

用于数字等温扩增系统的荧光图像分析技术

徐静¹, 汪磊², 赵俊², 花昌义², 朱灵², 王明龙², 周正仙¹

1. 中国科学院合肥物质科学研究院应用技术研究/安徽省生物医学光学仪器工程技术研究中心/安徽省医用光学诊疗技术与装备工程实验室, 安徽 合肥 230031; 2. 安徽师范大学物理与电子信息学院, 安徽 芜湖 241002

【摘要】基于微流控芯片的数字等温扩增技术作为一种新型分子检测技术,可以通过对采集到的荧光图像进行特定的图像处理,以实现对待测目标的绝对定量分析。本研究利用本课题组研制的数字微流控芯片所采集到的荧光图像为分析对象,并结合实际应用环境,开发出配套的软件分析系统。该系统中的荧光图像处理分析部分具备图像拼接、图像倾斜校正、目标区域的截取、图像分割以及荧光亮点计数等功能。该系统能很好地满足核酸分子数检测的需求,并具有良好的人机交互性能。结果表明该系统的分析结果与 Image J 图像处理软件的统计结果不仅具有一致性,而且能够对检测到的结果实现自动化的计算分析,这为该款软件分析系统的广泛应用奠定了坚实的基础。

【关键词】数字等温扩增技术; 荧光图像; 微流控芯片; Image J 图像处理软件

【中图分类号】R318; TP311.1

【文献标志码】A

【文章编号】1005-202X(2020)10-1255-07

Fluorescence image analysis technique for digital isothermal amplification system

XU Jing¹, WANG Lei², ZHAO Jun², HUA Changyi², ZHU Ling², WANG Minglong², ZHOU Zhengxian¹

1. Institute of Applied Technology, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences/Anhui Provincial Engineering Technology Research Center for Biomedical Optical Instrument/Anhui Provincial Engineering Laboratory for Medical Optical Diagnosis and Treatment Technology and Instrument, Hefei 230031, China; 2. School of Physics and Electronic Information, Anhui Normal University, Wuhu 241002, China

Abstract: The digital isothermal amplification technology based on microfluidic chips, as a new molecular detection technology, can be used to specifically process the collected fluorescence image, thereby achieving the absolute quantitative analysis on the target to be tested. A supporting software analysis system is developed with the fluorescence images collected by the self-developed digital microfluidic chips as the analysis object and based on the consideration of the actual application scenario. The fluorescence image processing part of the developed system has such functions as image splicing, image tilt correction, intercept of target area, image segmentation and fluorescence spot counting. This analysis system can satisfy the requirement of nucleic acid molecular number detection and has good human-machine interaction performance. The analysis results obtained by the system are consistent with the statistical results of Image J image processing software, and moreover the proposed system can achieve an automatic calculation and analysis of the detected results, which lays a solid foundation for the wider application of the analysis system in the future.

Keywords: digital isothermal amplification technology; fluorescence image; microfluidic chip; Image J image processing software

前言

数字等温扩增技术作为一种新型分子检测技

术,相比需要连续变温的精确温度控制的传统聚合酶链式反应(Polymerase Chain Reaction, PCR)技术,准确性更强,行业认可度更高,可以在恒定温度下实现基因的“绝对定量”分析,同时可实现检测装置的小型化、便携化,在健康筛查、临床医学、检验医学、分子生物学、基因组学及食品安全等相关的各个领域都有着广阔的应用前景^[1]。

数字微流控芯片荧光检测装置的核心环节是通过采集到的荧光图像得出数字PCR的反应结果,所以荧光图像的分析结果准确与否就显得尤为重

【收稿日期】2020-03-02

【基金项目】安徽省重大科技专项(17030801007)

【作者简介】徐静,硕士研究生,研究方向:生物分析仪器系统与软件开发, E-mail: xu951130@foxmail.com

【通信作者】周正仙,副教授,研究方向:光电检测技术研究及产品开发、信号处理技术研究及应用, E-mail: earthzzx@mail.ahnu.edu.cn

要^[2-4]。不断发展的这些荧光图像处理方法的最终目的都是为了得到去除噪声、还原图像细节的荧光图像,从而为下一步精确的生物结果分析奠定基础。其中处理的关键步骤是图像拼接和图像分割这两大部分。2018年,由周淑芳等^[5]提出的拼接方法需要人为确定荧光图像3个顶角处的微反应室的中心位置,该方法存在一定程度上的不精确,同时也不满足方便快捷的宗旨。传统的局部阈值和全局阈值法对于有噪声、光照不均、阴影等现象的图像难以取得令人满意的分割效果。2013年,Helmy等^[6]提出利用局部阈值分割对cDNA微阵列图像进行分割的方法,对于有上述问题的图像,该方法极易将图像中的噪声识别为目标。

本研究基于数字等温扩增技术采集到的荧光图像,运用C++语言开发荧光图像检测分析系统。首先对采集到的荧光图像进行拼接处理,然后对图像进行倾斜校正和目标区域的截取,并对其进行滤波和二值化等去噪处理,最后进行芯片的阳性分子数(荧光亮点)的统计计数。该方法为数字PCR等温扩增反应提供了精确的分析结果,实现了数字等温扩增的快速检测分析。

1 数字等温扩增系统结构

本研究自主研发的整套数字等温扩增系统是由多个子系统模块构成,主要的模块为由电子多圈式编码器、步进电机以及单维移动平台组成的三维高精度位移平台,由半导体制冷片、热沉、散热器组成的温控模块以及由大功率LED模组和超高分辨率的科研级数字相机组成的荧光检测模块(图1)。通过对每个子系统的分别设计和最后的集成调试来保证整套系统的性能稳定和准确的检测结果。

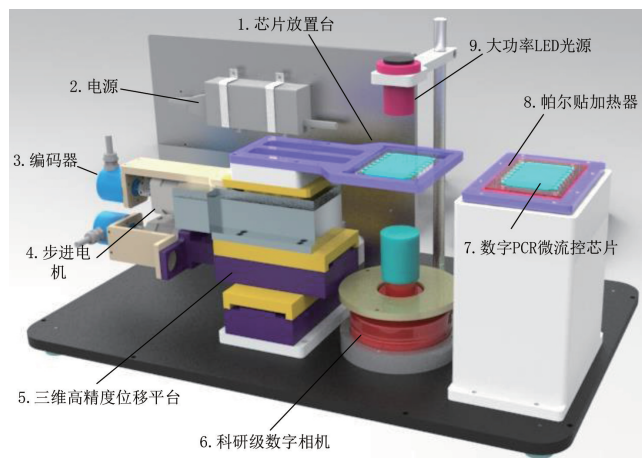


图1 数字等温扩增系统结构图

Fig.1 Structure of digital isothermal amplification system

2 数字PCR芯片荧光图像处理方法

本研究开发的数字PCR芯片荧光图像处理的主要过程如下:首先对获取的图像进行处理,包括基于快速特征点提取和描述(Oriented Fast and Rotated Brief, ORB)算法的图像快速拼接、旋转校正、目标区域(反应通道)截取;随后进行荧光图像的预处理,包括图像滤波、通过滑块调节整张图片和选中需要单独调节的局部区域的分割阈值,并对图像进行二值化操作,以达到荧光图像最佳的分割效果,为后续的操作做铺垫;最后进行荧光图像中阳性分子数的计数,通过提取绘制二值化图像中的荧光点轮廓,计算所绘制轮廓的周长,并据此筛选出并剔除在通道中和芯片表面上的大小形状不一的荧光污染点,从而实现荧光亮点(阳性分子数)的精确计数。

2.1 荧光图像目标区域的获取

2.1.1 拼接过程 由于芯片单通道长度为3.5 cm,相机在保证所拍摄芯片微腔清晰的情况下单次拍摄最大视场长度为1.6 cm,所以需要分次拍摄并对局部荧光图像进行拼接,还原成完整的荧光图像。通过上位机控制高精度位移平台,并使用相机进行3次成像,获得芯片左、中、右这3幅局部图像,且这3幅图像满足交叠区域有足够的重叠区域的同时保证分别包含芯片的边界,并通过OpenCV环境中的ORB算法提取图像中的特征点计算描述符^[7]。ORB算法结合和改进了FAST特征点检测和BRIEF特征描述子,在计算速度上,相比同类型的SIFT、SURF特征提取算法分别快100倍和10倍^[8]。ORB算法原理和具体处理步骤如下:

(1)采取FAST特征点算法检测所构造的图像金字塔中每层的特征点,解决原算法中不具备尺度不变性的问题,然后采用harris角点响应函数计算响应值并排序选取前 N 个特征点。

(2)利用与直方图算法和MAX算法相比具有更好的恢复主方向性能的灰度质心法进行简单有效的角点方向检测,该法假设焦点的灰度和质心之间存在偏移。

以关键点和取点区域建立二维坐标系,计算每个点的质量 m_{pq} 即等于其对应的像素值(s, t 为所取点的下标值; x, y 为该点在所建立的二维坐标系中的坐标值),利用积分求出关键点的质心 C 。

图像的 $(s+t)$ 定义矩的计算式如下:

$$m_{st} = \sum_{x, y} x^s y^t I(x, y) \quad (1)$$

得到图像的质心 C 为:

$$C = (\frac{m_{10}}{m_{00}}, \frac{m_{01}}{m_{00}})$$

(2)

特征点方向,即从角点中心到质心的向量为:

$$\theta = \arctan (m_{01}, m_{10})$$

(3)

(3)采用 BRIEF 算法将获取的特征点描述成一组二进制的比特字符串描述符,然后将特征点的 patch 旋转到计算的主方向上,以解决原 BRIEF 算法不具备旋转不变性的缺陷。

该方法相比于其他图像拼接方法鲁棒性更好,能够较好地适应图像的尺寸、平移、旋转以及光照的变化,而其中所提取的特征点作为最基本的特征,其计算过程简单,且能保持影像的灰度不受损坏。该方法解决了受制于相机性能的难题,有效地实现了万级高密度芯片全景荧光图像检测。具体的局部图像拼接步骤如图2所示,图3则展示了局部荧光图像按照此算法步骤在本软件中运行拼接操作的效果图。

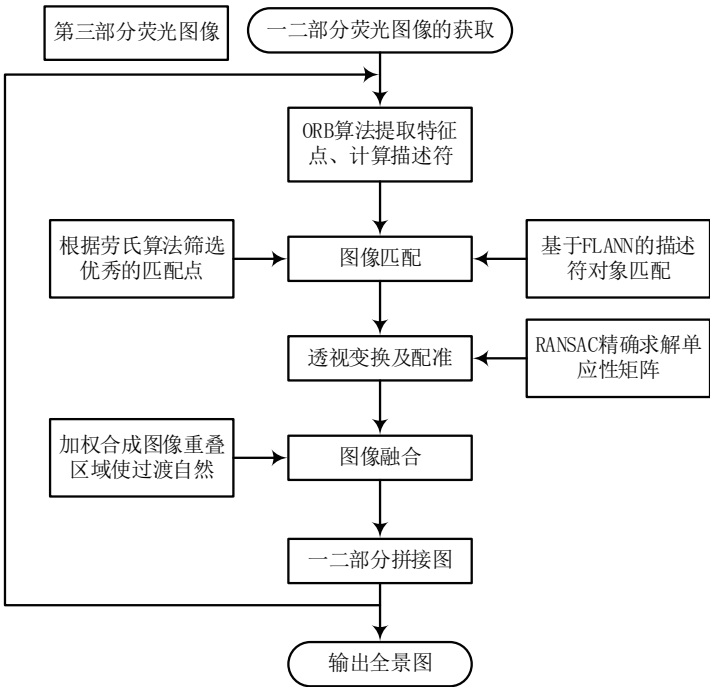


图2 荧光图像拼接流程图
Fig.2 Flowchart of fluorescent image splicing

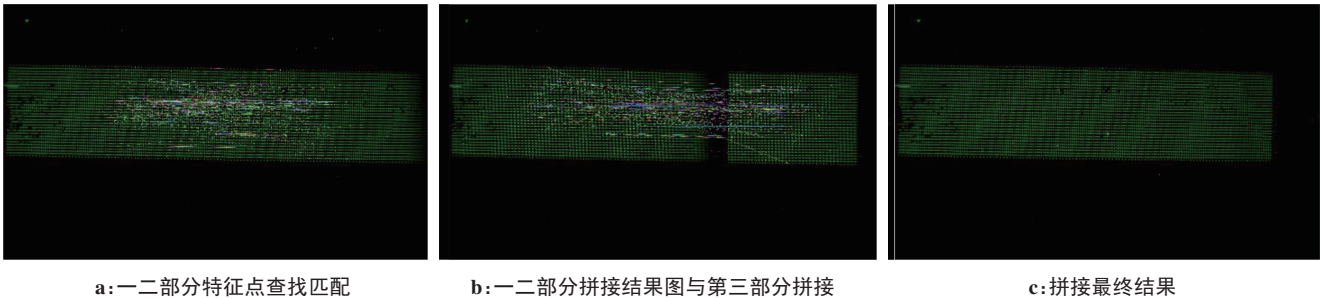


图3 三部分荧光图像拼接过程
Fig.3 Three-part fluorescence image splicing process

2.1.2 荧光图像的旋转和目标区域的截取 芯片在拍摄过程中可能由于一些人 为因素致使拍摄荧光图像倾斜,这样就无法截取到完整的待处理分析的目标区域,故需要对图像进行倾斜角度校正^[9-12]。本研究首先计算图像旋转任意角度后的图像大小、坐标系变换之后点的坐标以及图像二维的旋转矩阵,再利用 OpenCV 中的 衍射变换 warpAffine (src, dst, map_matrix,flag,fillval)对原图重映射,以实现荧光图

像任意角度旋转校正的目的。

为提高后续的荧光点计数的精度,应尽可能减小待处理的目标区域,将待分析处理荧光反应微腔区域截选出来。通过获取 OpenCV 中的鼠标点击事件,编写相应的回调函数,以实现通过点击鼠标拖动出现矩形框来辅助完成目标区域的截取。获取一个通道的整个反应微腔之后,对该部分进行荧光点计数,如图 4 所示。

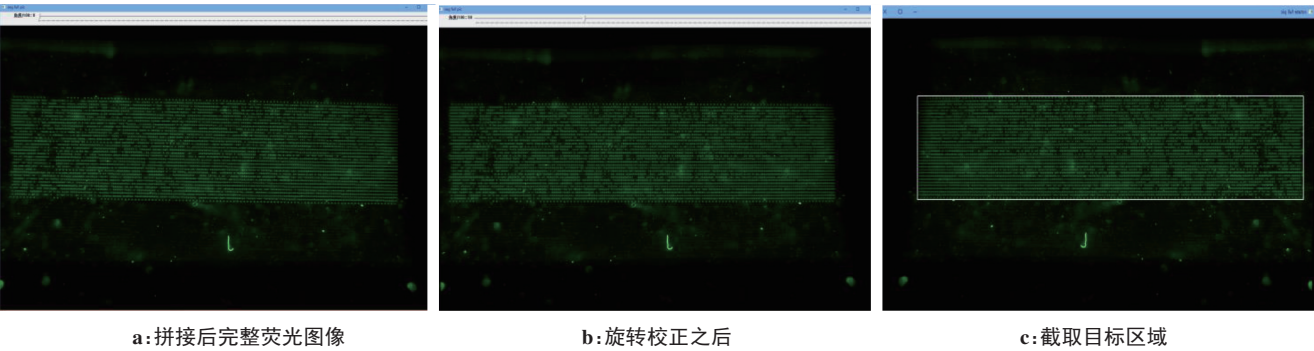


图 4 荧光图像旋转校正和截取

Fig.4 Fluorescence image tilt correction and intercept of target area

2.2 荧光图像预处理

由于数字 PCR 微流控芯片的特殊性,在往芯片中注入样本和试剂的过程中,芯片表面以及通道内部往往会有一定的荧光物质的残留,从而造成污染,并且芯片在成像前和成像过程中免不了会有杂光等干扰,这会导致所拍摄的荧光图像出现大小不一的噪点。可以通过滤波处理来减弱这些干扰,从而增强荧光亮点。针对本课题组研制的芯片所拍摄的荧光图像,经过反复的实验,最终选用效果最好的中值滤波^[13]和高斯滤波^[14]来进行滤波处理。

为了排除微反应腔室之外的杂质点以及背景光

等的干扰,需要对荧光图像进行二值化处理。日本学者大津提出了一种自适应的阈值确定最大类间方差法,又称大津法^[15]。但是针对荧光图像的特点,由于相机和光照等原因会导致图像灰度值分布不均匀,大津法计算的分割阈值并不能很好地分割背景和荧光亮点,所以本研究采取在图像窗口上附上滑块实时调节分割阈值的方法,并对局部灰度值不均匀的区域采用鼠标点击绘制矩形框的方式选中需要单独处理的区域进行单独设置分割阈值,以达到良好的二值化分割效果。具体处理过程如图 5 所示。

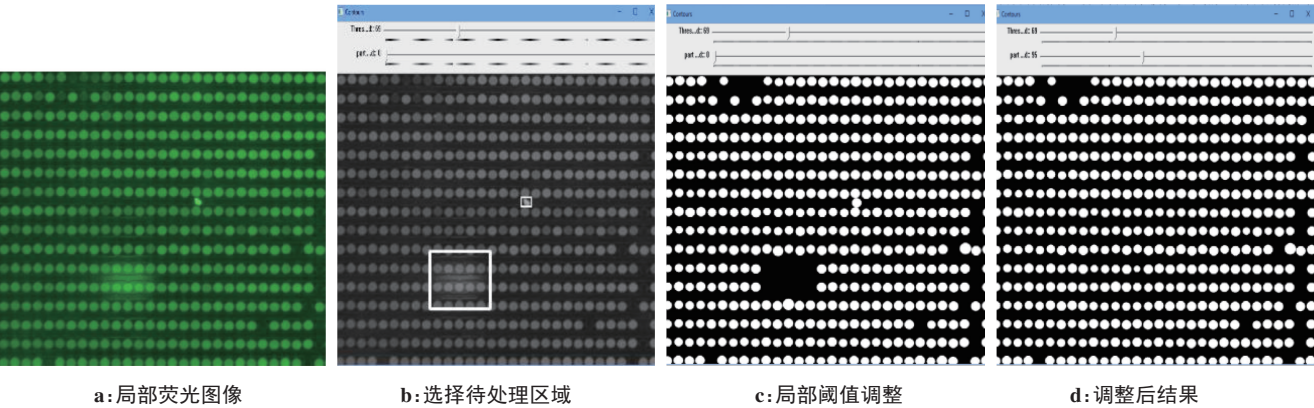


图 5 全局及局部阈值结合法分割图片

Fig.5 Image segmentation by the combination of global and local thresholds

2.3 芯片阳性分子数计数

芯片上阳性微反应腔区室在荧光标记物标记下形成荧光亮点,需要对这些荧光亮点进行检测统计^[16-18]。在 OpenCV 中结合 Suzuki 等^[19]提出的轮廓检测算法检测亮点的外层轮廓,核心方法是找到一个边界,用一个唯一的数字去标记,最后标记值相同的像素点属于同一个边界,不同边界之间的层次关系通过其标记值保存下来。利用该算法检测到的轮廓数量即是荧光亮点数量。

但是实际情况下的芯片拍摄的荧光图像即使在上述步骤处理完成之后还是难免会有荧光污染和通道之间的连结等影响计数的精确度,故本研究提出一种利用 OpenCV 中的 arcLength(InputArray curve, bool closed)计算提取的轮廓周长,并设置双阈值筛选滑块设置符合要求的最大和最小的周长值,将不满足所设置周长区间的形状大小不一的噪点从统计的荧光亮点数中剔除,从而大大提高荧光亮点计数的精度。

3 实验结果与验证分析

本实验采用的是自主研发的自吸式数字等温扩增微流控芯片,芯片采用多层结构设计,分别是PDMS加固层、PDMS防吸附层、玻璃底层。该芯片分为两个区:实验组区和阴性对照组区。单块芯片共计4万余个微反应腔,每个微反应腔的体积约为0.5 nL,芯片实物图如图6所示。

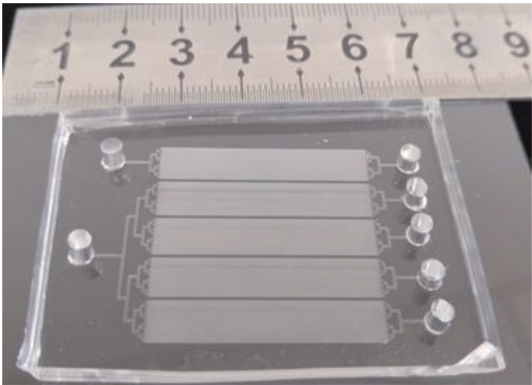


图6 数字等温扩增微流控芯片
Fig.6 Digital isothermal amplification microfluidic chip

针对所研发的数字微流控芯片及其应用背景开发的软件操作界面主要由图像显示区域、结果显示和参数显示构成,本实验使用本课题组所设计的芯片拍摄的荧光图像作为初始图像进行图像拼接、图像倾斜校正等一系列的图像处理步骤,最终得到的实验结果如图7所示。

为了验证该自主开发的荧光图像分析系统的有效性和准确性,利用本课题组自主研制的自吸式数字等温扩增微流控芯片对人体尿液中循环游离的miR-21分子进行扩增,通过自主开发的荧光图像分析软件对miR-21的基因绝对拷贝数进行计算分析,同时利用Image J图像处理软件统计荧光亮点作为参

考,进行对比研究分析。实验的理想情况是一个反应腔最多有一个目标分子,然后通过统计荧光亮点计算得出待测样品的浓度。但是,由于加样的过程中靶分子分散至每一个反应微腔是一种随机分配的过程,所以无法实现上述的理想情况,特别是当待测样本溶液体积较大时,往往一个阳性反应微腔中可能包含两个及以上的目标分子,这一现象恰好符合泊松分布规律^[20-21],所以本研究在自主开发的分析软件中使用泊松分布这一概念来校正出靶分子的浓度。计算公式如下:

$$P(k, \lambda) = \frac{\lambda^k}{k!} e^{-\lambda}$$
(4)

其中, k 表示每个反应小室中的DNA分子数; λ 是指目标分子占总的反应微腔数的比例; P 是每个微腔有 k 个目标分子的概率。

微腔内至少包含1个拷贝分子即实验测得的荧光亮点的概率为:

$$P(K > 0, \lambda) = 1 - P(k = 0, \lambda) = 1 - e^{-\lambda}$$
(5)

假设样本基因分子的拷贝数浓度为 C_0 ,稀释倍数为 D_{dil} ,通过软件统计出来的荧光亮点数为 n ,总的反应腔室数为 N ,那么在假定每个包含一个或者多个拷贝分子微反应腔室都能产生荧光信号并能够被准确地统计为荧光亮点的基础上,可推算出拷贝数浓度:

$$C_0 = -D_{dil} \times N \times \ln(1 - \frac{n}{N})$$
(6)

本研究使用自吸式数字等温扩增微流控芯片扩增人体尿液中循环游离的miR-21分子的结果(局部)如图8所示。图8a是20 μL等温扩增反应混合液中添加上1 μL的人体尿液样本后,拍摄芯片的荧光图像;图8b是不添加样品的阴性对照结果。自吸式数字等温扩增微流控芯片成功实现了样本中循环游离miR-21分子的检测。反应结束后,将得到的荧光图

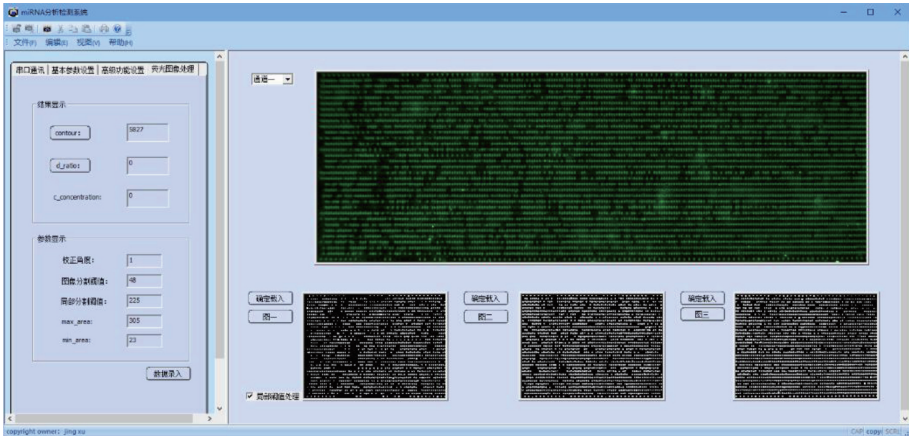


图7 荧光图像处理界面及处理结果
Fig.7 Fluorescent image processing interface and processing results

片通过本软件的分析处理,自动计算出 miR-21 的拷贝数为 168.7 copies/ μ L,结果如图 8d 所示;相应的,利用 Image J 图像处理软件对同一荧光图像进行手动处理后统计计算得出的荧光亮点和拷贝数均与本系统

软件计算结果一致,如图 8c 所示。因此,可以表明通过本文方法设计开发的荧光图像处理分析软件能够自动地准确计算分析得出自吸式数字等温扩增微流控芯片上生物学实验的基因拷贝数。



图8 使用数字等温扩增微流控芯片扩增人体尿液中循环游离的 miR-21 分子的结果

Fig.8 Amplification results of circulating free miR-21 molecules in human urine by digital isothermal amplification technology based on microfluidic chips

4 总结与展望

本研究着重介绍了根据本课题组自主研发的数字微流控芯片及其应用场景开发的集图像采集、芯片载物平台控制、荧光图像处理、数据分析等于一体的配套软件控制分析系统中的荧光图像处理部分,该部分的主要功能是消除芯片的制作、生物反应以及荧光图像采集等过程中产生的各种影响因素给结果分析处理所带来的干扰,提升数字 PCR 荧光定量结果的准确性。首先,确定合适的对荧光图像进行初步处理的方案,获取要进行处理分析的目标区域,减少不相干区域给处理效率和准确性带来的影响;其次,通过对目标区域进行滤波和二值化的预处理,尽可能多地在荧光点计数之前以及保证荧光图像有效细节不丢失的基础上滤除干扰;最后,通过对荧光图像全局阈值和局部阈值的滑块调节对图像进行准确且有针对性的分割,获得的结果明显优于只通过一个阈值对图像进行分割处理,再根据荧光点的周长的统计筛选掉不符合要求、大小不一的荧光噪点。通过本文方法对采集到的荧光图像进行处理可以获得不失真、较为清晰且完整的荧光图像分割结果,并能够精确计算出荧光亮点的数量,为后续的生物学结论分析积累数据奠定基础,但仍需要对荧光图片的处理效率和精度做进一步的优化提高。

【参考文献】

- [1] 王大洲,郭天笑,郑实,等. 核酸等温扩增技术在微生物快速检测中的研究进展[J]. 生物技术通报, 2017, 33(7): 49-61.
WANG D Z, GUO T X, ZHEN S, et al. Research progress on the

isothermal nucleic acid amplification techniques in rapid detection of microorganisms [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(7): 49-61.

- [2] AUER N, HRDINA A, HIREMATH C, et al. ChromaWizard: an open source image analysis software for multicolor fluorescence *in situ* hybridization analysis[J]. Cytometry Part A, 2018, 93(7): 749-754.
- [3] ZHOU Y, LI H, ZHANG W, et al. Automatic directional analysis of cell fluorescence images and morphological modeling of microfilaments[J]. Med Biol Eng Comput, 2018, 57(1): 325-337.
- [4] BRUECKNER P, FUETTERER R, HOLDER S, et al. High resolution acquisition and processing of fluorescent microscopic images for quality assurance of food [J]. Measurement, 2015, 61: 123-128.
- [5] 周淑芳, 苟彤, 方伟波, 等. 基于微流控芯片的数字 PCR 荧光图像分析方法[J]. 生命科学仪器, 2018, 16(1): 27-31.
ZHOU S F, GOU T, FANG W B, et al. Digital PCR fluorescence image processing based on microfluidic chip [J]. Life Science Instruments, 2018, 16(1): 27-31.
- [6] HELMY A K, EL-TAWEL G S. Regular gridding and segmentation for microarray images [J]. Comput Electr Eng, 2013, 39(7): 2173-2182.
- [7] 刘伟, 钱莉. 基于 OpenCV 环境的 SIFT、SURF、ORB 算法比较分析[J]. 化工自动化及仪表, 2018, 45(9): 714-716.
LIU W, QIAN L. Comparative analysis of SIFT and SURF and ORB algorithms based on OpenCV environment [J]. Control and Instruments in Chemical Industry, 2018, 45(9): 714-716.
- [8] RUBLEE E, RABAU D V, KONOLIGE K, et al. ORB: an efficient alternative to SIFT or SURF[C]//EEE International Conference on Computer Vision. IEEE, 2011: 2564-2571.
- [9] 褚慧君, 朱宏辉, 高军. 基于改进的投影检测车牌倾斜校正算法[J]. 物流技术, 2017, 36(1): 89-93.
CHU H J, ZHU H H, GAO J. Improved tilt correction algorithm for shadowgraph detection of license plates [J]. Logs Technology, 2017, 36(1): 89-93.
- [10] 王炎, 贺俊吉. 基于投影分析的集装箱箱号倾斜校正方法[J]. 计算机仿真, 2015, 32(8): 422-426.

- WANG Y, HE J J. Container code slant correction based on projection analysis [J]. Computer Simulation, 2015, 32(8): 422-426.
- [11] 陈玲, 李熙莹, 卢林. 车牌倾斜校正算法研究及改进[J]. 计算机与现代化, 2013, 12: 91-97.
- CHEN L, LI X Y, LU L. Research and modification of license plate tilt correction algorithms [J]. Computer and Modernization, 2013, 12: 91-97.
- [12] 刘旭, 巫玲, 陈念年, 等. 基于光栅投影序列图像融合的倾斜校正算法[J]. 计算机应用, 2013, 33(11): 3209-3212.
- LIU X, WU L, CHEN N N, et al. Tilt correction algorithm based on aggregation of grating projection sequences [J]. Computer Application, 2013, 33(11): 3209-3212.
- [13] 黄文笔, 战荫伟, 陈家益, 等. 改进的自适应中值滤波算法[J]. 计算机系统应用, 2018, 27(10): 183-188.
- HUANG W B, ZHAN Y W, CHEN J Y, et al. Improved adaptive median filtering algorithm [J]. Computer Systems & Applications, 2018, 27(10): 183-188.
- [14] SHAIK M S, KENNEDY B C. Gaussian noise removal in an image using fast guided filter and its method noise thresholding in medical healthcare application [J]. J Med Syst, 2019, 43(8): 1-9.
- [15] OTSU N. A threshold selection method from gray-level histograms [J]. IEEE Trans Syst Man Cybern, 1979, 9(1): 62-66.
- [16] 何育欣, 杨泽静, 郑伯川. 基于局部阈值的Canny边缘检测算法[J]. 西华师范大学学报(自然科学版), 2019, 40(3): 316-324.
- HE Y X, YANG Z J, ZHENG B C. Canny edge detection algorithm based on local threshold [J]. Journal of China West Normal University (Natural Science), 2019, 40(3): 316-324.
- [17] 翟伟良, 姜立标, 姚江波, 等. 边缘轮廓圆的测距及变形检测算法设计[J]. 机械设计与制造工程, 2019, 48(12): 85-89.
- ZHAI W L, JIANG L B, YAO J B, et al. Algorithm of ranging and deformation detection for the edge contour circle [J]. Mechanical Design and Manufacturing Engineering, 2019, 48(12): 85-89.
- [18] 杨静娴, 任小洪. 基于图像处理的白酒酒花轮廓检测[J]. 食品与机械, 2019, 35(12): 52-55.
- YANG J X, REN X H. Liquor hop contour detection based on image processing [J]. Food and Machinery, 2019, 35(12): 52-55.
- [19] SUZUKI S, ABE K. Topological structure analysis of digitized binary images by border following [J]. Comput Vision Graph Image Processing, 1985, 30(1): 32-46.
- [20] VOGELSTEIN B, KINZLER K W. Digital PCR [J]. Proceedings Nat Acad Sci, 1999, 96(16): 9236-9241.
- [21] 何子毅, 余霖, 王庆, 等. Z-score分数和泊松分布在血站血液核酸筛查室内质控的应用[J]. 中国输血杂志, 2020, 33(1): 11-14.
- HE Z Y, YU L, WANG Q, et al. Establishment and application of quality control charts using Z-score and Poisson distribution in blood nucleic acid screening laboratory [J]. Chinese Journal of Blood Transfusion, 2020, 33(1): 11-14.

(编辑:谭斯允)