



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111220801 A

(43)申请公布日 2020.06.02

(21)申请号 201911360053.3

G01N 33/53(2006.01)

(22)申请日 2019.12.25

(71)申请人 华南农业大学

地址 510642 广东省广州市天河区五山路
483号

申请人 山西省畜牧产品质量安全检验监测
中心

(72)发明人 李向梅 刘志威 武晋孝 冯俊吾
李嘉豪 梁早清 杨慧玲 王成
赵平伟 梁文丽

(74)专利代理机构 广州粤高专利商标代理有限
公司 44102

代理人 周建军

(51)Int.Cl.

G01N 33/558(2006.01)

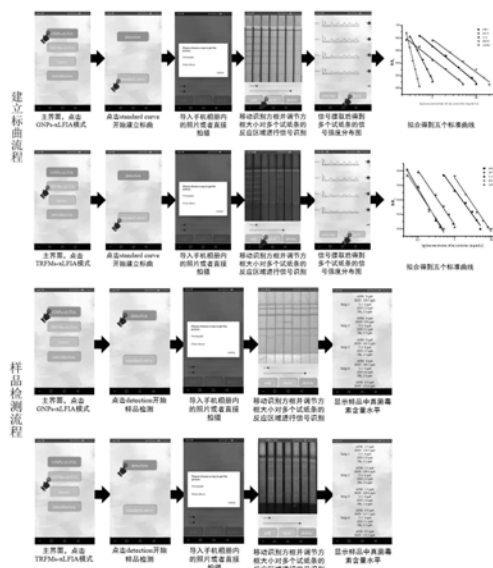
权利要求书1页 说明书12页 附图8页

(54)发明名称

基于智能手机的高通量多通道免疫层析分
析方法及系统

(57)摘要

本发明提供一种基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析方法及系统,该分析方法包括:获取免疫层析试纸条图像,提取待测图片检测区域的信号强度,对检测区域内各行的所有像素颜色值求平均值时,以第一个像素点作为“平均值”,从第二个像素点开始取,每取到一个像素点,则把这个像素点的值减去“平均值”,将所得的差除以当前所取的像素点的数量,再将该值加上“平均值”作为新的“平均值”,然后取下一个点,重复以上操作。当所有像素点都处理完后,最后的“平均值”即为该行所有像素颜色值的平均值。本发明可对检测通道上的多个试纸条同时进行检测,可实现多种小分子危害因子的多残留高通量分析,显著提高检测效率。



1. 一种基于智能手机的免疫层析分析方法,其特征在于,包括:

获取免疫层析试纸条图像,提取待测图片检测区域的信号强度,对检测区域内各行的所有像素颜色值求平均值时,以第一个像素点作为“平均值”,从第二个像素点开始取,每取到一个像素点,则将这个像素点的值减去“平均值”,将所得的差除以当前所取的像素点的数量,再将该值加上“平均值”作为新的“平均值”,然后取下一个点,重复以上操作。

当所有像素点都处理完后,最后的“平均值”即为该行所有像素颜色值的平均值。

2. 根据权利要求1所述的免疫层析检测方法,其特征在于,递归公式如下:

$$Avg_{n+1} = Avg_n + (P_{n+1} - Avg_n) / (n+1), n \geq 1, \text{初始条件为 } Avg_1 = P_1;$$

Avg_{n+1} : 前 $n+1$ 个像素值的平均值; Avg_n : 前 n 个像素值的平均值; P_{n+1} : 第 $n+1$ 个像素值。

3. 根据权利要求1所述的免疫层析检测方法,其特征在于:当免疫层析试纸条为荧光微球免疫层析试纸条时,检测扫描区域中的红色通道的值。

4. 根据权利要求1所述的免疫层析检测方法,其特征在于:当免疫层析试纸条为胶体金免疫层析试纸条时,对G和B两个通道的值做反色处理,然后取平均值,公式如下:

$$Result = [(255-G) + (255-B)] / 2.$$

5. 根据权利要求1所述的免疫层析检测方法,其特征在于:完成上述算法后,获得免疫层析试纸条反应区域的信号强度分布曲线,通过曲线上的信号峰值,计算各检测线与质控线的像素值之比,记为T/C值。

6. 根据权利要求5所述的免疫层析检测方法,其特征在于:以阳性样本的T/C值与阴性样本的T/C值之比 B_n/B_0 为纵坐标,以真菌毒素浓度的对数($\lg(\text{concentration of mycotoxins})$)为横坐标,建立标准曲线。

7. 根据权利要求6所述的免疫层析检测方法,其特征在于,每个标准曲线遵循以下拟合公式:

已知的点为 (x_i, y_i) , $i=1 \sim 6$; x_i : 真菌毒素药物浓度; y_i : B_n/B_0 , $n=1 \sim 6$;

记 $\bar{x}'$ 、 $\bar{y}'$ 为平均数, $\bar{x}' = (x_1+x_2+x_3+x_4+x_5+x_6)/6$, $\bar{y}' = (y_1+y_2+y_3+y_4+y_5+y_6)/6$ 为平均数;

拟合结果为:

$$k = \frac{\sum (x_i - \bar{x}') \cdot (y_i - \bar{y}')}{\sum (x_i - \bar{x}')^2}, b = \bar{y}' - k\bar{x}'.$$

8. 根据权利要求6所述的免疫层析检测方法,其特征在于,根据已设定的标准曲线,对待监测图片进行分析,根据权利要求1所述免疫层析分析方法,分析得到待检测样品中的真菌毒素药物浓度。

9. 根据权利要求1所述的免疫层析检测方法,其特征在于:获取免疫层析试纸条图像时,采用的拍摄装置包括暗箱(1),所述暗箱(1)上设有供拍摄器(2)拍照的拍摄孔(3)、可插入所述暗箱(1)内腔且用于安装待拍摄物的卡板(8)、至少一个发光组件(4),所述发光组件(4)包括光源,所述发光组件(4)的光源辐射的光照射至所述待拍摄物,所述拍摄器(2)通过所述拍摄孔(3)拍摄所述待拍摄物。

10. 一种基于智能手机的免疫层析检测系统,包括:

真菌毒素多残留免疫层析试纸条;

图像采集模块,用于获取待检测图像;

检测分析模块,用于检测分析所述待检测图像,检测分析方法如权利要求1-9任意一项所述。

基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析及系统

技术领域

[0001] 本发明涉及医学检测技术领域,特别是涉及一种基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析及系统。

背景技术

[0002] 真菌毒素主要是由曲霉、青霉和镰刀菌属产生的有毒次生代谢产物,广泛存在于各种粮食和饲料中(Alassane-Kpembé et al.,2017)。常见且危害性较大的真菌毒素有黄曲霉毒素(aflatoxin,AFT)、玉米赤霉烯酮(zearalenone,ZEN)、伏马毒素(fumonisin,FB)、呕吐毒素(deoxynivalenol,DON)以及T-2毒素等(王文珺et al.,2019)。这些真菌毒素通过被污染的粮食和饲料进入我们的食物链,从而对人类和牲畜健康带来不可逆的危害,主要表现为致畸性、致癌性和遗传毒性。据联合国粮食和农业组织统计,全球每年约有 25%的农作物受到真菌毒素不同程度的污染,约2%的农作物因污染严重而失去营养和经济价值,造成数千亿美元的经济损失(Schatzmayer et al.,2006)。由于大多数真菌可以产生多种真菌毒素,而且一种真菌也可以污染多种农产品及食品,再加上膳食多样化,粮食和谷物往往会受到多种真菌毒素的混合污染(Alassane-Kpembé et al.,2017),由此引起的联合毒性效应给人畜带来更大的威胁(郝旭晨et al.,2018)。1998年,Scudamore等人首次报道了玉米中真菌毒素混合污染的状况(Scudamore et al.,1998)。Guan等人对农产品进行了大规模检测,结果显示大部分的检测样品(97.6%)均受到两种或两种以上真菌毒素的污染(Guan et al.,2011)。可见,人类暴露于多种真菌污染的风险是毋庸置疑的,单一真菌毒素的检测方法已无法满足需求。因此,针对粮食和饲料开发真菌毒素多残留的检测方法对于保证食品安全具有重要意义。

[0003] 目前,真菌毒素多残留检测方法主要有仪器分析法和免疫分析法(谢瑜杰et al.,2018)。仪器分析法主要包括高效液相色谱(HPLC)和高效液相串联质谱(UPLC-MS/MS)。仪器分析法的结果准确可靠,但依赖价格昂贵的设备、复杂的样品前处理步骤、专业培训的操作人员,大大限制了真菌毒素多残留现场检测的应用。免疫分析方法是基于抗原-抗体特异性结合的检测方法,主要包括酶联免疫法和侧流免疫层析技术。其中,侧流免疫层析技术是真菌毒素检测的重要手段,具有快速、操作简单、成本低、高灵敏等特点,使其非常适合用于大量样本初筛与现场快速检测(Di Nardo et al.,2019)。然而,大多数基于免疫层析技术的研究仅仅针对一至三种真菌毒素的同时检测,无法将真菌毒素混合污染的风险降至最低(Sun et al.,2018,Zhang et al.,2017,Tang et al.,2017)。

[0004] 侧流免疫层析技术既可以通过肉眼进行定性或半定量分析,也能够结合读数仪器实现定量检测。但大多数研究采用了实验室专用的读数仪,该类设备笨重、昂贵,不利于随身携带,限制了现场的实时监控(Zhang et al.,2017,Yao et al.,2017)。随着智能手机的高速发展与普及,催生了便携装置现场快速检测的浪潮(Roda et al.,2016)。而现有的基于智能手机的免疫层析检测技术,单一分析仅可进行单一靶标的检测,不能实现多靶标的同时筛查。换言之,当单个免疫层析试纸条内空间分布有多个检测条带,现有的基于智能手

机的免疫层析检测技术无法获取所有条带的信号。如申请公布号为CN 107255712 A 的中国专利公开了一种基于智能手机的免疫层析芯片定量分析系统,其检测模块只能选取质控线和一条检测线矩形信号区域的像素值。另外,现有的基于智能手机的便携检测装置,每次只能分析单一免疫层析试纸条,单一通路的检测使得现有方法的应用受限,在进行大规模样品检测时,检测时间长,检测效率低,不利于大数据的收集和分析。如专利《基于智能手机的比色层析试纸条阅读检测装置及应用》中只设置了一个检测卡卡槽,每次分析仅能定量阅读单一试纸条的比色信号。

[0005] 参考文献:

[0006] ALASSANE-KPEMBI I,SCHATZMAYR G,TARANU I,et al.2017.Mycotoxins co-contamination:Methodological aspects and biological relevance of combined toxicity studies. Crit Rev Food Sci Nutr[J],57:3489-3507.

[0007] DI NARDO F,ALLADIO E,BAGGIANI C,et al.2019.Colour-encoded lateral flow immunoassay for the simultaneous detection of aflatoxin B1 and type-B fumonisins in a single Test line.Talanta[J],192:288-294.

[0008] GUAN S,GONG M,YIN Y,et al.2011.Occurrence of mycotoxins in feeds and feed ingredients in China.Journal of Food,Agriculture and Environment[J],9.

[0009] RODA A,MICHELINI E,ZANGHERI M,et al.2016.Smartphone-based biosensors: A critical review and perspectives.Trac-Trends in Analytical Chemistry[J],79: 317-325.

[0010] SCHATZMAYR G,ZEHNER F,TAUBEL M,et al.2006.Microbiologicals for deactivating mycotoxins.Molecular Nutrition&Food Research[J],50:543-551.

[0011] SCUDAMORE K A,NAWAZ S,HETMANSKI M T 1998.Mycotoxins in ingredients of animal feeding stuffs:II.Determination of mycotoxins in maize and maize products.Food Additives and Contaminants[J],15:30-55.

[0012] SUN S J,ZHENG P M,ZHAO S J,et al.2018.Time-resolved fluorescent immunochromatographic assay-based on three antibody labels for the simultaneous detection of aflatoxin B-land zearalenone in Chinese herbal medicines.Food Additives and Contaminants Part a-Chemistry Analysis Control Exposure&Risk Assessment[J],35:2434-2442.

[0013] TANG X Q,LI P W,ZHANG Q,et al.2017.Time-Resolved Fluorescence Immunochromatographic Assay Developed Using Two Idiotypic Nanobodies for Rapid, Quantitative,and Simultaneous Detection of Aflatoxin and Zearalenone in Maize and Its Products.Analytical Chemistry[J],89:11520-11528.

[0014] YAO J J,SUN Y N,LI Q M,et al.2017.Colloidal gold-McAb probe-based rapid immunoassay strip for simultaneous detection of fumonisins in maize.Journal of the Science of Food and Agriculture[J],97:2223-2229.

[0015] ZHANG X Y,YU X Z,WEN K,et al.2017.Multiplex Lateral Flow Immunoassays Based on Amorphous Carbon Nanoparticles for Detecting Three Fusarium Mycotoxins in Maize. Journal of Agricultural and Food Chemistry[J],65:8063-

8071.

[0016] 郝旭晨,董燕婕,范丽霞,et al.2018.谷物及饲料中真菌毒素混合污染及其体外联合毒性研究.农产品质量与安全[J]:34-38.

[0017] 王文珺,孙双艳,叶金,et al.2019.我国现行真菌毒素检测标准概述.食品安全质量检测学报[J],10:837-847.

[0018] 谢瑜杰,陈辉,彭涛,et al.2018.食品与饲料基质中真菌毒素检测技术研究进展.食品安全质量检测学报[J],9:1234-1246.

发明内容

[0019] 为了克服现有技术的缺陷,本发明的目的在于提供一种基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析方法及系统,建立快速检测真菌毒素多残留的方法,同时定量检测谷物和饲料中的伏马毒素B₁,玉米赤霉烯酮,T-2毒素,呕吐毒素和黄曲霉毒素B₁。该分析系统能够一次同时完成免疫层析试纸条检测区域上多个待测指标的信号提取分析,并且能够实现多个免疫层析试纸条的并行分析,所述分析系统简单便捷,制作成本低,将更加利于现场的大规模样品高通量检测。

[0020] 本发明上述目的通过以下技术方案实现:

[0021] 本发明提供一种基于智能手机免疫层析分析方法,包括:

[0022] 获取免疫层析试纸条图像,提取待测图片检测区域的信号强度,对检测区域内各行的所有像素颜色值求平均值时,以第一个像素点作为“平均值”,从第二个像素点开始取,每取到一个像素点,则将这个像素点的值减去“平均值”,将所得的差除以当前所取的像素点的数量,再将该值加上“平均值”作为新的“平均值”,然后取下一个点,重复以上操作。当所有像素点都处理完后,最后的“平均值”即为该行所有像素颜色值的平均值。

[0023] 可选地,递归公式如下:

[0024]
$$\text{Avg}_{n+1} = \text{Avg}_n + (\text{P}_{n+1} - \text{Avg}_n) / (n+1), (n \geq 1, \text{初始条件为 } \text{Avg}_1 = \text{P}_1);$$

[0025] Avg_{n+1} :前n+1个像素值的平均值; Avg_n :前n个像素值的平均值; P_{n+1} :第n+1个像素值。

[0026] 可选地,当免疫层析试纸条为荧光微球免疫层析试纸条时,检测扫描区域中的红色通道的值。

[0027] 可选地,当免疫层析试纸条为胶体金免疫层析试纸条时,对G和B两个通道的值做反色处理,然后取平均值,公式如下:

[0028]
$$\text{Result} = [(255 - G) + (255 - B)] / 2.$$

[0029] 可选地,完成上述算法后,获得免疫层析试纸条反应区域的信号强度分布曲线,通过曲线上的信号峰值,计算各检测线与质控线的像素值之比,记为T/C值。

[0030] 可选地,以阳性样本的T/C值与阴性样本的T/C值之比 B_n/B_0 为纵坐标,以真菌毒素浓度的对数($\lg(\text{concentration of mycotoxins})$)为横坐标,建立标准曲线。

[0031] 可选地,每个标准曲线遵循以下拟合公式:

[0032] 已知的点为 (x_i, y_i) , $i = 1 \sim 6$; x_i :真菌毒素药物浓度; y_i : B_n/B_0 , $n = 1 \sim 6$;

[0033] 记 $\bar{x}$ 、 $\bar{y}$ 为平均数, $\bar{x} = (x_1 + x_2 + x_3 + x_4 + x_5 + x_6) / 6$, $\bar{y} = (y_1 + y_2 + y_3 + y_4 + y_5 + y_6) / 6$ 为平均数;

[0034] 拟合结果为：

[0035] $k = \frac{\sum (x_i - \bar{x}') \cdot (y_i - \bar{y}')}{\sum (x_i - \bar{x}')^2}$, $b = \bar{y}' - k\bar{x}'$ 。

[0036] 上述公式的适用不限于真菌毒素药物,也可以为其他药物。

[0037] 可选地,根据已设定的标准曲线,对待监测图片进行分析,根据上述信号提取方式,分析得到待检测样品中真菌毒素药物浓度。

[0038] 可选地,所述免疫层析试纸条为真菌毒素多残留免疫层析试纸条。所述免疫层析试纸条也可用于检测兽药残留、非法添加物等。

[0039] 可选地,获取免疫层析试纸条图像时,采用的拍摄装置包括暗箱,所述暗箱上设有供拍摄器拍照的拍摄孔、可插入所述暗箱内腔且用于安装待拍摄物的卡板、至少一个发光组件,所述发光组件包括光源,所述暗箱的内腔设有用于安装待拍摄物的卡板,所述发光组件的光源辐射的光照射至所述待拍摄物,所述拍摄器通过所述拍摄孔拍摄所述待拍摄物。

[0040] 本发明还提供一种基于智能手机的免疫层析检测系统,包括:

[0041] 真菌毒素多残留免疫层析试纸条

[0042] 图像采集模块,用于获取待检测图像;

[0043] 检测分析模块,用于检测分析所述待检测图像,检测分析方法如上所述。

[0044] 本发明具有以下有益效果:

[0045] 1、本发明可同时实现试纸条上多个条带的信号数据读取及分析,并通过WIFI进行数据的传输及分享。

[0046] 2、本发明可对检测通道上的多个试纸条同时进行检测,可实现多种小分子危害因子的多残留高通量分析,显著提高检测效率。

附图说明

[0047] 图1显示为本发明实施例的分析应用软件操作流程图中。

[0048] 图2显示为本发明实施例的基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析系统及真菌毒素多残留检测方法流程图。

[0049] 图3显示为本发明实施例用于免疫层析检测的的拍摄装置示意图。

[0050] 图4显示为本发明实施例用于免疫层析检测的的拍摄装置拆解示意图。

[0051] 图5显示为本发明实施例的发光组件结构示意图。

[0052] 图6显示为本发明实施例的发光组件透视结构示意图。

[0053] 图7显示为本发明实施例的发光组件剖视结构示意图。

[0054] 图8显示为本发明实施例的线路槽结构示意图。

[0055] 图9显示为本发明实施例的滑轨结构示意图。

[0056] 图10显示为本发明实施例的真菌毒素多残留免疫层析试纸条结构示意图。

[0057] 图11显示为本发明实施例的卡板结构示意图。

[0058] 图12显示为本发明实施例的供电电路模块示意图。

[0059] 图13显示为本发明实施例的盖板示意图。

[0060] 标号说明

[0061] 1、暗箱;2、相机;3、拍摄孔;4、发光组件;41、纳线槽;42、第一安装部;43、第二安装部;44、光片安装槽;45、斜切面;46、出光孔;47、通道;5、可见光光源;6、紫外光光源;7、光源

安装槽;71、支撑部;72、线路槽;8、卡板;81、安装槽;82、卡板凸起部;9、固定板;91、窗口;92、凹陷部;10、供电槽;11、充电接口;12、样品垫;13、底板;14、硝酸纤维素膜;15、吸水纸;16、检测线;17、质控线;18、滤光片;19、减光片;20、插口;201、滑轨;202、限位槽;21、纳线腔;22、定位孔;23、安装孔;24、盖板;25、通孔;26、开关孔。

具体实施方式

[0062] 以下结合说明书附图和具体实施例来进一步说明本发明,但实施例并不对本发明做任何形式的限定。除非特别说明,本发明采用的试剂、方法和设备为本技术领域常规试剂、方法和设备。

[0063] 除非特别说明,以下实施例所用试剂和材料均为市购。

[0064] 如图10所示,真菌毒素多残留免疫层析试纸条,包括PVC底板13、样品垫12、吸水纸15和硝酸纤维素膜14;检测区域包括FB₁-BSA、ZEN-BSA、T-2-BSA、DON-BSA 和AFB₁-BSA,共五种包被抗原,以最优的工作浓度在硝酸纤维素膜上依次组成五条检测线16;质控线17为羊抗鼠IgG。

[0065] 本发明实施例的免疫层析试纸条采用竞争法进行真菌毒素多残留的检测,将五种真菌毒素抗体标记探针与待测样品混合孵育后,再通过毛细作用使待测物在层析条上移动,与检测区域上的包被抗原进行显色反应。胶体金易于合成,稳定性高,成本低,它是免疫层析检测中比较常用的标记物;而荧光纳米材料的使用大大提高了检测灵敏度,另外镧系标记物具有较大的斯托克斯位移的优点(>150nm),荧光寿命更长,与传统荧光纳米材料相比,大大减少了非特异性荧光信号的干扰。本发明使用了粒径30nm的胶体金或粒径为200nm的时间分辨荧光微球作为标记探针。

[0066] 样品垫12为RB65材质,样品垫处理液为0.05M PB含有0.5%吐温-20、0.3%PVP和5%蔗糖,该样品垫处理液可增加样品垫亲水性,促进层析,保证标记探针的稳定性;硝酸纤维素膜14孔径为15μm,足够大的孔径具有理想的跑样速率,短时间内提供分析结果。

[0067] 真菌毒素多残留免疫层析试纸条由以下方法制备:将最佳工作浓度的五种包被抗原以及羊抗鼠IgG通过划膜仪固定于硝酸纤维素膜上,依次形成五条检测线16和一条质控线17,然后放置于37℃烘箱烘干12h,随后将样品垫12、硝酸纤维素膜14和吸水纸15 顺次搭接粘贴在PVC底板13上构成真菌毒素多残留免疫层析试纸条。

[0068] 如图1所示,分析应用软件以APP的形式安装于智能手机系统内,APP兼容性高,覆盖多种手机品牌;本发明实施例以MAIMANG 6 (Huawei,China) 智能手机作为分析应用软件的载体。该分析应用软件具有标准曲线建立、样品检测和历史记录功能。

[0069] 分析应用软件提供两种检测模式的选择,分别为胶体金多残留免疫层析试纸条(GNPs-LFIA) 和时间分辨荧光微球多残留免疫层析试纸条(TRFMs-LFIA)。信号强度的提取以像素点为单位,每个像素点由R、G、B三个颜色通道组成,信号强度的提取即是按照一定方式对当前像素点的三个颜色通道的值进行处理,并返回处理结果。当检测 GNPs-LFIA时,通过选择待测图片的反色中蓝绿部分的平均值(即:[(255-G)+(255-B)]/2) 进行信号的处理;当检测TRFMs-LFIA时,通过选择待测图片的R值来进行信号的处理。

[0070] 提取信号强度所遵循的方式如下:

[0071] 荧光微球免疫层析试纸条:对荧光微球免疫层析试纸条的识别主要是检测扫描区

域中的红色通道的值,故结果即为红色通道值:

[0072] $Result = R;$

[0073] R:红色通道值。

[0074] 胶体金免疫层析试纸条:由于RGB三颜色通道显像的规律是数值上从小到大,颜色上则由黑到白,因此,为了得到其较为明显的特征,需要对G和B通道做反色处理,然后求平均值,公式如下:

[0075] $Result = [(255-G) + (255-B)]/2;$

[0076] 公式中的255是三颜色通道显像的颜色上限值。

[0077] 对图片选择了特定的RGB通道后,分析应用软件以扫描的方式进行信号强度的提取。该方式通过系统内可移动且可改变大小的识别方框(绿色的方框)对免疫层析试纸条上反应区域进行整体识别,在该识别方框内以扫描的方式从上往下分别识别质控线和五条检测线,一次性完成该试纸条检测区域所有的信号强度提取。扫描过程以行为单位,获取每一行的结果前,先对该行的所有像素颜色值求平均值,而每一行都有可能包含成千上万个像素点,常规的方法是将全部像素颜色值加起来再除以像素点的个数,全部像素颜色值加起来的总值非常大,可能溢出的地方是全部加起来的和,用常规的方法先求平均值,再除以数量的方式求平均值可能会出现数据溢出,因此,此处用新的方法实现求平均值。具体地,以第一个像素点作为“平均值”,从第二个像素点开始取,每取到一个像素点,则将这个像素点的值减去“平均值”,将所得的差除以当前所取的像素点的数量,再将这个值加上“平均值”作为新的“平均值”,然后取下一个点,重复以上操作。当所有像素点都处理完后,最后的“平均值”便是该行所有像素颜色值的平均值。

[0078] 递归公式如下:

[0079] $Avg_{n+1} = Avg_n + (P_{n+1} - Avg_n) / (n+1), (n \geq 1, \text{初始条件为 } Avg_1 = P_1);$

[0080] Avg_{n+1} :前n+1个像素值的平均值; Avg_n :前n个像素值的平均值; P_{n+1} :第n+1个像素值。

[0081] 此外,分析应用软件内识别方框的数量可根据免疫层析试纸条的数量进行增删。当拍摄的图片里具有多个免疫层析试纸条,通过系统内的“ADD”键增加矩形区域的数量,对多个免疫层析试纸条的检测区域进行识别;若需减少矩形区域,可通过“DELETE”键实现。

[0082] 根据目前现有的基于智能手机免疫层析分析方法,其只能实现单一试纸条的单靶标分析,而上述提出的方法可实现多个试纸条的多靶标分析,一方面在算法上有效避免数据溢出,另一方面有效提升了计算速度,进而显著提升检测效率。

[0083] 该分析应用软件能够同时一次性建立多个标准曲线,避免繁琐的操作,方法如下:往0.2M PB缓冲溶液中加入已知浓度确定体积的混标液,多个含不同体积混标的缓冲溶液组成一个梯度,取150 μ L含混标液的缓冲溶液与五种真菌毒素抗体标记探针混合孵育3min,插入免疫层析试纸条跑样5min后,放置于图3的卡板8上,卡板安装上固定板9 对试纸条进行固定,推入暗箱底部开口处;根据试纸条上标记探针的种类,打开相应的光源,通过智能手机后置摄像头进行拍照,根据上述信号提取方式,获得T/C值;以阳性样本比阴性样本的T/C值(B_n/B_0)为纵坐标,真菌毒素浓度的对数($\lg(\text{concentration of mycotoxins})$)为横坐标建立标曲,每个标准曲线遵循以下拟合公式:

[0084] 6个已知的点为(x_i, y_i), $i=1 \sim 6$; x:真菌毒素药物浓度; y: B_n/B_0 , $n=1 \sim 6$;

[0085] 记 $\bar{x}$ 、 $\bar{y}$ 为平均数, $\bar{x} = (x_1+x_2+x_3+x_4+x_5+x_6)/6$, $\bar{y} = (y_1+y_2+y_3+y_4+y_5+y_6)/6$ 为平均数;

[0086] 则拟合结果为:

[0087] $k = \sum (x_i - \bar{x}) \cdot (y_i - \bar{y}) / \sum (x_i - \bar{x})^2$, $b = \bar{y} - k\bar{x}$ 。

[0088] 根据已设定的标准曲线,该分析应用软件可对现场拍摄的图片或者储存于智能手机照片册中的图片进行分析,通过以上描述的信号提取方式,能够同时分析多个实际样品中的多个待测分析物,大大提高检测效率,利于大规模样品的检测。

[0089] 如图2所示,在一些实施例中,基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析及真菌毒素多残留检测步骤如下:

[0090] 步骤一:配置6个含不同体积混标的缓冲溶液,1个不含混标的缓冲溶液,分别取150 μ L与五种真菌毒素抗体标记探针在酶标孔内混合孵育3min,插入免疫层析试纸条显色反应5min。

[0091] 步骤二:弃除样品垫终止反应,将免疫层析试纸条放至卡板内,固定板固定后,插入暗箱底部,选择相应光源,操作智能手机内的分析应用软件提取信号值。

[0092] 步骤三:在分析应用软件内输入五种真菌毒素药物的浓度梯度,拟合后即可得到五个真菌毒素的标准曲线。

[0093] 步骤四:取150 μ L经0.2M PB稀释(稀释至标准曲线检测范围内)的实际样品提取液加至酶标孔内,与五种真菌毒素抗体标记探针在酶标孔内混合孵育3min,插入免疫层析试纸条显色反应5min。

[0094] 步骤五:弃除样品垫终止反应,将免疫层析试纸条放至卡板,固定板固定后,插入暗箱底部,选择相应光源,操作智能手机内的分析应用软件提取信号值,并自动导入已建立的标准曲线,分别计算出样品中五种真菌毒素的浓度。

[0095] 步骤六:样品检测数据自动保存,在软件主界面的历史记录中可翻阅查看,并可通过WIFI功能上传到服务器,便于大规模数据的整理分析。

[0096] 本发明的检测分析方法既可在智能手机上进行检测分析,也可在计算机、平板电脑等其它电子设备上进行,优选在在智能手机上进行,操作方便,便于携带。

[0097] 实施例1

[0098] 图1显示为本实施例的分析应用软件操作流程,图2显示为本实施例的基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析及真菌毒素多残留检测方法流程图。

[0099] 拍摄待检测试纸条的图片时,可以在暗箱内进行,还可以借助于可见光光源、紫外光光源以及滤光片、减光片,将所需的光源经过滤光片、减光片处理后,照射至待拍摄的试纸条,通过手机或其它相机拍摄得到所需的清晰图像。

[0100] 1、分析应用软件的设计及操作流程

[0101] 在本实施例中,分析应用软件以APP的形式安装于智能手机系统内,具有标准曲线建立、样品检测和历史记录功能。在使用该软件前,需要根据免疫层析试纸条的标记探针种类,在免疫层析检测装置上打开对应的光源,然后在软件系统的主界面选择待测免疫层析试纸条的种类:胶体金免疫层析或时间分辨荧光微球免疫层析。此外,两种读数模式是根据图片不同的RGB通道进行信号处理。

[0102] 1) 信号的提取方式:分析应用软件以扫描的算法方式进行信号强度的提取。该方

式通过系统内可移动且可改变大小的识别方框对免疫层析试纸条上反应区域进行整体识别,通过调节屏幕下方的两个滚动条,调节识别方框的长和宽,使得识别方框完全覆盖反应区域的五条检测线和一条质控线,以扫描的方式一次性完成该试纸条检测区域所有的信号强度提取。另外,识别方框数量可根据免疫层析试纸条的数量进行灵活增删。当拍摄的图片里具有多个免疫层析试纸条,可通过系统内的“ADD”键增加矩形区域的数量,对多个免疫层析试纸条的检测区域进行识别;若需减少矩形区域,可通过“DELETE”键来实现。因此,该软件的信号提取方式能够实现高通量多通道的快速检测。

[0103] 2) 标准曲线的建立方法:往0.2M PB缓冲溶液加入已知浓度确定体积的真菌毒素混标液,多个含不同体积混标的样品组成一个梯度,取150 μ L上述混合溶液与五种真菌毒素抗体标探针混合孵育3min,采用免疫层析试纸条进行检测5min后,放置于卡板,用固定板固定后,推入暗箱底部;根据试纸条上标记探针的种类,打开相应的光源,通过智能手机后置摄像头进行拍照,使用分析应用软件提取信号,获得T/C值;以阳性样本比阴性样本的T/C值(B_x/B_0)为纵坐标,真菌毒素浓度对数($\lg(\text{concentration of mycotoxins})$)为横坐标建立标准曲线,使用者可以给建立的标准曲线命名,对多条标准曲线进行区分,并自动保存。

[0104] 3) 样品分析:在样品分析时,根据已设定的标准曲线以及以上描述的信号提取方式,使用者可现场拍摄并立即通过分析应用软件进行信号提取分析,信号值自动导入已建立的标曲,计算出样品中待测物浓度。当样品量过多时,所拍摄的多个照片可预先储存于智能手机的照片册内,后续可经过分析应用软件逐一导入进行异地操作。此外,计算出来的待测物浓度会自动保存,在软件主界面的历史记录中可翻阅查看,并可通过WIFI 功能上传到服务器,便于大规模数据的整理分析。

[0105] 2、真菌毒素多残留免疫层析试纸条的制备

[0106] 如图10所示,真菌毒素多残留免疫层析试纸条由样品垫12、硝酸纤维素膜14、吸水纸15和PVC底板13组成。 FB_1 -BSA、ZEN-BSA、T-2-BSA、DON-BSA和 AFB_1 -BSA五种包被抗原以及羊抗鼠IgG以最优工作浓度固定于硝酸纤维素膜上,依次形成五条检测线16和一条质控线17。然后放置于37 $^{\circ}$ C烘箱烘干12h,随后将样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成真菌毒素多残留免疫层析试纸条。

[0107] 1) 胶体金标记探针的制备:准备五个1.5mL离心管,分别加入1mL万分之四的胶体金溶液,粒径为30nm,用0.2M的 K_2CO_3 调节pH,针对黄曲霉毒素 B_1 、玉米赤霉烯酮、伏马毒素 B_1 、呕吐毒素和T-2毒素五种真菌毒素抗体性能的不同,分别加入8 μ L、9 μ L、8 μ L、15 μ L和30 μ L的0.2M的 K_2CO_3 ,然后分别加入5 μ g、8 μ g、10 μ g、5 μ g、4 μ g对应抗体,反应10min后,加入40 μ L 10%BSA封闭10min,10000rpm离心10 min,弃上清,复溶于200 μ L复溶液。复溶液配方为0.02M pH 7.4的PB缓冲液,PB缓冲液含0.8%Triton X-100、2%蔗糖、0.2%BSA和0.03% NaN_3 。

[0108] 2) 时间分辨荧光微球探针的制备:准备五个1.5mL离心管,取10 μ L固含量为1%,粒径为200nm的时间分辨荧光微球于pH 6.5的1mL EDC溶液中,加入15 μ L 0.5mg/mL EDC和20 μ L 0.5mg/mL NHS进行活化反应15min,15000rpm离心10min去上清,复溶于1mL pH 8.0硼酸缓冲溶液中,针对黄曲霉毒素 B_1 、玉米赤霉烯酮、伏马毒素 B_1 、呕吐毒素和T-2毒素五种真菌毒素抗体性能的不同,分别加入2.5 μ g、4 μ g、5 μ g、2 μ g、1.5 μ g对应抗体,反应40min后,加入20 μ L 20%BSA封闭1h,15000rpm离心10min 去上清,复溶于200 μ L复溶液。复溶液配方同上。

[0109] 3) 样品垫的处理:样品垫在使用前需经过处理液的处理,处理液配方为0.05M pH 7.4 PB的缓冲体系,含0.5%Tween-20,0.3%PVP,0.5%BSA和5%的蔗糖。使用处理液对样品浸泡,37℃烘干过夜(12h)。

[0110] 4) 胶体金多残留免疫层析试纸条的组装:FB₁-BSA、ZEN-BSA、T-2-BSA、DON-BSA和AFB₁-BSA五种包被抗原的最优工作浓度分别为:0.41mg/mL、0.13 mg/mL、0.09mg/mL、0.4mg/mL和0.17mg/mL。羊抗鼠IgG工作浓度为0.35mg/mL。样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接粘贴在底板上,构成真菌毒素多残留免疫层析试纸条。

[0111] 5) 时间分辨荧光微球多残留免疫层析试纸条的组装:FB₁-BSA、ZEN-BSA、T-2-BSA、DON-BSA和AFB₁-BSA五种包被抗原的最优工作浓度分别为:0.83mg/mL、0.4mg/mL、0.56mg/mL、0.6mg/mL和0.1mg/mL。羊抗鼠IgG工作浓度为0.29 mg/mL。样品垫、硝酸纤维素膜和吸水纸顺次搭接粘贴在底板上构成真菌毒素多残留免疫层析试纸条。

[0112] 3、谷物和饲料样品前处理

[0113] 称取1g粉末谷物或饲料样本,加入5mL甲醇/水(80:20,v/v)含20mM PB的提取液,涡旋2min;4000rpm离心5min,收集上清;用0.2M PB溶液对上清稀释后使用上述多残留免疫层析试纸条进行检测。

[0114] 4、免疫层析试纸条拍摄装置的研发

[0115] 本发明采用的拍摄装置具体可以如图3和图4所示,一种用于免疫层析检测的拍摄装置,包括暗箱1,暗箱1上设有供拍摄器2拍照的拍摄孔3、可插入暗箱1内腔且用于安装待拍摄物的卡板8、至少一个发光组件4,发光组件4包括光源,发光组件4的光源辐射的光照射至待拍摄物,拍摄器2通过拍摄孔3拍摄待拍摄物。暗箱1起到遮挡外部光线的作用,拍摄时,由发光组件4提供光源,使得拍摄的图像更加清晰,发光组件4的数量不受限制,可以为一个、两个或多个,在一实施例中,当该装置用于拍摄免疫层析试纸条时,发光组件4的数量为两个,位于拍摄孔3的两侧,拍摄孔3位于暗箱1的顶部,便于拍摄器2对暗箱1内的待拍摄物进行拍摄。

[0116] 拍摄器2可以为照相机,也可以为手机,优选为智能手机,用于安装分析软件,便于后续对获取的图像进行分析。当拍摄器2为相机或非智能手机时,可将拍摄得到的图像转移至安装有分析软件的电脑等设备,进行后续的图像分析。

[0117] 暗箱1的形状不受限制,可以为立方体、圆柱体等,优选为立方体结构,更优选为六面体结构。

[0118] 发光组件4还包括依次安装在光源下方的滤光片18、减光片19,滤光片18、减光片19对光源发出的光分别起到滤光、减光作用,使得拍摄的图像更有利于后续的分析。

[0119] 在一些实施例中,发光组件4还包括第一安装部42、位于第一安装部42下部的第二安装部43,第一安装部42、第二安装部43内贯穿设有通道47,光源安装在第一安装部42的通道47内,滤光片18、减光片19安装在第二安装部43的通道47内。第一安装部42、第二安装部43的形状形状不受限制,可以为多面体结构、柱体结构或其他结构。

[0120] 在一些实施例中,第一安装部42的直径大于第二安装部43的直径,暗箱1的顶部设有光源安装槽7,光源安装槽7的内壁设有用于支撑第一安装部42的支撑部71,安装时,整个发光组件4沿光源安装槽7向下移动,第二安装部43向下进入暗箱1的内腔,当第一安装部42与支撑部71接触时,第一安装部42被支撑部71限位,在支撑部71的支撑作用下,整个发光组

件4不再向下移动。支撑部71可以为多种结构,例如,支撑部71可以呈环形,环绕在光源安装槽7的内壁,支撑部71也可以是周向布置在光源安装槽7内壁的多个凸起,各凸起起到支撑第一安装部42下底面的作用。

[0121] 而本装置的光源辐射范围广,能够同时覆盖多个试纸条的检测区域,实现多个样本的即时检测,利于大数据的收集与分析。

[0122] 在一些实施例中,第一安装部42为长方体结构或圆柱体结构,第二安装部43为圆柱体结构,便于装入光源安装槽7中,减少位置干涉。

[0123] 第一安装部42上设有用于容纳电线的纳线槽41,暗箱1上还设有与光源安装槽7连通的线路槽72,纳线槽41正对线路槽72,纳线槽41、线路槽72均起到容纳电线的作用,避免电线散布造成操作不方便。

[0124] 如图5、图6和图7所示,第二安装部43的侧壁设有用于安装滤光片18、减光片19的光片安装槽44,滤光片18、减光片19可以从侧面插入光片安装槽44,实现滤光片18、减光片19的安装。在一些实施例中,光片安装槽44的数量为两个,从上往下,第一个光片安装槽44安装滤光片18,第二个光片安装槽44安装减光片19,光源被固定在第一安装部42的内壁,并位于滤光片18的上方。

[0125] 在一些实施例中,第二安装部43的底部具有斜切面45,使得出光孔46射出的光具有更大的照射范围,以利于图像的拍摄。

[0126] 在一些实施例中,如图4和图8所示,暗箱1的侧壁设有用于安装供电电路模块的供电槽10,供电槽10与线路槽72连通,使得发光组件4中的光源可以通过电线连接至供电槽10的供电电源。在另一些实施例中,供电槽10也可以设置在暗箱11的底部。在一些实施例中,供电电路模块示意图如图12所示,紫外光光源与可见光光源并联,设有独立的控制开关,便于在必要时打开所需光源,可充电电池为光源提供电源,需要充电时,将4.2V充电器插入充电接口11,对电池进行充电。

[0127] 供电槽10连通有用于容纳电线的纳线腔21,纳线腔21起到容纳电线的作用。

[0128] 暗箱1上设有与纳线腔21连通的充电接口11,充电接口11具体可以为USB接口。

[0129] 在一些实施例中,供电电源可以为电池,位于供电槽10内的可充电电池通过接线连接正负极,接线延长经过纳线腔21并连接USB接口11。

[0130] 在一些实施例中,所述暗箱1上还设有可覆盖所述供电槽10的盖板24,在一些实施例中,盖板24的结构如图13所示,暗箱1的供电槽10内边缘设有安装孔23,安装孔23具体可以设置在供电槽10的角落,便于固定盖板24,盖板24上设有与安装孔23对应的通孔25,安装孔23、通孔25具体可以为螺孔,当供电电路模块安装完毕后,将螺栓旋入安装孔23、通孔25中,使得盖板24被固定于供电槽10和纳线腔21外部,将供电槽10和纳线腔21内的供电电路模块覆盖;盖板24上设有两个开关孔26,用于凸露供电电路模块的两个开关,便于可见光光源5和紫外光光源6的切换。

[0131] 暗箱1上还设有插口20,卡板8通过该插口20插入暗箱1的内腔。插口20的位置可以是暗箱1的侧壁中部,也可以是侧壁底部。在一些实施例中,如图4和图9所示,插口20位于暗箱1侧壁的底部,使得待拍摄物能够被光源完全照射。

[0132] 暗箱1的内壁设有至少一个的滑轨201,滑轨201起到支撑、限位卡板8的作用,工作人员手持卡板8,沿滑轨201将其推入暗箱1内腔。在一些实施方案中,暗箱1的内壁设置互相

平行的两个滑轨201,两个滑轨201之间形成限位槽202,起到引导卡板8进入暗箱1的内腔的作用,同时也对卡板8起到限位作用。

[0133] 在一些实施方案中,供电槽10所在的侧壁与插口20所在的侧壁相邻,在另一些实施方案中,供电槽10所在的侧壁与插口20所在的侧壁相对。

[0134] 在一些实施方案中,还包括用于将待拍摄物压紧在卡板8上表面的固定板9,固定板9的形状不受限制,例如,可以在卡板8的两端分别覆盖一个固定板9。

[0135] 在一些实施方案中,固定板9上设有使待拍摄物的待拍摄部位显露的窗口91,使得待拍摄部位不会被遮挡。

[0136] 在一些实施方案中,如图4和图11所示,卡板8的至少一侧边设有向上凸起的卡板凸起部82,固定板9的底部设有可与卡板凸起部82匹配的凹陷部92,卡板凸起部82与凹陷部92紧密贴合时,固定板9的底部可以压紧在待拍摄物两端的上表面,避免卡板8插入插口20时,卡板8上的待拍摄物发生位移。在一些实施方案中,卡板凸起部82位于卡板8的两端,卡板凸起部82垂直于卡板8进入插口20的方向。

[0137] 卡板8上设有至少一个用于安装待拍摄物的安装槽81,安装槽81的数量根据需要而设计,可以为一个、两个、三个或更多,当待拍摄物为试纸条时,每个安装槽81独立安装一个试纸条,使得试纸条在卡板8上的位置不会发生移动。

[0138] 拍摄时,工作人员可以手持拍摄器进行拍摄,也可以将拍摄器固定在支撑架上进行拍摄,以获取清晰的图像。

[0139] 在一些实施方案中,暗箱1上还设有用于安装拍摄器支撑架的定位孔22,安装支撑架可有效避免手的晃动造成图像不清晰。

[0140] 在一些实施方案中,当待拍摄物为免疫层析试纸条时,如图8所示为真菌毒素多残留免疫层析试纸条结构示意图,试纸条包括底板13,底板13的两端设有样品垫12,硝酸纤维素膜14铺设在底板13的中部,硝酸纤维素膜14的一端被样品垫12压住,另一端被吸水纸15压住,硝酸纤维素膜14上设有至少一条检测线16以及一条质控线17,质控线17靠近吸水纸15。底板13具体可以为PVC材质。

[0141] 上述装置的使用过程如下:将多个试纸条安装至卡板8的安装槽81,然后将固定板9压紧至卡板8,将卡板8与固定板9组合体沿暗箱1内壁的滑轨201插入暗箱1的内腔,通过供电槽10中的供电电路模块供电,打开所需的光源,手持拍摄器2,置于拍摄孔3的上方,调整至合适的拍摄位之后,即可进行拍照,获取图像。

[0142] 上述装置可以通过3D打印制得,成本低廉、体积小、重量轻、便携性高,该装置适用于任何一款智能手机,非常适合小分子危害因子的现场检测。

[0143] 综上所述,本发明具有以下有益效果:

[0144] 1、本发明首次建立了基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析系统,能够实现多个待测指标以及多个样品的同时定量检测,显著降低了免疫层析分析系统的复杂度,显著提高了检测效率,利于大数据的收集和分析。

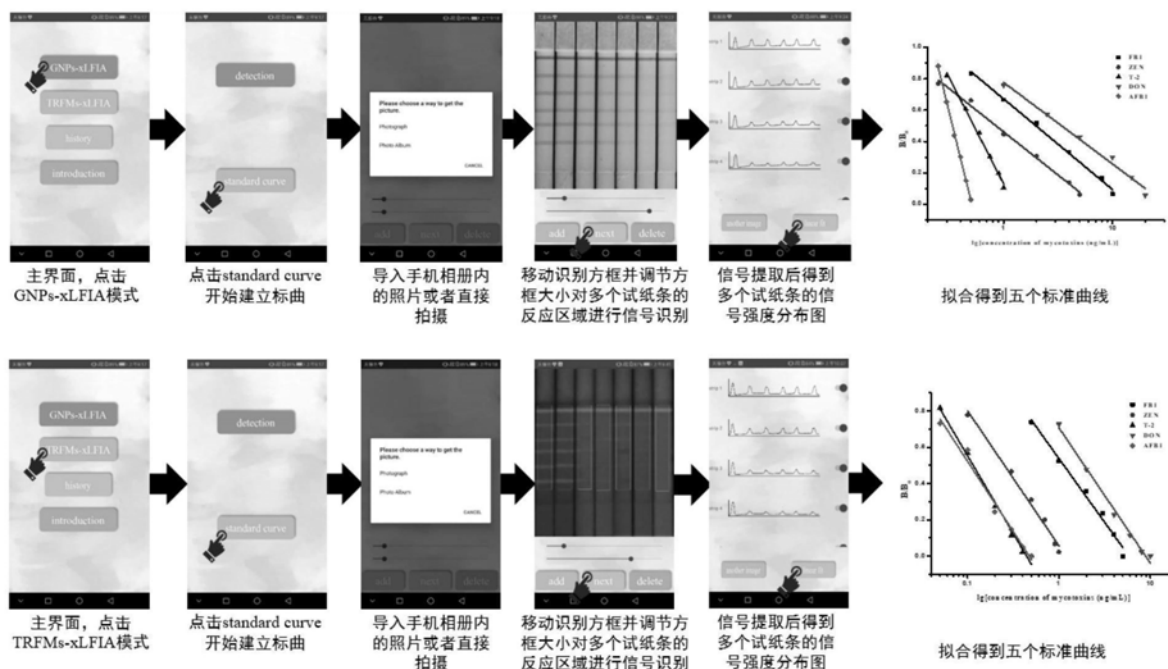
[0145] 2、本发明的免疫层析检测装置可通过3D打印快速制备,成本低廉、体积小、重量轻、便携性高;另外,分析应用软件兼容性好,使用者只需在智能手机上安装软件,并准备好免疫层析检测装置,即可实现现场自行检测,操作方便简单。

[0146] 3、本发明能够一次同时建立五个标准曲线,避免繁琐操作,即时应用于现场检测。

[0147] 4、本发明研发的真菌毒素多残留免疫层析试纸条可通过肉眼定性或半定量快速检测样品中五种真菌毒素,同时也可以结合基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析系统实现现场定量检测,具有高通量、成本低、简单快速的优点。。

[0148] 上述实施例为本发明较佳的实施方式,但本发明的实施方式并不受上述实施例的限制,其他的任何未背离本发明的精神实质与原理下所作的改变、修饰、替代、组合、简化,均应为等效的置换方式,都包含在本发明的保护范围之内。

建立标准曲线流程



样品检测流程

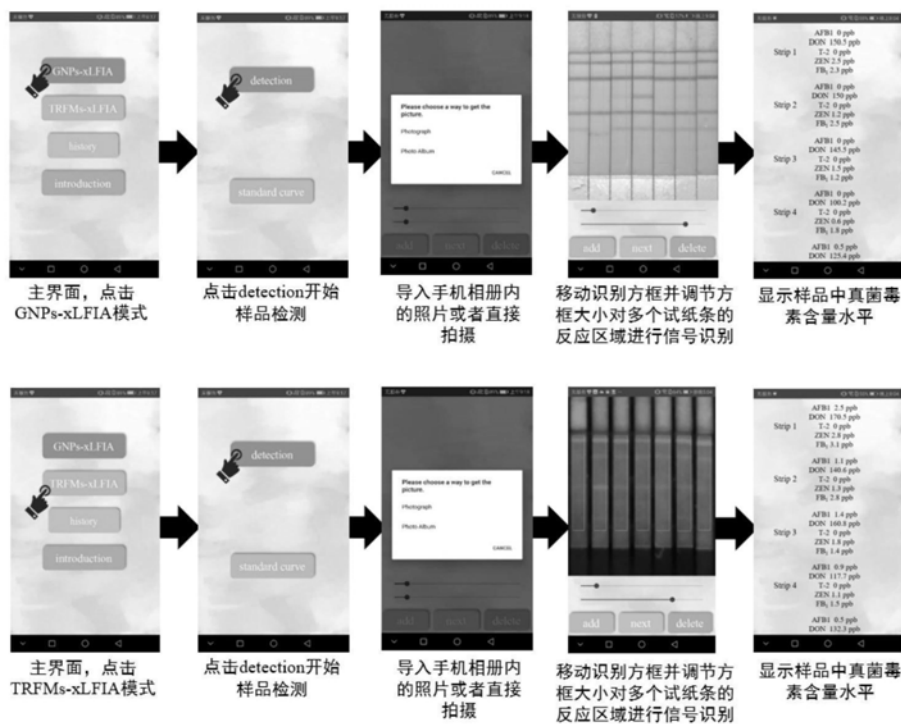


图1

建立
标准
曲线

配置6个含不同体积混标的缓冲溶液，1个不含混标的缓冲溶液，分别取150 μL 与五种真菌毒素抗体标记探针在酶标孔内混合孵育3 min，插入免疫层析试纸条显色反应5min

弃除样品垫终止反应，将免疫层析试纸条放至卡板内，固定板固定后，插入暗箱底部，选择相应光源，操作智能手机内的分析应用软件提取信号值

在分析应用软件内输入五种真菌毒素药物的浓度梯度，拟合后即可得到五个真菌毒素的标准曲线

样品
检测

取150 μL 经0.2 M PB稀释（稀释至标准曲线检测范围内）的实际样品提取液加至酶标孔内，与五种真菌毒素抗体标记探针在酶标孔内混合孵育3 min，插入免疫层析试纸条显色反应5min

操作智能手机内的分析应用软件提取信号值，显示出样品中五种真菌毒素的浓度

数据自动保存，在历史记录中可翻阅查看，并可通过WIFI功能上传到服务器，便于大规模数据的整理分析

图2

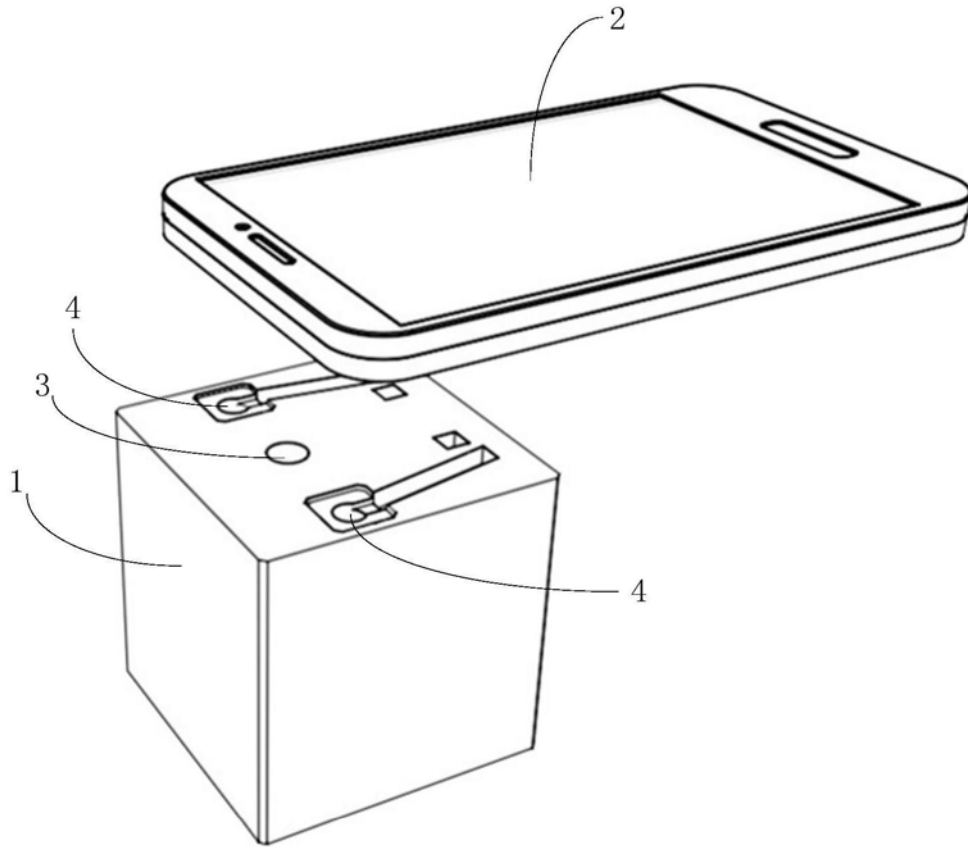


图3

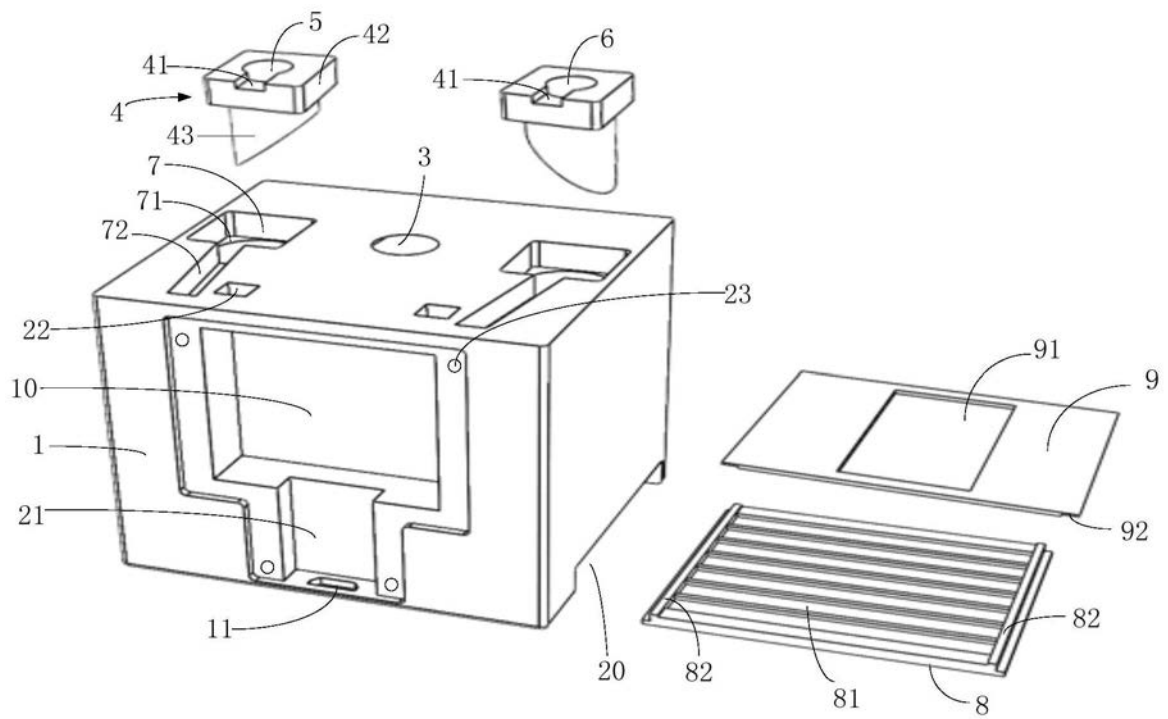


图4

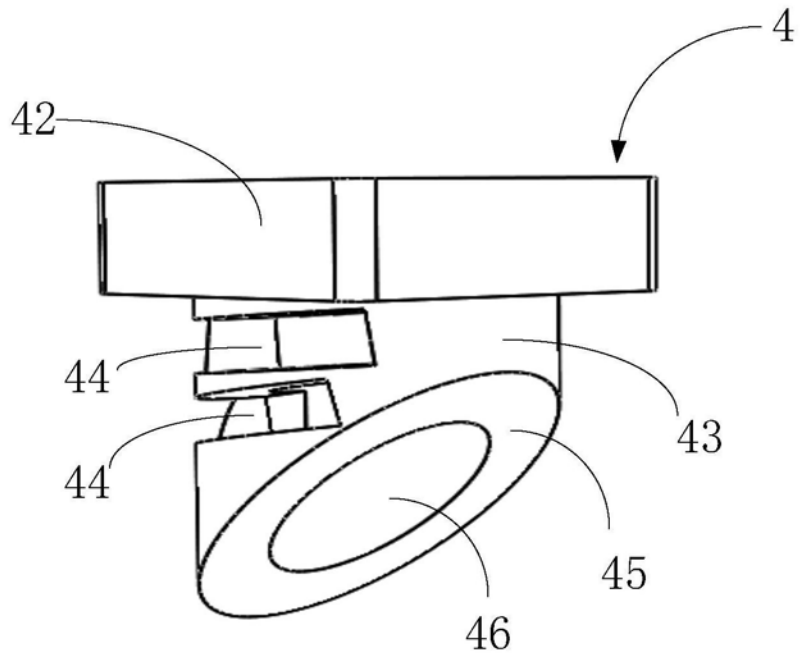


图5

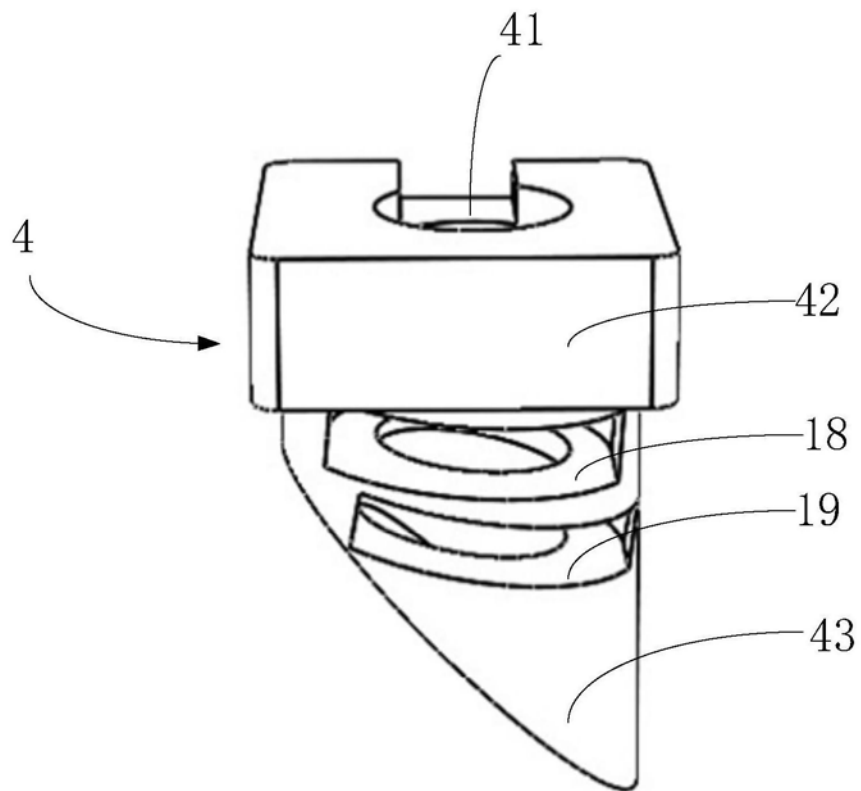


图6

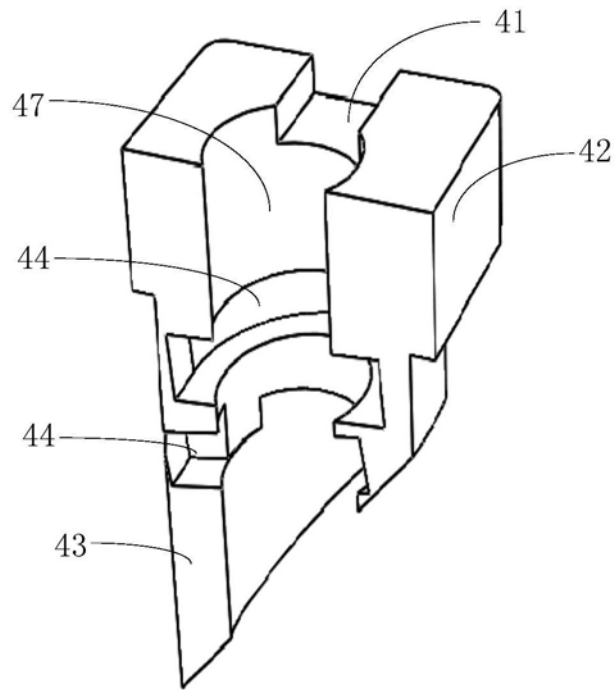


图7

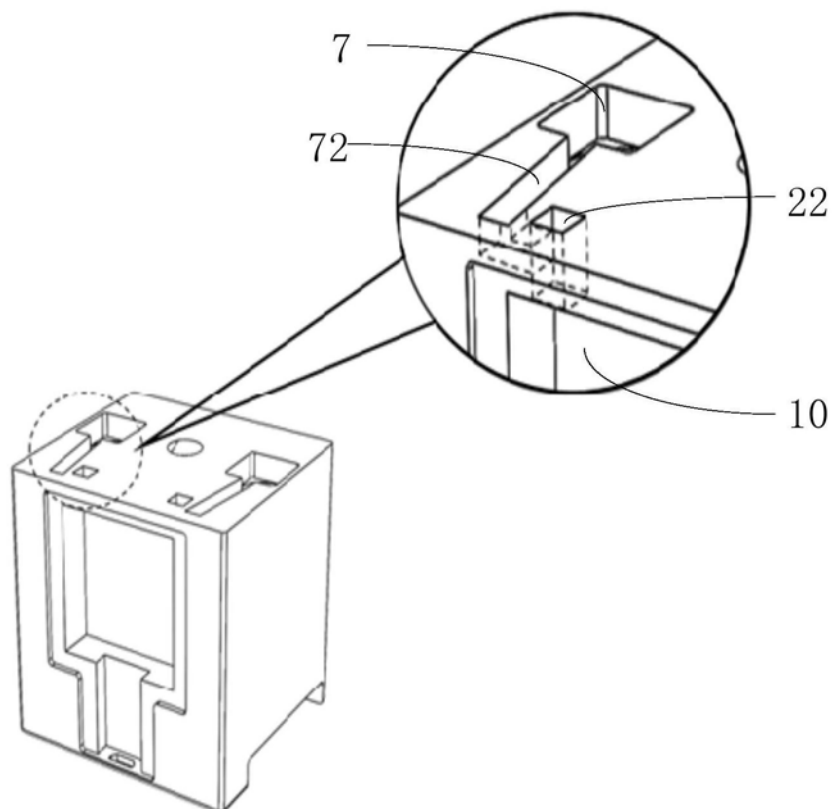


图8

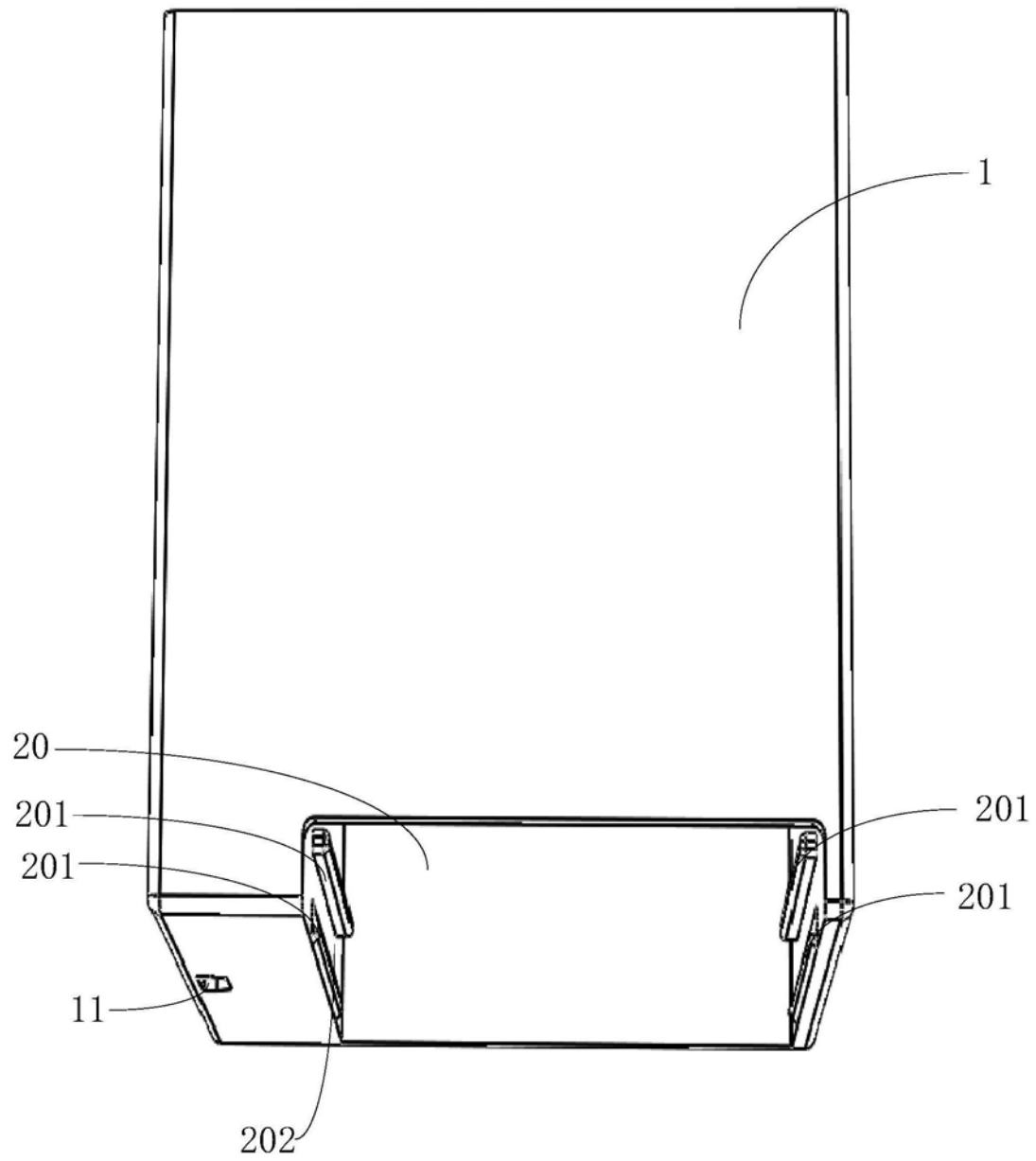


图9

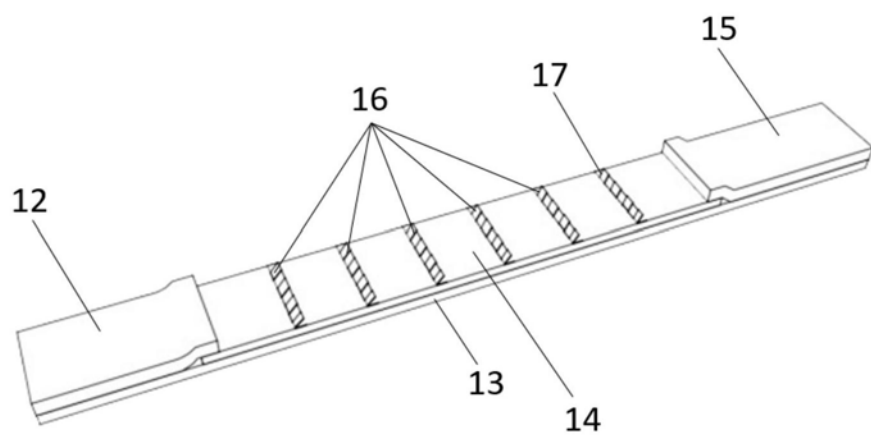


图10

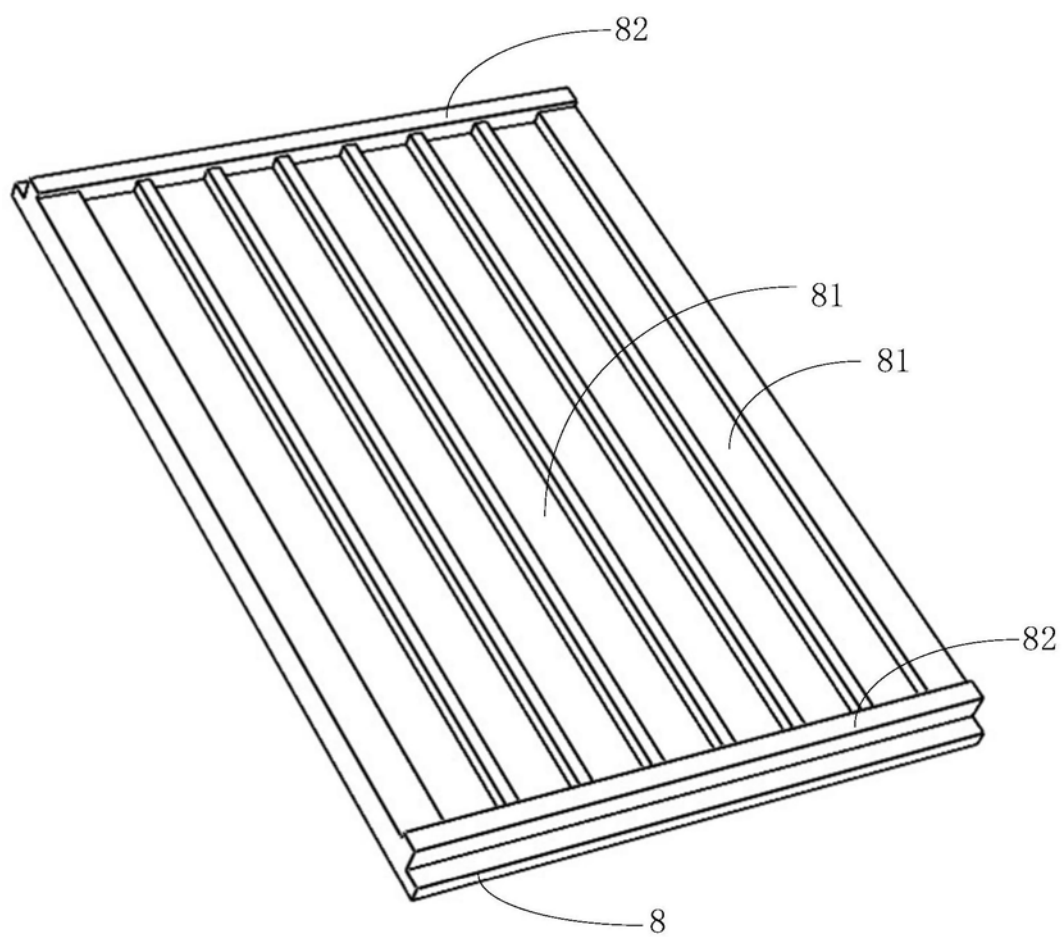


图11

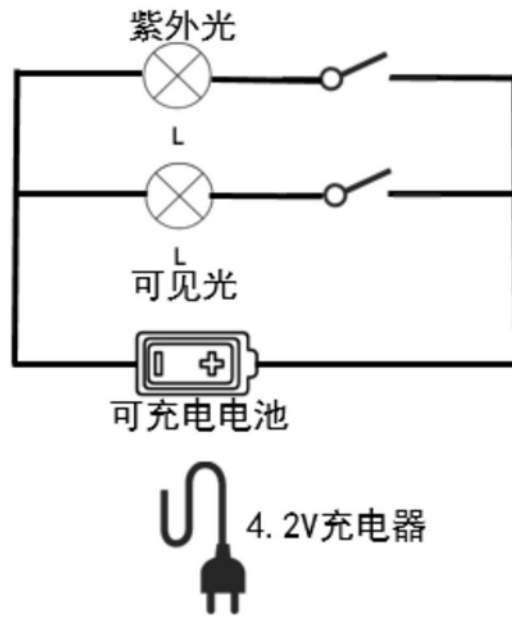


图12

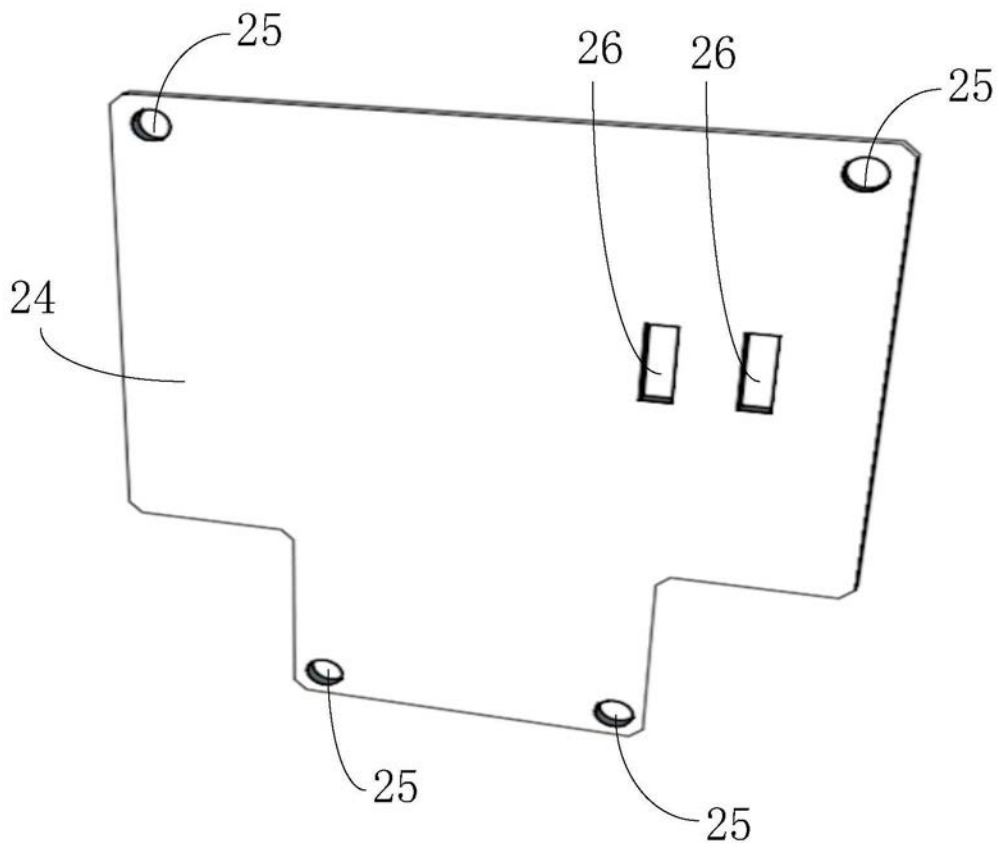


图13

专利名称(译)	基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析方法及系统		
公开(公告)号	CN111220801A	公开(公告)日	2020-06-02
申请号	CN2019111360053.3	申请日	2019-12-25
[标]申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
当前申请(专利权)人(译)	华南农业大学		
[标]发明人	李向梅 刘志威 李嘉豪 梁早清 杨慧玲 王成 赵平伟 梁文丽		
发明人	李向梅 刘志威 武晋孝 冯俊吾 李嘉豪 梁早清 杨慧玲 王成 赵平伟 梁文丽		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/53		
代理人(译)	周建军		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明提供一种基于智能手机的高通量多通道免疫层析分析方法及系统，该分析方法包括：获取免疫层析试纸条图像，提取待测图片检测区域的信号强度，对检测区域内各行的所有像素颜色值求平均值时，以第一个像素点作为“平均值”，从第二个像素点开始取，每取到一个像素点，则将这个像素点的值减去“平均值”，将所得的差除以当前所取的像素点的数量，再将该值加上“平均值”作为新的“平均值”，然后取下一个点，重复以上操作。当所有像素点都处理完后，最后的“平均值”即为该行所有像素颜色值的平均值。本发明可对检测通道上的多个试纸条同时进行检测，可实现多种小分子危害因子的多残留高通量分析，显著提高检测效率。

