



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105388283 A

(43) 申请公布日 2016. 03. 09

(21) 申请号 201510724215. 2

(22) 申请日 2015. 10. 29

(71) 申请人 清华大学深圳研究生院

地址 518055 广东省深圳市南山区西丽深圳
大学城清华园区

(72) 发明人 马岚 吴峰 岑瑜

(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 李志东

(51) Int. Cl.

G01N 33/558(2006. 01)

G01N 33/533(2006. 01)

权利要求书1页 说明书9页 附图2页

(54) 发明名称

免疫荧光色带定量检测系统及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种免疫层析荧光色带定量检测系统,其包括:输入模块,用于输入数据,包括图像采集装置和直接输入装置,可通过图像采集装置采集荧光色带图像,并通过直接输入装置来输入采集相关设置信息;输出模块,用于输出数据;存储模块,用于存储数据,其中包括机器可执行程序;处理模块,与输入模块、输出模块和存储模块相连,用于执行机器可执行程序,执行机器可执行程序包括完成以下:提取荧光色带图像的灰度值,利用灰度值确定光密度值,以及利用光密度值和预定关系确定被测物的浓度,预定关系为被测物的标准品与其荧光色带的光密度值的函数关系。利用该系统定量检测免疫层析物质,具有简单、快速、准确且灵敏度高等的优点。

1. 一种免疫荧光色带定量检测系统,其特征在于,包括:

输入模块,用于输入数据,包括图像采集装置和直接输入装置,可通过所述图像采集装置采集所述荧光色带图像,并通过所述直接输入装置来输入所述采集相关设置信息;

输出模块,用于输出数据;

存储模块,用于存储数据,其中包括机器可执行程序;

处理模块,与所述输入模块、所述输出模块和所述存储模块相连,用于执行所述机器可执行程序,执行所述机器可执行程序包括完成以下:提取所述荧光色带图像的灰度值,利用所述灰度值确定光密度值,以及利用所述光密度值和预定关系确定被测物的浓度,所述预定关系为被测物的标准品与其荧光色带的光密度值的函数关系。

2. 权利要求 1 的系统,其特征在于,所述图像采集装置为扫描装置。

3. 权利要求 1 的系统,其特征在于,所述图像采集装置包括激发光源、成像镜头、滤光片和传感器。

4. 权利要求 3 的系统,其特征在于,所述激发光源为紫外光源,较佳的为峰值波长为 $365 \pm 10\text{nm}$ 的紫外 LED 发光管,较佳的,所述紫外 LED 发光管环状排布于所述传感器的周围。

5. 权利要求 3 的系统,其特征在于,所述传感器为 CMOS 或 CCD 传感器。

6. 权利要求 1 的系统,其特征在于,所述直接输入装置为触摸屏,较佳的为 LCD 触摸屏。

7. 权利要求 1 的系统,其特征在于,所述输出模块包括显示器或触摸屏。

8. 权利要求 1 的系统,其特征在于,所述存储模块包括内置和 / 或外置存储模块,较佳的为 SD 卡存储模块。

9. 权利要求 1 的系统,其特征在于,所述系统还包括增补功能模块,所述增补功能模块包括可连接外设的并口、串口和 / 或 USB 接口。

10. 一种检测 PCT 浓度的方法,其特征在于,包括:

利用 PCT 试条对待测样本进行荧光免疫检测,获得检测结果,所述检测结果包含荧光色带;

利用权利要求 1-9 任一系统检测所述荧光色带,以确定所述待测样本中的 PCT 的浓度;

所述 PCT 试条包括第一包被膜和第二包被膜,所述第一包被膜的一端与所述第二包被膜的一端相连,所述第一包被膜中的至少一块区域包被有 PCT 荧光标记抗体,

所述第二包被膜包含分离的第一区域和第二区域,所述第一区域比所述第二区域靠近所述第一包被膜,

所述第一区域包被有 PCT 包被抗体,所述第二区域包被有抗 PCT 抗体,所述抗 PCT 体能够特异性结合所述 PCT 荧光标记抗体。

免疫荧光色带定量检测系统及其应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生化检测领域,具体地,本发明涉及免疫荧光色带定量检测系统及其应用。

背景技术

[0002] 现场检测是一类极具潜力的检测技术,因其具有快速、可靠、操作简便、价格低等优点,适合于大批量样品的快速现场筛查,现已广泛应用于临床诊断、食品安全检测、环境检测等领域。目前,最为成熟的现场快速诊断技术平台为免疫层析检测方法,已在早早孕检测上实现了全球普遍使用。但常规使用的胶体金、荧光染料等生物示踪物由于检测灵敏度低、荧光淬灭明显等不足,严重限制了免疫层析技术的发展。基于荧光微球纳米材料标记的免疫层析快速检测方法,可实现对靶标分子的超微量检测。有望突破目前技术瓶颈,大幅提升现场快速检测技术水平。

[0003] 为实现荧光免疫层析试纸条的快速定量测定,目前国内外主要采用的方法有光纤扫描法、线阵 CCD 扫描法和图像测量法。光纤扫描法由步进电机带动试纸条运动,使光纤传感器从试纸条的背景区向测试线扫描。由发光二极管发出的入射光照射在试纸条测试区上,激发荧光经由接收光纤传送到光电探测器转换成电信号输出,电信号大小与测试区激发荧光光强的大小相对应。该方法需要有机扫描装置带动光纤传感器扫描,造成仪器体积大而笨重;且对于较低浓度的情况,由于激发荧光光强度变化十分微弱,测量结果稳定性差。线阵 CCD 扫描法用冷阴极荧光灯和线阵 CCD 传感器取代了光纤扫描法中的发光二极管和光纤传感器,但仍保留了体积大且笨重的机械扫描装置。

[0004] 图像测量法通过光电图像传感器将试纸条的荧光显色信号转换为图像信号,再运用图像处理技术获取试纸条荧光显色线的反应特征量。图像测量法不需要步进电机,也不会受到试纸条反应时水分引起的动态干扰的影响,可用图像处理技术提升图像处理效果。但受限于现行的光路设计及线阵 CCD 图像传感器灰度分辨率低等因素,其对低浓度荧光色带的检出性差,不能良好区分相近的低浓度荧光条带等级。因此有必要采用良好的光路设计、高分辨率的图像传感器及高效的图像处理技术来提升图像测量法的精度及准确率。

发明内容

[0005] 本发明旨在至少在一定程度上解决上述技术问题之一或至少提供一种商业选择。

[0006] 依据本发明的一方面,本发明提供一种免疫层析荧光色带定量检测系统,如图 1 所示,该系统 1000 包括:输入模块 100,用于输入数据,包括图像采集装置 110 和直接输入装置 130,可通过所述图像采集装置 110 采集所述荧光色带的图像,并通过所述直接输入装置 130 来输入所述采集相关设置信息;输出模块 200,用于输出数据;存储模块 300,用于存储数据,其中包括机器可执行程序;处理模块 400,与所述输入模块 100、所述输出模块 200 和所述存储模块 300 相连,用于执行所述机器可执行程序,执行所述机器可执行程序包括完成以下:提取所述荧光色带图像的灰度值,利用所述灰度值确定光密度值,以及利用所述

光密度值和预定关系确定被测物的浓度,所述预定关系为被测物的标准品与其荧光色带的光密度值的函数关系。

[0007] 本发明的这一方面的系统具有采集图像的速度快、体积小、稳定性高和接口简单的特点,能够直接获取数字图像数据,用于准确、高灵敏度的定量样本中的目标被测物。能够用于实现对低浓度荧光色带的良好区分和定量测定。

[0008] 根据本发明的实施例,本发明的这一方面的系统还能够具有以下附加技术特征至少之一:

[0009] 所称的图像采集装置 110 为扫描装置或者为摄像装置。根据本发明的一个实施例,所称的图像采集装置 110 包括激发光源、成像镜头、滤光片和传感器。

[0010] 为保证测得的荧光信息的精确度,基于采用的荧光标记材料多为红色稀土纳米微球、量子点、上转换等荧光纳米材料,其激发光源多为紫外光源。因此,根据本发明的一个实施例,在激发光源的选择上,采用紫外光 LED 作为反射激发光源,相对于其他紫外光源,紫外光 LED 具有能耗低、发热少、效率高、工作波长与功率稳定等等优点。另外,紫外光 LED 的体积比较小巧,激发系统相对简单,便于搭建。

[0011] 为保证在固定的荧光试纸条反应区域产生强度均匀的照明场,根据本发明的一个较佳实施例,将紫外 LED 激发光源环状排布分布在图像传感器的周围。所称的紫外 LED 光源根据被测样品的荧光信息,选用峰值波长为 365nm 左右,例如为 $365 \pm 10\text{nm}$ 的紫外 LED 发光管。

[0012] 所称的传感器,即图像传感器可选择 CMOS 传感器或者 CCD 传感器。根据本发明的一个较佳实施例,选用 CMOS 传感器。CMOS 传感器具有高整合度、低成本、低功耗等特点,适合便携式荧光免疫试纸条定量检测仪的需求。CCD 传感器虽然在分辨率、灵敏度和噪声控制等方面优于 CMOS,但随着科学技术的不断进步,两者的差别将日益减小,同时对于数码图像简单的荧光试纸条而言,现有的 CMOS 传感器亦基本能满足其需求,因此综合来看 CMOS 传感器是性价比高的选择。通过其前面的成像镜头获取荧光色带的图像,通过直接输入装置调节 CMOS 图像传感器的关键成像参数,如曝光量、增益、白平衡、帧频、输出图像数据格式、图像时序信号极性、窗口大小及位置等,获得最佳的荧光色带图像并得到高检测灵敏度。

[0013] 根据本发明的一个实施例,所述直接输入装置 130 为触摸屏,较佳的为 LCD 触摸屏。该直接输入装置 130 可以用于图像采集相关参数的设置,例如调节图像传感器的成像参数,如曝光量、增益、白平衡、帧频、输出图像数据格式、图像时序信号极性、窗口大小及位置等。

[0014] 所述输出模块 200 包括显示器或触摸屏。根据本发明的一个实施例,该输出模块 200 是一个输入 / 输出模块,所称的直接输入装置 130 也属于输出模块 200,用以输出和 / 或显示图像采集、中间定量分析结果、最终检测结果等相关信息。

[0015] 所述存储模块 300 包括内置和 / 或外置存储模块。根据本发明的一个实施例,所称存储模块 300 与输入模块 100 相连,所称存储模块为 SD 卡存储模块。所称的存储模块 300 从传感器获取荧光色带图像后,可将其存储到存储器的相应位置,同时还支持 SD 卡存储,可以将样本图像存储到 SD 卡中,便于数据查询。

[0016] 根据本发明的一个实施例,所称的处理模块 400 执行机器可执行程序来提取图像的灰度值。该程序还包含预先利用 MATLAB 曲线拟合工具箱确定灰度值与目标待测物的浓

度的函数关系式。当再次测量时,输入一幅采集到的试纸图片就能够自动计算出灰度值,并且根据预先设定的函数关系得到相应的待检测的样本浓度。该处理模块 400 运行的该机器可执行程序具有强大的图像优化及定量分析功能,可对图像进行裁切、选择和翻转,可对图像进行放大或缩小,可对图像进行亮度和对比调节,具备降低噪声和锐化功能,可自动识别获取图像中的荧光条带并给出定量分析结果。

[0017] 具体的,根据本发明的一个较佳实施例,该机器可执行程序包含的函数关系是通过将待测物标准品的荧光色带图像的灰度值换算成光密度值,接着利用曲线拟合出光密度值与标准品的浓度的关系确定下来的。光密度指光线通过溶液或某一物质前的入射光强度 I_0 与该光线通过溶液或物质后的透射光强度 I_b 比值的对数 $OD = \log(I_0/I_b)$,是一个比值。这里图像分析中,入射光和透射光强度分别以两条荧光色带图像上的平均灰度值取代,定义该图像分析系统中的光密度值=检测荧光色带的平均灰度值/质控荧光色带的平均灰度值。光密度值越大,物体颜色越深,待测物相对含量越大。

[0018] 根据本发明的实施例,如图 2 所示,本发明的这一方面的系统 1000 还包括增补功能模块 500,所述增补功能模块 500 包括可连接外设的并口、串口和/或 USB 接口。外设包括鼠标、麦克风、扫描仪、相机等。

[0019] 根据本发明的另一方面,本发明提供一种检测降钙素原 (procalcitonin, PCT) 浓度的方法,该方法包括:利用 PCT 试条对待测样本进行荧光免疫检测,获得检测结果,所述检测结果包含荧光色带;利用上述一方面或者任一实施例中的系统检测所述荧光色带,以确定所述待测样本中的 PCT 的浓度;所述 PCT 试条包括第一包被膜和第二包被膜,所述第一包被膜的一端与所述第二包被膜的一端相连,所述第一包被膜中的至少一块区域包被有 PCT 荧光标记抗体,所述第二包被膜包含分离的第一区域和第二区域,所述第一区域比所述第二区域靠近所述第一包被膜,所述第一区域包被有 PCT 包被抗体,所述第二区域包被有抗 PCT 抗体,所述抗 PCT 体能够特异性结合所述 PCT 荧光标记抗体。利用 PCT 试条检测后,其上所称的第一区域和第二区域均为所称的荧光色带,这两荧光色带的平均灰度值的比值即得所称的光密度值。

[0020] 上述对本发明一方面或者任一实施例中的系统的技术特征和优点的描述,同样适用本发明这一方面的方法,在此不再赘述。本发明的这一方法利用上述带有反射 LED 紫外环状光源、高分辨率 CMOS 图像传感器等的数码图像采集装置等的免疫荧光定量检测系统,能够快速采集图像、能直接且稳定的获取数字图像数据。发明人基于对荧光试纸条色带数码图像分析处理的关键技术的研究,包括对试纸条图像预处理、图像分割和图像特征值提取的研究,而开发出了包含强大图像优化和定量分析功能的数码图像分析程序软件的定量检测系统。应用该系统对降钙素原 (PCT) 荧光试纸条结果进行处理、分析,结果表明:检测 PCT 的灵敏度达 0.05ng/mL,线性范围 0.05-100ng/mL;批内和批间 CV(变异系数)均小于 10%,实现了对 PCT 高灵敏、良好线性及重复性等定量测定的需求。

[0021] 根据本发明的实施例,对 PCT 试条中的第一包被膜中的包被有 PCT 荧光标记抗体的区域的大小不作限制,可以是整个第一包被膜,也可以是第一包被膜的一部分,在本发明的一个实施例中第一包被膜被称为样品垫。同样的,对第二包被膜中的分离的第一区域和第二区域各自的大小也不作特别限制,在本发明的一个实施例中,如图 3 所示,该 PCT 试条的第一包被膜和第二包被膜都是长方形的,第一包被膜的一条宽边和第二包被膜的一条宽

边相粘,第一包被膜中的包被有 PCT 荧光标记抗体的区域为长约 2cm、宽约 3mm 的长方形,第二包被膜中的第一区域和第二区域都为线状,第一区域被称为检测线(T 线,对应检测荧光色带),第二区域被称为质控线(C 线,对应质控荧光色带),两个区域所在的线状平面都平行于两包被膜的粘边,所说的线状第一或第二区域的宽度大约为 0.5-1mm、长为膜的宽。

[0022] 所称的 PCT 试条利用第一膜和第二膜分别包被有能特异性结合 PCT 的 PCT 荧光标记抗体和 PCT 包被抗体,加入 PCT 待测样品后利用膜层析,在第二膜上形成双抗体夹心复合物,即获得荧光色带,基于检测复合物中的荧光标记的荧光强度来判断样品中是否存在 PCT。该 PCT 试条能够明显的提高检测的特异性,缩短检测所需时间。通过荧光标记抗体,能够明显的提高检测灵敏度。

[0023] 根据本发明的一个实施例,所称 PCT 试条的第二包被膜的另一端连接有吸水垫。吸水垫可为强吸水物质,这样在检测液态样品时能够给予定向作用力使液态样品从第一包被膜定向层析至第二包被膜。

[0024] 根据本发明的一个实施例,所述第一包被膜、所述第二包被膜和所述吸水垫固定在同一固相基质上。固相基质主要为在使用本发明的这一试剂盒时有个承载,方便操作,固相基质的类型不作特别限定,可以为不会与待测样品发生反应或者不影响抗原抗体结合的惰性材料,比如纸板、塑料板等。

[0025] 根据本发明的一个实施例,所述第一包被膜为玻璃纤维素膜,所述第二包被膜为硝酸纤维素膜(NC 膜)。玻璃纤维膜呈化学惰性,不含粘合剂,采用 100% 硼硅酸玻璃纤维制造而成,其上包被有荧光标记的第一抗体,利于第一抗体与待测样品中的目标抗原发生特异性结合。而 NC 膜本身是已经添加了表面活性剂来改善亲水能力,而且已经存在有一定的缓冲系统,具有毛细纤维结构,能吸附比同等纤维素滤纸更多的水分,流速快,耐高温,利于其上包被的 PCT 包被抗体与前述的 PCT 荧光标记抗体-PCT 发生特异性结合反应,激发荧光。

[0026] 根据本发明的一个实施例,所述荧光标记为荧光微球标记,所述 PCT 荧光标记抗体是通过 PCT 抗体与所述荧光微球标记通过肽键共价结合来获得的。这样,提高标记物的稳定性,避免了抗体空间位阻的影响,有利于提高灵敏度和特异性。在本发明的一个实施例中,所述荧光微球直径在纳米级范围内,其直径范围为 10-500nm,较佳地为 20-300nm,其上负载有荧光物质,是受外界能量刺激能激发出荧光的固体微粒。所述荧光微球负载的荧光物质为掺杂荧光染料、稀土络合物、量子点等的转换荧光纳米材料。所述荧光微球负载的荧光物质通过高分子聚合物修饰有活性官能基团,所述活性官能基团为羧基,氨基,羟基,巯基。在本发明的一个实施例中,所述活性官能基团具体为羧基,所述 PCT 荧光标记抗体为将待标记的 PCT 抗体和羧基修饰的荧光微球以肽键共价结合形成的聚合物。

[0027] 根据本发明的一个实施例,所述 PCT 荧光标记抗体和所述 PCT 包被抗体为不同于的 PCT 抗体。这两种抗体都可以特异性结合抗原 PCT,而且较佳地,两种抗体能与抗原的不同表面决定簇特异性结合,这样利于抗原检测的准确进行。在本发明的一个实施例中,所述 PCT 荧光标记抗体和/或 PCT 包被抗体为 PCT 单克隆抗体和 PCT 多克隆抗体中的任一种。该 PCT 试条是基于对荧光标记、抗原和抗体特性的研究,通过选择适合的荧光标记与特异性的抗体进行定向共价化学偶联,获得荧光标记抗体分析,并通过优化双抗体夹心免疫反应的各种条件制备获得的。

[0028] 根据本发明的一个实施例,所述抗抗体为羊抗鼠 IgG 抗体,其能够与 PCT 荧光标记抗体特异性结合,即与多余的带荧光标记 PCT 抗体结合形成免疫复合物,激发荧光,得以能够获得荧光色带,以定性和 / 或定量检测该免疫复合物。

附图说明

[0029] 本发明的上述和 / 或附加的方面和优点从结合下面附图对实施方式的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0030] 图 1 是本发明的一个实施例中的免疫荧光色带检测系统的结构示意图。

[0031] 图 2 是本发明的一个实施例中的免疫荧光色带检测系统的结构示意图。

[0032] 图 3 是本发明的一个实施例中的检测 PCT 的免疫层析荧光试纸条的结构示意图。

[0033] 图 4 是本发明的一个实施例中的检测 PCT 的检测值与浓度标准曲线示意图。

具体实施方式

[0034] 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,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。需要说明的,本文中所使用的术语“第一”、“第二”等仅为方便描述,不能理解为指示或暗示相对重要性,也不能理解为之间有先后顺序关系。在本发明的描述中,除非另有说明,“多个”的含义是两个或两个以上。在本文中,除非另有明确的规定和限定,术语“相连”、“连接”等术语应做广义理解,例如,可以是固定连接,也可以是可拆卸连接,或一体地连接;可以是机械连接,也可以是电连接;可以是直接相连,也可以通过中间媒介间接相连,可以是两个元件内部的连通。

[0035] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。

[0036] 下述实施例中所用的材料、试剂等,如无特殊说明,均可从商业途径得到。

[0037] 实施例 1

[0038] (一) 荧光微球标记抗体的制备

[0039] 以平均直径为 110nm、羧基修饰的荧光微球(购自 Bangs Laboratories, Inc. 公司,产品目录号为 FC02F/10930),抗 PCT 单克隆抗体(购自云南大学单克隆抗体工程技术中心的编号为 P-03),按照下述方法制备荧光微球标记 PCT 标记抗体:

[0040] 取 15mg 的上述羧基修饰的荧光微球用 MES 缓冲液(0.1M、pH4.7)洗涤并离心后,用 1ml MES 缓冲液(0.1M、pH4.7)重悬,加入 1-乙基-(3-二甲基氨基丙基)碳二亚胺(EDC)至终浓度为 5mM、加入 NHS(N-羟基丁二酰亚胺)至终浓度为 10mM,室温避光,反应半小时得到活化后羧基修饰的荧光微球。

[0041] 用 50mM pH8.5 的硼砂缓冲液洗涤该活化后羧基修饰的荧光微球,取 0.37mg 上述待标记抗 PCT 抗体和 5mg 上述活化后羧基修饰的荧光微球混合到 50mM pH8.5 的硼砂缓冲液中充分混匀。室温避光下反应 2 小时,让抗体和荧光微球形成稳定的肽键共价结合得到荧光微球与抗 PCT 抗体的偶联物。反应结束后,加入终浓度为 1% (质量百分含量) 的 BSA 溶液对荧光微球与抗 PCT 抗体的偶联物上剩余活性羧基位点进行封闭,室温避光反应 0.5

小时。完成后,用 pH7.4 的 0.02M PBS 缓冲液洗涤、重悬得到 5mg/ml 荧光微球标记 PCT 抗体液体,4℃保存待用。

[0042] (二)PCT 免疫层析荧光试纸条的制备

[0043] 以 PCT 包被抗体,以羊抗鼠 IgG 抗体制备包被膜,具体方法如下:

[0044] 采用 pH7.4 的 0.02M PBS 缓冲液,将羊抗鼠 IgG 抗体(长沙博优生物科技有限公司,ABGAM-0500)配制为浓度 1mg/ml 溶液,将 PCT 包被抗体(购自云南大学单克隆抗体工程技术中心的编号为 P-01)的浓度配制为浓度 2mg/ml 溶液,选用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统将羊抗鼠 IgG 抗体喷至包被膜(硝酸纤维素膜)的质控线(C线)位置,将 PCT 包被抗体喷至检测线(T线)位置,于相对湿度为 10%以下的干燥车间进行抽湿 4 小时后干燥待用,得到具有检测线和质控线的包被膜。

[0045] 用上述膜处理缓冲液浸泡玻璃纤维纸半小时,浸泡的温度为 37℃,于同样的抽湿条件进行抽湿 4 小时后,用上述膜处理缓冲液稀释步骤(一)所得荧光微球标记 PCT 抗体液体至荧光微球标记抗 PCT 抗体含量为 0.05mg/ml 混合液后,采用 BioDot 的 XYZ3050 喷膜系统将其喷涂至上述处理过的玻璃纤维素膜上制备形成样品垫,于同样的抽湿条件进行干燥。在 10 万级洁净和干燥的车间中把上述干燥好的具有检测线和质控线的包被膜、上述样品垫、吸水垫、背板按图 2 所示进行搭配组装后,采用 BioDot 的 CM4000 裁切系统将贴好的纸板裁切为 4mm/ 条的宽度,装入检测用夹片待用。其结构示意图如图 2 所示。

[0046] 实施例 2

[0047] (一)免疫层析荧光色带定量测定系统的结构

[0048] 本发明提供一种免疫层析荧光色带定量检测系统,如图 1 所示,该系统 1000 包括:输入模块 100,用于输入数据,包括图像采集装置 110 和直接输入装置 130,可通过图像采集装置 110 采集所述荧光色带的图像,并通过直接输入装置 130 来输入所述采集相关设置信息;输出模块 200,用于输出数据;存储模块 300,用于存储数据,其中包括机器可执行程序;处理模块 400,与输入模块 100、输出模块 200 和存储模块 300 相连,用于执行机器可执行程序,执行所述机器可执行程序包括完成以下:提取荧光色带图像的灰度值,利用灰度值确定光密度值,以及利用光密度值和预定关系确定被测物的浓度,预定关系为被测物的标准品与其荧光色带的光密度值的函数关系。

[0049] 的图像采集装置 110 包括激发光源、成像镜头、滤光片和传感器。

[0050] 为保证测得的荧光信息的精确度,基于采用的荧光标记材料多为红色稀土纳米微球、量子点、上转换等荧光纳米材料,其激发光源多为紫外光源。因此,在激发光源的选择上,采用紫外光 LED 作为反射激发光源,相对于其他紫外光源,紫外光 LED 具有能耗低、发热少、效率高、工作波长与功率稳定等等优点。另外,紫外光 LED 的体积比较小巧,激发系统相对简单,便于搭建。

[0051] 为保证在固定的荧光试纸条反应区域产生强度均匀的照明场,将紫外 LED 激发光源环状排布分布在图像传感器的周围。所称的紫外 LED 光源根据被测样品的荧光信息,选用峰值波长为 365nm 左右,例如为 365±10nm 的紫外 LED 发光管。

[0052] 所称的传感器,即图像传感器选用 CMOS 传感器。CMOS 传感器具有高整合度、低成本、低功耗等特点,适合便携式荧光免疫试纸条定量检测仪的需求。CCD 传感器虽然在分辨率、灵敏度和噪声控制等方面优于 CMOS,但随着科学技术的不断进步,两者的差别将日益减

小,同时对于数码图像简单的荧光试纸条而言,现有的 CMOS 传感器亦基本能满足其需求,因此综合来看 CMOS 传感器是性价比高的选择。通过其前面的成像镜头获取荧光色带的图像,通过直接输入装置调节 CMOS 图像传感器的关键成像参数,如曝光量、增益、白平衡、帧频、输出图像数据格式、图像时序信号极性、窗口大小及位置等,获得最佳的荧光色带图像并得到高检测灵敏度。

[0053] 直接输入装置 130 为触摸屏,较佳的为 LCD 触摸屏。直接输入装置 130 可以用于图像采集相关参数的设置,例如调节图像传感器的成像参数,如曝光量、增益、白平衡、帧频、输出图像数据格式、图像时序信号极性、窗口大小及位置等。

[0054] 输出模块 200 包括显示器或触摸屏。输出模块 200 是一个输入 / 输出模块,上述直接输入装置 130 也属于输出模块 200,用以输出和 / 或显示图像采集、中间定量分析结果、最终检测结果等相关信息。

[0055] 存储模块 300 包括内置和 / 或外置存储模块。存储模块 300 与输入模块 100 相连,存储模块为 SD 卡存储模块。的存储模块 300 从传感器获取荧光色带图像后,可将其存储到存储器的相应位置,同时还支持 SD 卡存贮,可以将样本图像存储到 SD 卡中,便于数据查询。

[0056] 处理模块 400 执行机器可执行程序来提取图像的灰度值。该程序还包含预先利用 MATLAB 曲线拟合工具箱确定灰度值与目标待测物的浓度的函数关系式。当再次测量时,输入一幅采集到的试纸图片就能够自动计算出灰度值,并且根据预先设定的函数关系得到相应的待检测的样本浓度。该处理模块 400 运行的该机器可执行程序具有强大的图像优化及定量分析功能,可对图像进行裁切、选择和翻转,可对图像进行放大或缩小,可对图像进行亮度和对比调节,具备降低噪声和锐化功能,可自动识别获取图像中的荧光条带并给出定量分析结果。

[0057] 具体的,该机器可执行程序包含的函数关系是通过将待测物标准品的荧光色带图像的灰度值换算成光密度值,接着利用曲线拟合出光密度值与标准品的浓度的关系确定下来的。光密度指光线通过溶液或某一物质前的入射光强度 I_0 与该光线通过溶液或物质后的透射光强度 I_b 比值的对数 $OD = \log(I_0/I_b)$,是一个比值。这里图像分析中,定义该图像分析系统中的光密度值 = 检测荧光色带的平均灰度值 / 质控荧光色带的平均灰度值。光密度值越大,物体颜色越深,待测物相对含量越大。

[0058] (二) 定量测定系统的工作流程

[0059] 该定量测定系统的一般工作流程为:将加样反应后的待测荧光试纸条放置于试纸条架的试纸条槽内并推送至检测系统内,直接输入模块 130 向图像采集模块 110 发出指令,开启 LED 紫外激发光源照射试纸条,试纸条 T 线和 C 线处的荧光微球经紫外光照射激发出特征波长反射荧光,其反射光路经准直镜和窄带滤光片处理后被 CMOS 图像传感器接收,CMOS 图像传感器将光信号进行光电及模 / 数转换后,将转换后的数字信号传输给存储模块 300 进行存储,传输给数据处理模块 400 进行数据处理,数据处理模块 400 自动对试纸条 T 线和 C 线传输来的特征频率荧光的光密度值进行识别,获得各被检物的光密度值,进而依据检测物(T线上的荧光复合物)的光密度和质控物(C线上的荧光复合物)的光密度值的比值进行相应换算得到被检物浓度。

[0060] 实施例 3

[0061] (一) PCT 检测标准曲线绘制及灵敏度和线性范围检测

[0062] 以 PCT 标准品作为待测样品来测定实施例 1 的 PCT 试纸条的灵敏度。

[0063] 将 PCT 标准品配制为系列浓度 (0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、5、10、50、100ng/mL)，加入由实施例 1 得到的 PCT 试纸条的加样孔中，并采用本发明所述的定量测定装置检测荧光强度。检测步骤：检测前先将待检测样品恢复室温 (25℃)，用精确移液器取待检测样品 60 μl 垂直缓慢滴入实施例 1 得到的 PCT 试纸条的加样孔，10 分钟后用荧光定量测定装置进行测试。

[0064] 其检测结果如下表 1 所示。从检测结果中可以得出实施例 1 的检测 PCT 的灵敏度为 0.05ng/mL，线性范围 0.05-100ng/mL。

[0065] PCT 试纸条检测值与浓度曲线图如图 4 所示。

[0066] 表 1、PCT 不同样品浓度的试纸条检测值

[0067]

PCT (ng/mL)	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100
检测值	0.002	0.004	0.064	0.089	0.132	0.311	0.690	1.201	3.736	4.590
T/C	9	3	3	9	6	6	6	4	5	5

[0068] (二) PCT 血清样本检测

[0069] 用实施例 1 得到的 PCT 试纸条检测正常人血清样本和细菌感染人血清样本共 320 份，与 VIDAS BRAHMS PCT 测定试剂盒 (bioMerieux SA) 检测结果进行比较，线性回归： $y = 0.8387x + 0.1321$ ， $R^2 = 0.9638$ 。阈值为 0.5ng/mL 时，两种方法的符合率为 97.2% (311/320)，如表 2 所示。

[0070] 表 2、PCT 血清样本两种方法检测对比

[0071]

PCT 免疫层析荧光试纸条	VIDAS BRAHMS PCT 试剂盒		
	<0.5ng/mL	≥0.5ng/mL	共计
<0.5ng/mL	135	5	140
≥0.5ng/mL	4	176	180
共计	139	181	320

[0072] (三) 系统精密性检测

[0073] 将 PCT 标准浓度测试卡 (0.1、1、100ng/mL)，用定量测定系统检测荧光强度。每个浓度测试卡测试 20 次，根据测试结果计算平均偏差 CV 值，结果如表 3 所示。

[0074] 表 3、精密性检测结果

[0075]

批内			批间		
浓度	次数	T/C CV (%)	浓度	次数	T/C CV (%)
0.1	20	0.79	0.1	20	1.07
1	20	0.23	1	20	0.31
100	20	0.14	100	20	0.21

[0076] 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”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一定指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何的一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。

[0077] 尽管已经示出和描述了本发明的实施例,本领域的普通技术人员可以理解:在不脱离本发明的原理和宗旨的情况下可以对这些实施例进行多种变化、修改、替换和变型,本发明的范围由权利要求及其等同物限定。

1000

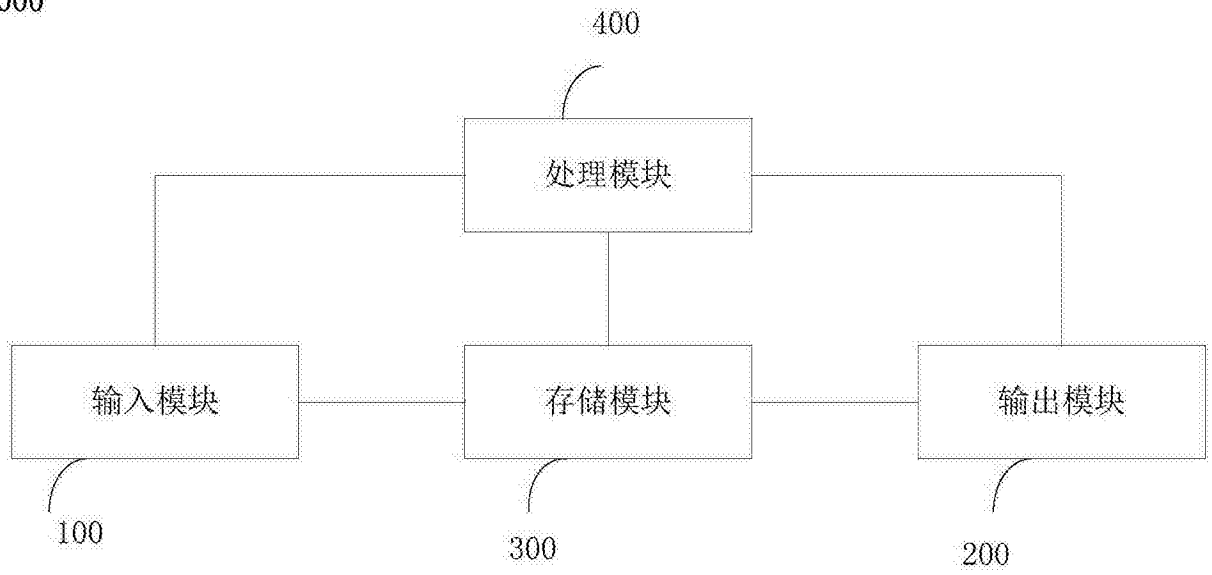


图 1

1000

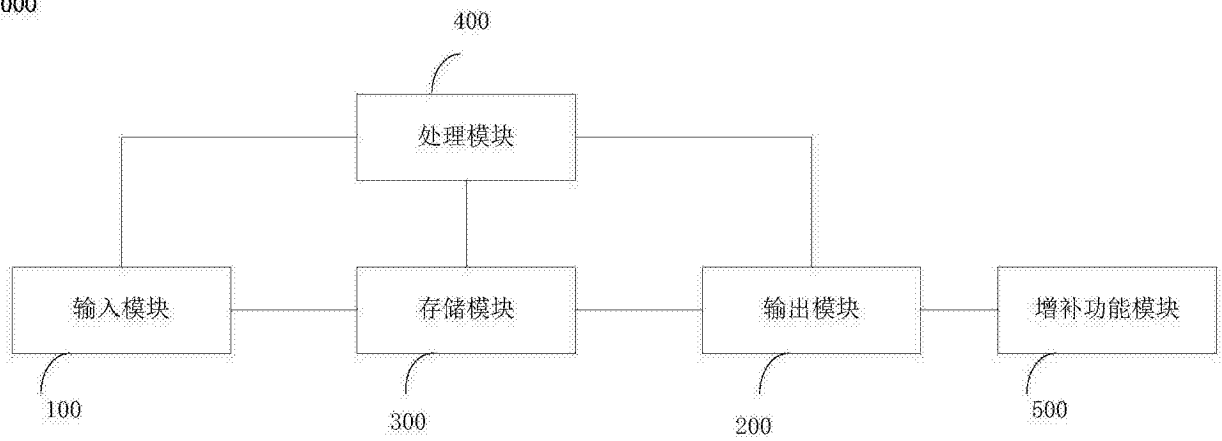


图 2

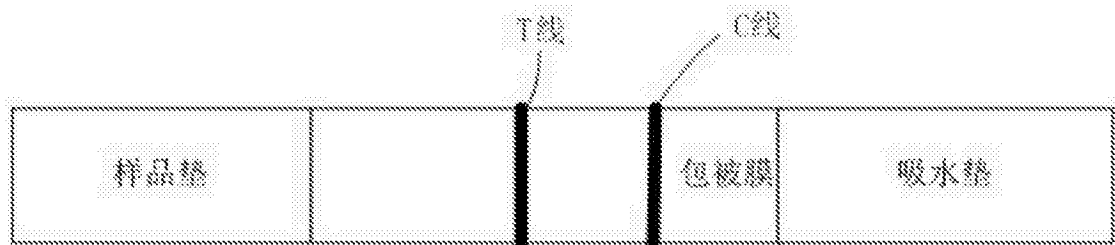


图 3

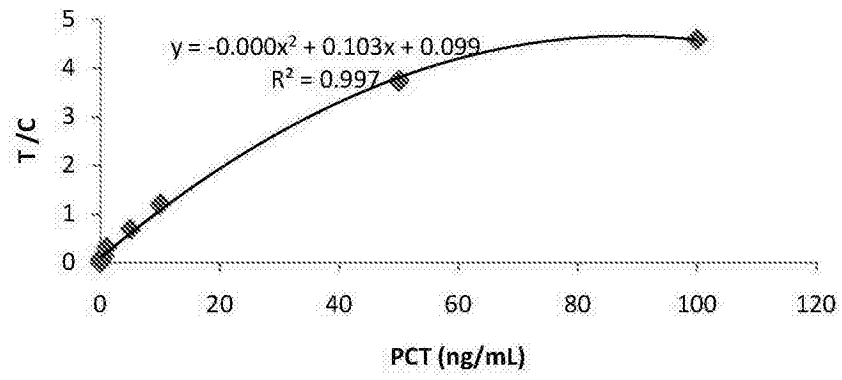


图 4

专利名称(译)	免疫荧光色带定量检测系统及其应用		
公开(公告)号	CN105388283A	公开(公告)日	2016-03-09
申请号	CN201510724215.2	申请日	2015-10-29
[标]申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
当前申请(专利权)人(译)	清华大学深圳研究生院		
[标]发明人	马岚 吴峰 岑瑜		
发明人	马岚 吴峰 岑瑜		
IPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
CPC分类号	G01N33/558 G01N33/533		
代理人(译)	李志东		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种免疫层析荧光色带定量检测系统，其包括：输入模块，用于输入数据，包括图像采集装置和直接输入装置，可通过图像采集装置采集荧光色带图像，并通过直接输入装置来输入采集相关设置信息；输出模块，用于输出数据；存储模块，用于存储数据，其中包括机器可执行程序；处理模块，与输入模块、输出模块和存储模块相连，用于执行机器可执行程序，执行机器可执行程序包括完成以下：提取荧光色带图像的灰度值，利用灰度值确定光密度值，以及利用光密度值和预定关系确定被测物的浓度，预定关系为被测物的标准品与其荧光色带的光密度值的函数关系。利用该系统定量检测免疫层析物质，具有简单、快速、准确且灵敏度高等的优点。

PCT (ng/mL)	0	0.01	0.05	0.1	0.5	1	5	10	50	100
检测值	0.002	0.004	0.064	0.089	0.132	0.311	0.690	1.201	3.736	4.590
TC	9	3	3	9	6	6	6	4	5	5