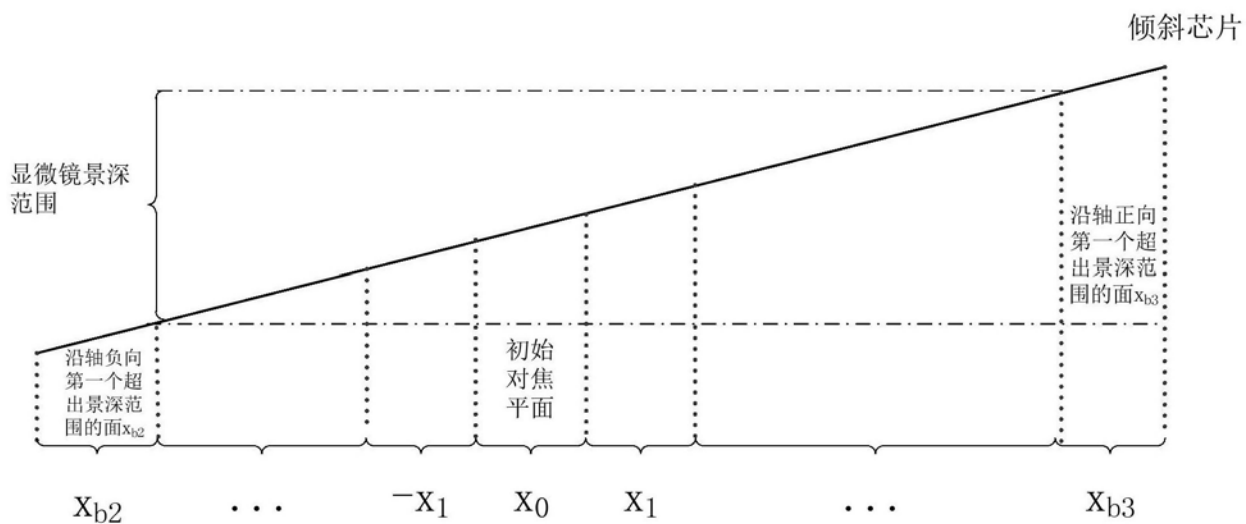


图9

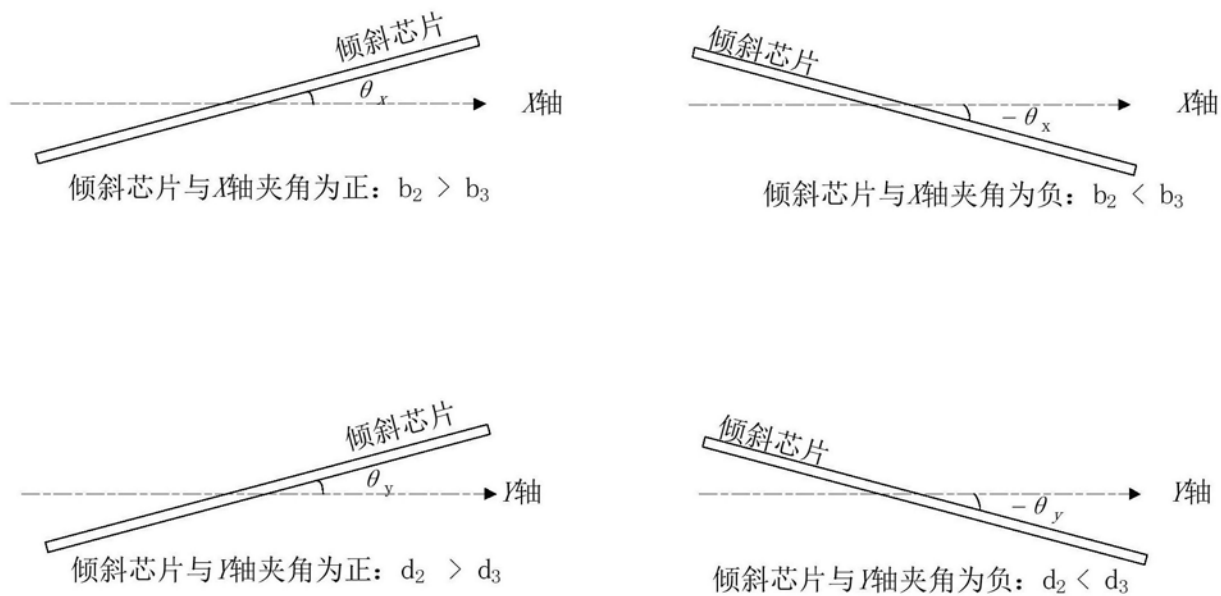


图10

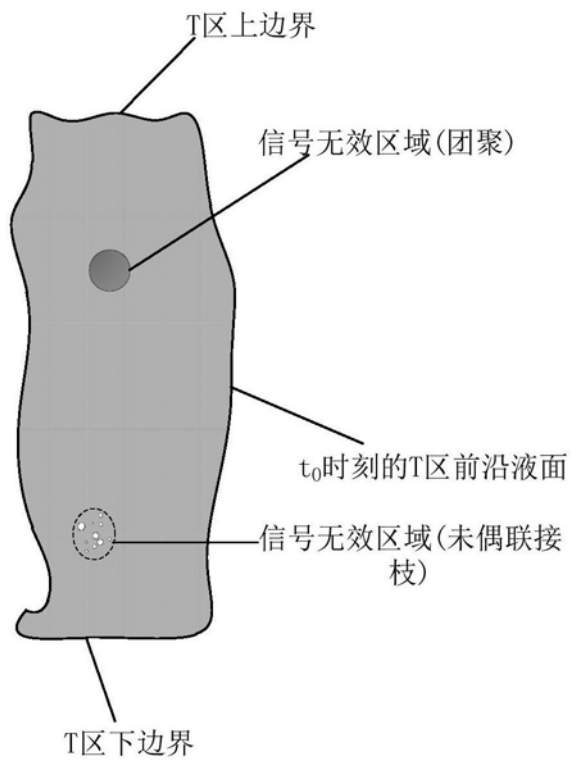


图11

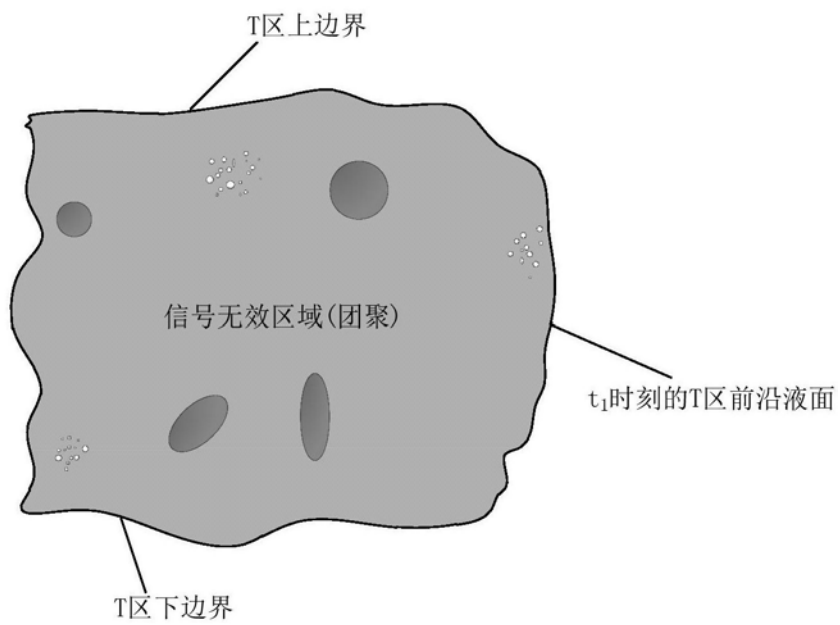


图12

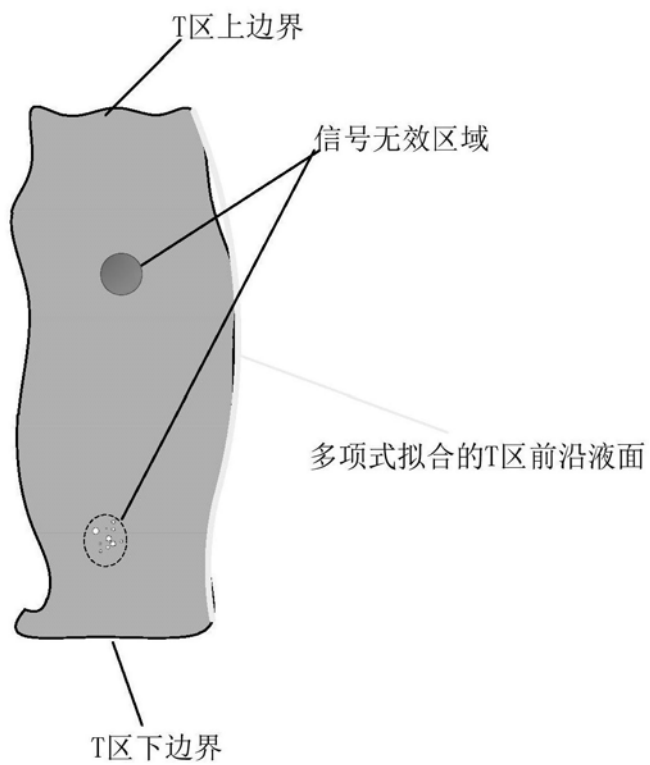


图13

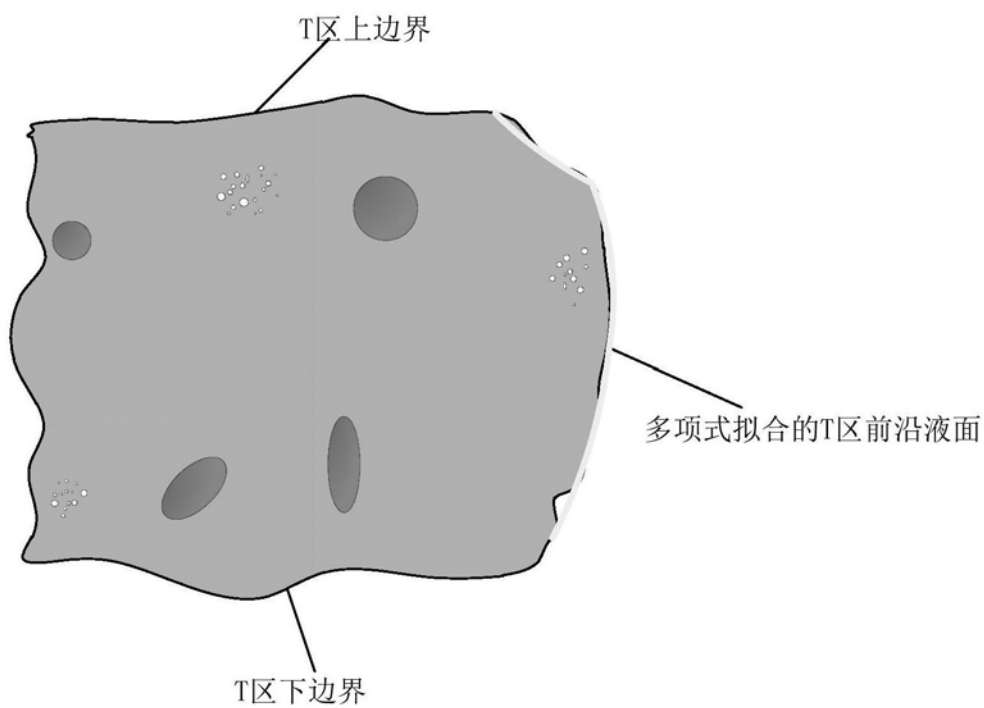


图14

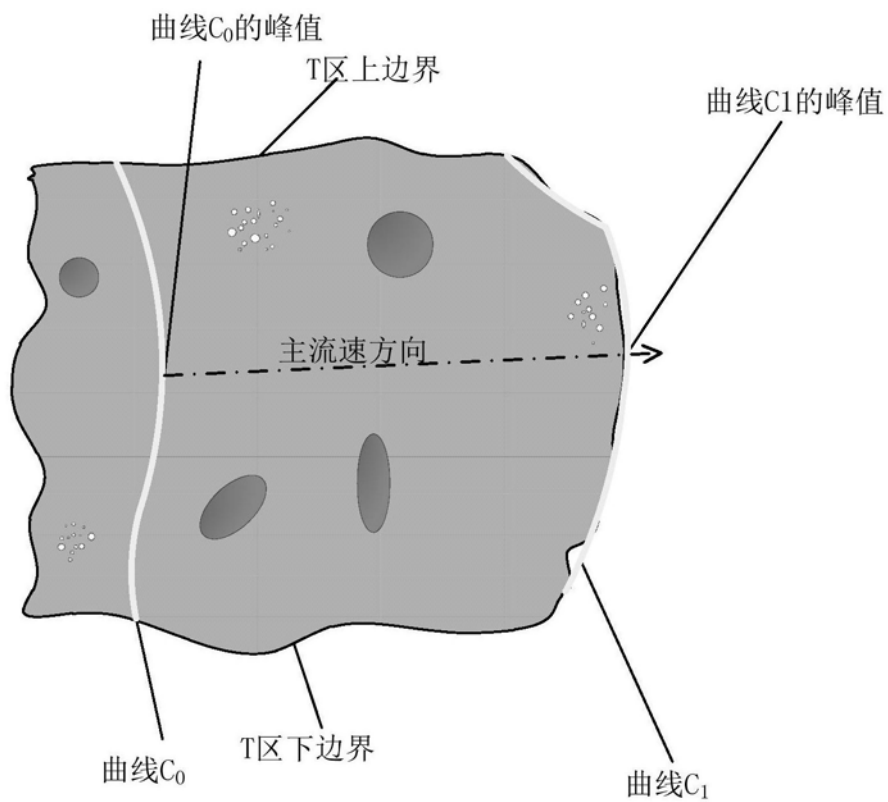


图15

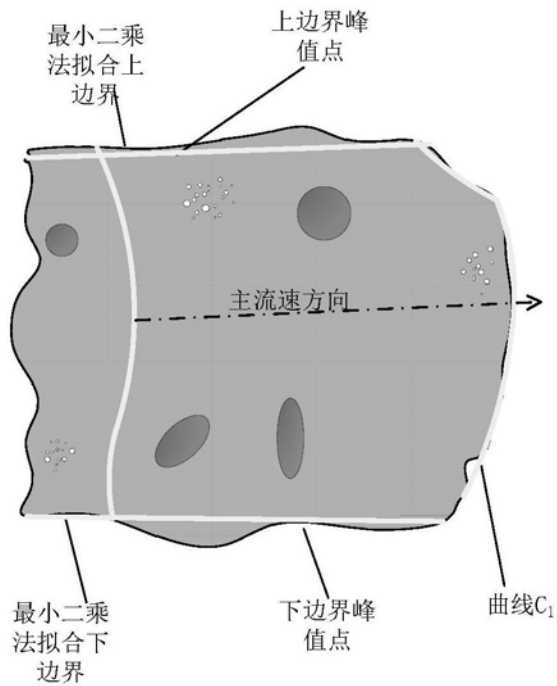


图16

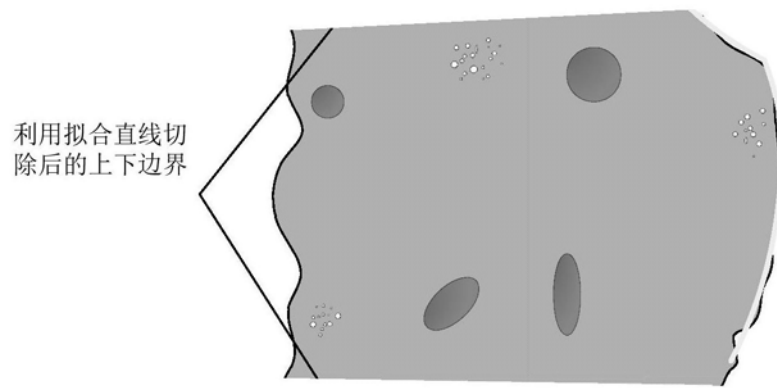


图17

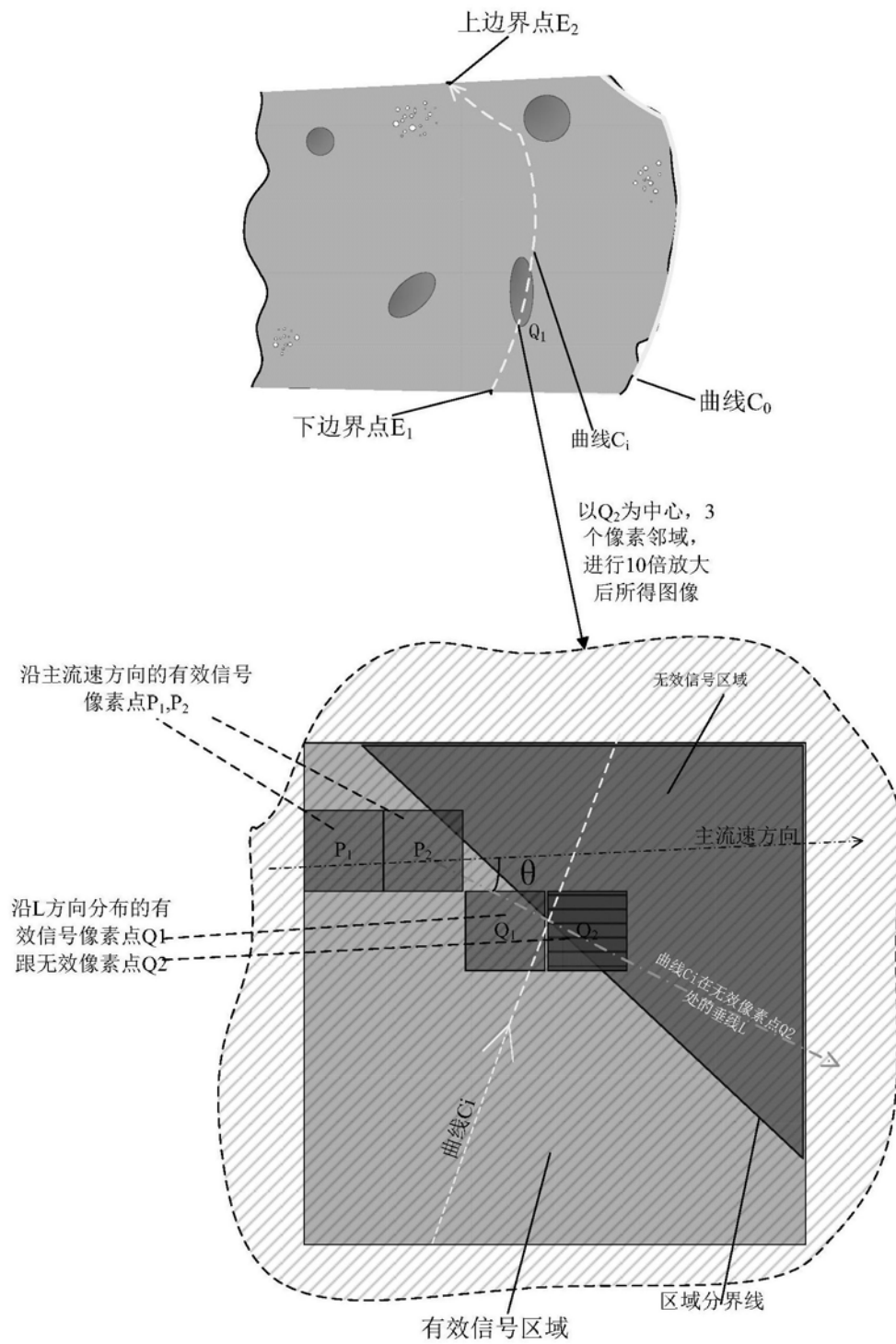


图18

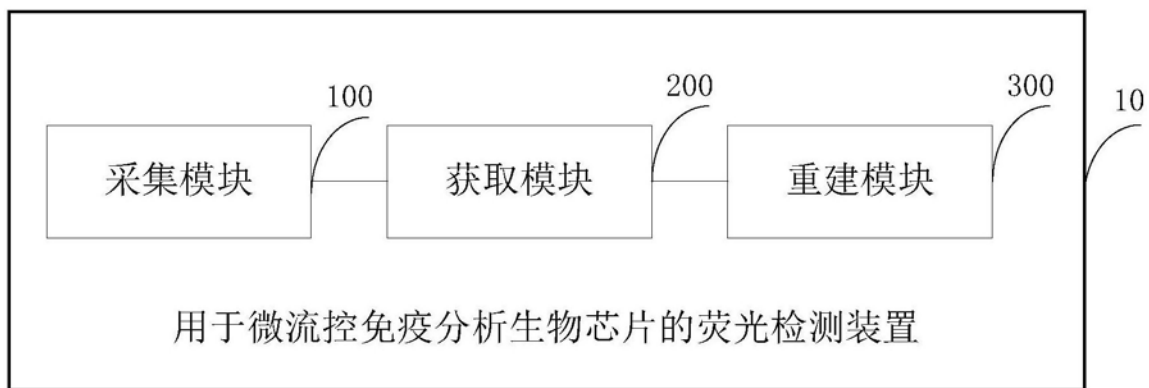


图19

专利名称(译)	用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法及装置		
公开(公告)号	CN110470830A	公开(公告)日	2019-11-19
申请号	CN201810448792.7	申请日	2018-05-11
[标]申请(专利权)人(译)	北京信息科技大学		
申请(专利权)人(译)	北京信息科技大学		
当前申请(专利权)人(译)	北京信息科技大学		
[标]发明人	孔全存 郭尚伟 刘桂礼 樊夏辉 杨海涛 赵双琦		
发明人	孔全存 郭尚伟 刘桂礼 樊夏辉 杨海涛 赵双琦		
IPC分类号	G01N33/533 G01N21/64		
CPC分类号	G01N21/6402 G01N33/533		
代理人(译)	张润		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种用于微流控免疫分析生物芯片的荧光检测方法及装置，其中，方法包括以下步骤：采集数字显微镜的前景深和背景深；根据数字显微镜的前景深和背景深得到微流控芯片的倾斜角度；通过流体沿流速方向对被激发荧光区域的信号进行重建，以得到被激发荧光信号。该方法测量速度快、精确，重建信号的可靠度高、误差小，有效提高后续浓度测量的精度，且运算速度快。

