

微孔式数字PCR荧光芯片的自动对焦

朱文艳, 周连群, 张芷齐, 李金泽, 李龙辉, 高旭, 李树力, 郭振, 姚佳

引用本文:

朱文艳, 周连群, 张芷齐, 等. 微孔式数字PCR荧光芯片的自动对焦[J]. *光学精密工程*, 2020, 28(9): 2065–2075.

ZHU Wen-yan, ZHOU Lian-qun, ZHANG Zhi-qi, et al. Autofocus of microarray digital PCR fluorescent chip[J]. *Optics and Precision Engineering*, 2020, 28(9): 2065–2075.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.37188/OPE.20202809.2065>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

微滴式数字PCR中低浓度荧光微滴分类

Identification of florescent droplets at low concentrations for droplet digital PCR

光学精密工程. 2018, 26(3): 647–653 <https://doi.org/10.3788/OPE.20182603.0647>

采用图像直方图特征函数的高速相机自动曝光方法

Auto exposure control for high frame rate camera using image histogram feature function

光学精密工程. 2017, 25(4): 1026–1035 <https://doi.org/10.3788/OPE.20172504.1026>

高光谱空间降采样独立成分特征分离

Independent component feature separation based on spatial down sample for hyperspectral image

光学精密工程. 2015, 23(11): 3246–3258 <https://doi.org/10.3788/OPE.20152311.3246>

推扫式遥感相机超满阱大动态范围成像

HDR imaging method of overcoming full well limitation for push–broom remote sensing cameras

光学精密工程. 2018, 26(4): 944–950 <https://doi.org/10.3788/OPE.20182604.0944>

高通量数字化毛细管微阵列芯片

High-throughput digital capillary microarray

光学精密工程. 2019, 27(6): 1237–1244 <https://doi.org/10.3788/OPE.20192706.1237>

文章编号 1004-924X(2020)09-2065-11

微孔式数字 PCR 荧光芯片的自动对焦

朱文艳^{1,2}, 周连群^{1,2}, 张芷齐^{1,2}, 李金泽²,
李龙辉^{2,4}, 高旭^{1,2}, 李树力^{2,5}, 郭振^{1,2*}, 姚佳^{2,3*}

- (1. 中国科学技术大学, 安徽 合肥 230026;
2. 中国科学院苏州生物医学工程技术研究所,
中国科学院生物医学检验技术重点实验室, 江苏 苏州 215163;
3. 苏州大学电子信息学院, 江苏 苏州 215006;
4. 长春理工大学机电工程学院, 吉林 长春 130022;
5. 上海大学通信与信息工程学院, 上海 200444)

摘要: 为了快速获取微孔式数字 PCR 芯片清晰的荧光图像, 解决传统方法针对微尺度阵列单元自动对焦存在的计算量大, 耗时长等问题, 建立了基于像素个数随离焦距离变化特征模型的自动对焦方法。依次取 3 个彼此间隔相同距离的微孔式数字 PCR 芯片的荧光图像, 通过自适应窗口选取与阈值计算, 统计窗口区域内大于阈值的像素个数, 代入特征函数计算离焦距离, 并通过统计出的 3 个位置的像素个数值判断离焦方向, 继而进行对焦。该方法仅需统计 13×13 个像素大小的对焦窗口中灰度大于阈值的像素个数, 且完成对焦仅需 4 步, 对焦结果完全满足后续计算的清晰度要求, 与传统爬山方法相比, 对焦步骤数平均减少了 51.89%, 实现了微孔式数字 PCR 芯片的准确快速对焦。本文提出的自动对焦方法克服了现有算法计算量大、对焦步骤繁琐的缺点, 预测准确、速度快, 最大程度上减少样本曝光时间, 进而减少荧光的淬灭, 为后续计算提供更为原始且精确的图像。

关键词: 自动对焦; 自适应阈值; 特征函数; 微孔式数字 PCR 芯片; 荧光成像

中图分类号: 510.99 **文献标识码:** A **doi:** 10.37188/OPE.20202809.2065

Autofocus of microarray digital PCR fluorescent chip

ZHU Wen-yan^{1,2}, ZHOU Lian-qun^{1,2}, ZHANG Zhi-qi^{1,2}, LI Jin-ze²,
LI Long-hui^{2,4}, GAO Xu^{1,2}, LI Shu-li^{2,5}, GUO Zhen^{1,2*}, YAO Jia^{2,3*}

- (1. *University of Science and Technology of China, Hefei 230026, China;*
2. *Key Laboratory of Bio-medical Diagnostics CAS,
Suzhou Institute of Biomedical Engineering and Technology,*

收稿日期: 2020-02-19; **修订日期:** 2020-04-16.

基金项目: 国家重点研发计划资助项目 (No. 2018YFC0115705, No. 2018YFF01011003); 国家自然科学基金资助项目 (No. 51675517, No. 61874133, No. 61901469); 江苏省自然科学基金资助项目 (No. BK20160057, No. BK20170428, No. BE2019684); 青年创新促进会 CAS 资助项目 (No. 2014280, No. 2018360, No. 2019322); 中国科学院 STS 项目 (No. KFJ-STC-SCYD-217, No. KFJ-STC-ZDTP-061); 江苏重点研发计划资助项目 (No. BE2018080, No. 2019684); 中国科学院仪器装备项目 (No. YZ201638, No. YJKYYQ20190057); 江苏省重大科技创新项目 (No. BO2015007); 中国博士后科学基金资助项目 (No. 2016M601890, No. 2018T110552); 江苏省博士后科研项目 (No. 1701010A, No. 2018K071C); 苏州市科技支撑计划资助项目 (No. SS201749, No. SYG201907)。

Chinese Academy of Sciences, Suzhou 215163, China;

3. *School of Electronic and Information Engineering, Soochow University, Suzhou 215006, China;*

4. *School of mechanical and electrical engineering,*

Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China;

5. *School of communication and information Engineering,*

Shanghai University, Shanghai 200444, China)

* *Corresponding author, E-mail: guozhen@sibet.ac.cn; yaojia@sibet.ac.cn*

Abstract: An autofocusing method, based on the characteristic model of the number of pixels changing with the defocus distance, was proposed to quickly obtain a clear fluorescence image of a micropore digital polymerase chain reaction (PCR) chip and overcome the issue of time-consuming calculation in the traditional method for autofocusing of the microscale array unit. Thereafter, fluorescent images of three microarray digital PCR chips equidistant from each other were selected. The threshold was calculated through an adaptive window. The pixels in the window area with values larger than the threshold were counted. The defocus distance was calculated by substitution in the characteristic function. The defocus direction was determined by the pixel values of the three positions and then focusing was carried out. This method uses only statistics of values larger than the threshold of the 13×13 pixels in the focusing window and completes focusing in only four steps. The focusing results satisfied the requirements of subsequent calculations. Compared with the traditional mountain climbing method, the number of focusing steps was decreased by 51.89% on average upon the implementation of the microarray-type digital PCR chip accurate focusing. The proposed autofocus method overcomes the shortcomings of contemporary algorithms, such as extensive computation and tedious focusing steps, and provides an accurate and rapid focusing method. It minimizes the exposure time of the sample, thereby reducing fluorescence quenching, and provides more original and accurate images for subsequent calculations.

Key words: autofocus; adaptive threshold; the characteristic function; microarray digital PCR chip; fluorescence imaging

1 引言

数字聚合酶链反应 (Digital Polymerase Chain Reaction, dPCR) 是一种测量靶 DNA 绝对拷贝数的独特方法, 是一种绝对定量技术, 最早由 Saiki 等发表^[1-2], 与实时荧光定量 PCR (Real-time Quantitative PCR, RT-qPCR) 相比, dPCR 已被证明具有更高的灵敏度, 精度及重复性^[3-5]。从扩增后的 dPCR 芯片中获取到有用的信息依赖于 dPCR 检测分析系统, 如进行无创产前检测^[6], 人类乳腺癌中 HER2 癌基因的检测^[7]等。目前, dPCR 荧光信息的检测方式主要包括两种: 一是荧光成像, 二是流式细胞荧光分选^[8-9]。荧光成像技术随着相机成像技术的发展, 其成像速度越来

越快, 分辨率也越来越高, 这种成像方式在显微成像中得到越来越广泛地应用^[10-12]。

荧光成像技术易存在失焦的问题, 针对微孔式数字 PCR 信息统计对于高质量荧光图像的需求, 若图像离焦问题严重, 则会影响统计数据的准确性。不同样本之间垂直位置的差异性, 导致相机获得的图像呈现不同程度的模糊, 因此, 对焦在光学视觉成像系统中起着重要作用, 例如各类相机、扫描仪、显微镜^[13-14]。而自动对焦可以在最少的人工干预下获得清晰图像^[15-16], 进而获得准确的统计数据。为快速获取清晰的图像以便于后续数据处理得到准确的检测结果, 必须根据样品变化动态的改变样品与物镜或物镜与成像面之间的距离, 以实现样品的自动对焦^[17]。

自动对焦可以通过主动、被动或者两者混合

来实现^[17-19]。主动方法一般是通过激光等测距工具来测量离焦距离后进行对焦,需要在系统中额外嵌入测距系统,并且当使用激光时,会造成芯片上的荧光基团淬灭^[20],对后续数据的准确性造成影响。被动方法可以分为相位检测法和对比度检测法,前者通过测量两幅图像之间的相位差来估计聚焦位置,依赖于特殊的传感器检测系统^[21];后者计算每一帧的清晰度以寻找最佳位置,无需额外检测附件,精简整体系统,降低成本^[22-23],但搜索每一帧并计算,明显增加了计算量和搜索步骤,进而造成对焦时间延长。

考虑到微孔式数字 PCR 芯片弱荧光样本分布差异造成其计算对象存在片内差异与片间差异,若对焦方法不当,荧光基团长时间暴露在激发光下会发生淬灭,影响后续结果统计。为了实现快速且准确对焦,本文基于数字 PCR 芯片多个排列孔的特征,提出了一种新的对焦算法,单曲线拟合函数法。通过计算包含单个孔的区域内大于阈值的像素的个数,得到随离焦距离变化,其像素数变化的曲线。在这里,阈值随图像平均灰度的变化而变化,从而得到一条与图像灰度无关的像素数随离焦距离变化曲线,通过正弦函数拟合得到该曲线的拟合函数,即为微孔式数字 PCR 芯片的对焦评价算法。通过该对焦算法,可以快速得到离焦图像的离焦距离与离焦方向,进而实现快速准确对焦。

2 实验原理

2.1 光学成像系统

自动调焦的目的是通过对光学成像系统的不断校正,使其能够对目标清晰成像,为后续的图像处理、信息提取提供纹理丰富、画面清晰的图像。对于不同结构的任何光学成像系统,其成像原理基本一致,如图1所示(彩图见期刊电子版)。OP和IP分别表示物平面和像平面, D 为透镜直径, R 为模糊圆半径, u 为物距, v 为图像距离, s 为透镜到图像检测器平面上的距离。黄实线和蓝虚线表示成像对象不同物距的聚焦结果。

根据几何光学原理,物距 u 、像距 v 与焦距 f 满足高斯成像公式,如式(1):

$$\frac{1}{f} = \frac{1}{u} + \frac{1}{v}. \quad (1)$$

由高斯成像公式可知,对于固定焦距的成像

系统,物空间任意物距的目标点在像空间存在唯一确定的点与其对应。当目标离焦时,目标点在图像探测器上的像不再是清晰的点,而是一个半径为 R 的弥散圆。结合光学系统的成像模型,根据三角形相似原理可以得到光学系统参数与弥散圆半径的关系式满足式(2)^[24]:

$$\frac{R}{D/2} = \frac{|s-v|}{v}. \quad (2)$$

根据式(1)和式(2)可得弥散圆半径 R 的具体值为式(3):

$$R = \frac{Ds}{2} \left| \frac{1}{s} - \frac{1}{v} \right|. \quad (3)$$

根据式(3),当 $s=v$ 时,弥散斑半径 $R=0$,物点 OP 在图像探测器上的像为理想的像点;当 $s \neq v$ 时,则有 $R \neq 0$,物点 OP 在图像探测器上的像便不再是一个理想的点,而是一个半径为 R 的弥散斑,即产生离焦图像。

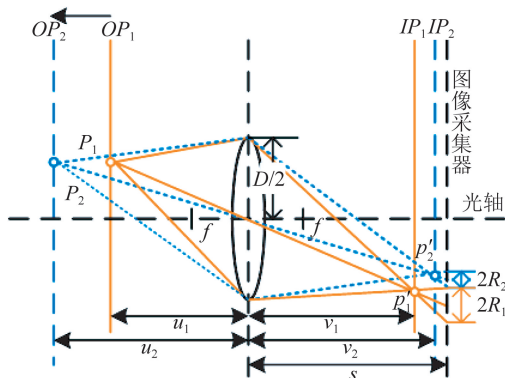


图1 透镜光学成像模型。

Fig. 1 Lens optical imaging model

弥散斑亮度分布可以通过简单的圆盘模型来近似^[25],如式(4)所示:

$$\begin{cases} h(x, y) = \frac{1}{\pi R^2}, x^2 + y^2 \leq R^2 \\ h(x, y) = 0, \text{otherwise} \end{cases}, \quad (4)$$

其中 R 是弥散斑半径。

传统的成像理论认为,固定对象成像的综合强度应与聚焦无关^[26-27]。因此,图像离焦是一个弥散斑半径逐渐变大,亮度分散的过程,拥有高亮度的像素数也逐渐减少,表现为亮度分布逐渐呈现均匀性,若灰度阈值选取得当,离焦过程中,大于该阈值的像素数逐渐增大,而在准焦时取得最小值。

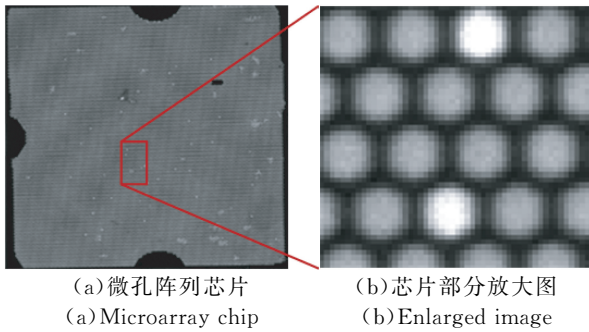


图 2 数字 PCR 系统的成像对象

Fig. 2 Imaging objects of the digital PCR system

在本文中,系统的成像对象是完成进样及封装的微孔阵列芯片,芯片上规则排列的微孔,将稀释的 dPCR 样本溶液分割,一部分微孔内填充有 DNA 样本,引物及特异性的荧光探针, DNA 每扩增一条 DNA 链,就会产生一个荧光分子。经过热循环的芯片在激光激发的作用下,荧光分子累积的孔呈现高亮度,其他孔亮度则无较大区别。如图 2 所示,芯片内灰度差异的存在及芯片间灰度差异的存在,使得传统的根据像素灰度梯度差来评价离焦量的自动对焦体系出现了片内差异及片间差异,这就要求其计算窗口需要尽可能大以减少这种误差,从而增加了计算量。

采用包含单孔的一定区域内,大于某一阈值像素数量的变化曲线对焦评价算法,其计算对象为单孔及其附近区域,在保证对焦精度的条件下,可以选择很小的对焦窗口,只需包含单孔及其附近区域,从而减小计算量。因此,该对焦算法理论上可以实现微孔式数字 PCR 芯片的准确快速对焦。

3 大于阈值的像素数量的调焦算法

3.1 自适应对焦窗口的选取

对焦窗口是在自动对焦过程中利用评价函数对拍摄场景进行清晰度评价所选取的某一区域,通常为人们所感兴趣的区域(Region-of-interest, ROI),而非对整幅图像进行计算。对焦窗口的选择影响对焦精度和速度^[18]。窗口太大则包含过多背景对象,导致数据冗余,从而增加计算负载;窗口选择太小,可能丢失关注对象的部分数据,因而合适的对焦窗口对完成快速对焦很重要。

常用的窗口选择算法有,中央区域对焦窗口选择法^[28]、多区域对焦窗口选择法、非均匀采样对焦窗口选择法等^[29]。这些方法在一定程度上节省了计算时间,在一些领域具有实用价值,但这些方法一旦选定区域后,对焦窗口就固定不变,面

对不同的对焦对象及对焦过程中出现的物体偏移情况无法做出有效应对,所以需要根据对焦对象及离焦距离的不同自适应选取对焦窗口以提高对焦精度。

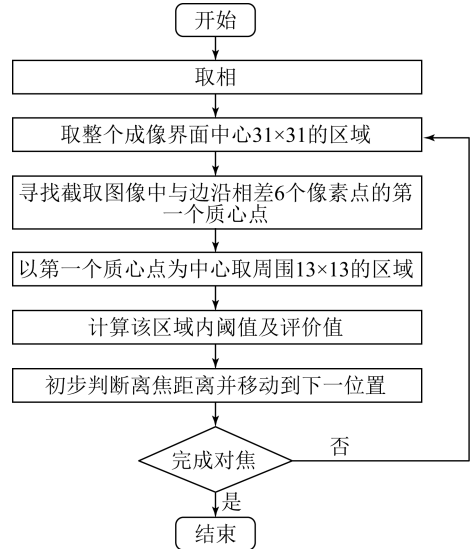


图 3 自适应窗口选择流程图

Fig. 3 Adaptive window selects flowchart

基于大于灰度阈值像素数量的自动调焦算法选取对焦对象的步骤为:首先选取视野中心 31×31 pixel 区域,在该区域中寻找与截取图像边沿相差 6 pixel 的第一个质心点;以第一个质心点为中心取周围 13×13 pixel 的区域为对焦窗口;然后所计算该区域的阈值及评价价值,获得离焦数据并进行对焦后将会判断是否完成对焦。若是,则结束,若否,则在下一次对焦前再进行一次窗口选取步骤,进而做到自适应窗口选取。根据不同对焦对象自适应选取对焦孔的步骤如图 3 所示。

3.2 基于最值的自动阈值选取

判断阈值的选取关系到对焦准确度,同时又要随样本的改变而自动变化,才能达到自动准确对焦的目的。文中根据对焦对象的特征提出了基于区域最值的自动阈值选取方法,在跟随样本变化的同时,能够做到准确对焦。

在对焦区域内,根据区域内的最大值与最小值变化曲线可知,其最值的和在一定范围内呈现一个稳定的值,这个稳定的值除以一个经统计后得出的固定的系数,即为所取阈值如式(5):

$$T = \{\max(I_{\text{out}}(x, y, z_r)) + \min(I_{\text{out}}(x, y, z_r))\} / 2.5, \quad (5)$$

其中: T 表示所取阈值, I_{out} 表示样本 I 在 z_r 处的离焦图像。

阈值 T 随对焦对象的亮度增大或减小,提供了一个具有普适性的阈值选取办法,同时为下面的评价算法的提出奠定了基础。如图 4 所示, x 轴表示图像位置的变化, y 轴表示灰度最大值的变化。红色表示 $\max I$,黄色表示 $\min I$,蓝色表示 $(\max I + \min I) / 2.5$ (彩图见期刊电子版)。

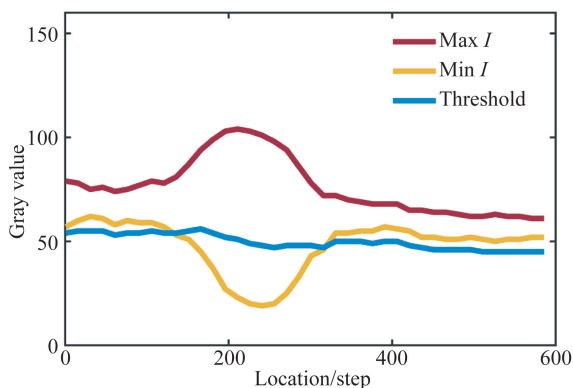


图 4 灰度最值曲线及阈值曲线

Fig. 4 Gray minimum and maximum curve and threshold curve

3.3 大于自动阈值的像素数量变化评价算法

依据对焦窗口的选取及阈值的选取,通过统计对焦窗口内大于阈值像素点数量的变化,得到对焦评价曲线。

在离焦到正焦再到离焦的序列图像中,图像的离焦量越小,弥散斑半径越小,亮度越集中,大于某一阈值的像素数量值达到最小,如图 5 所示。 x 轴表示样本的位置, y 轴表示像素数的变化。

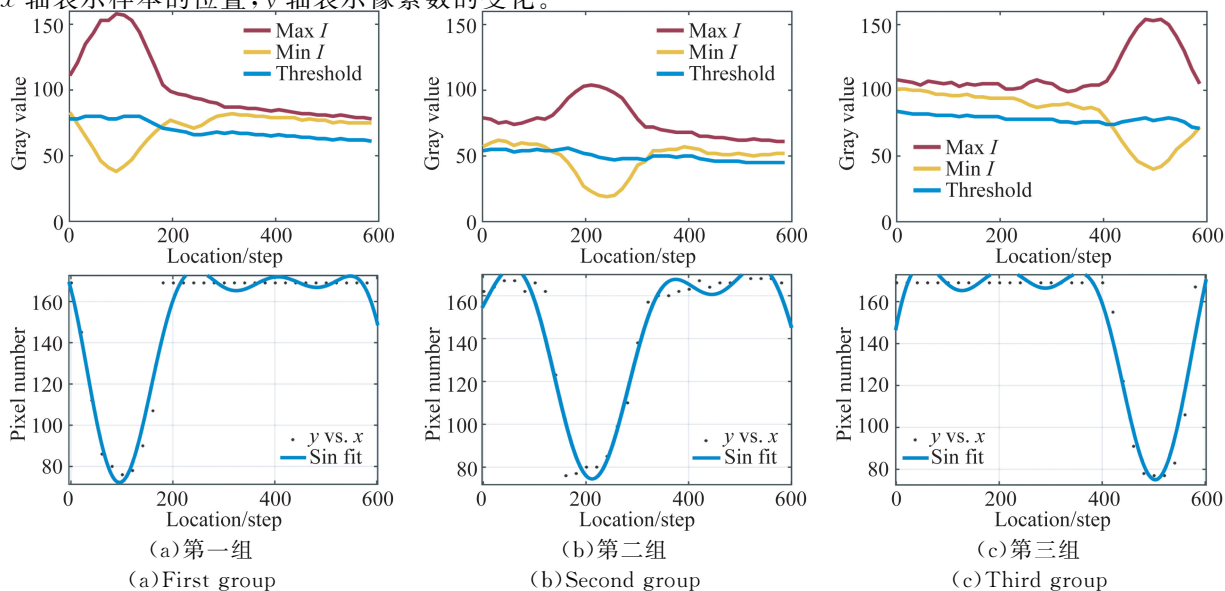


图 6 (左)阈值随最值变化曲线;(右)大于阈值的像素数随位置变化散点及其拟合曲线

Fig. 6 (Left) Curve of the threshold value changing with the most value. (Right) Scatter point and fitting curve of the number of pixels larger than the threshold value changing with position

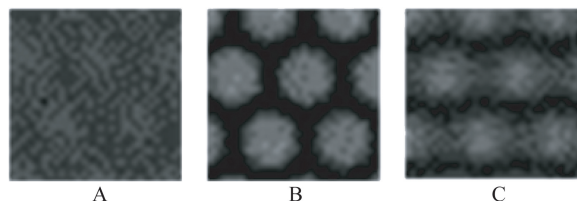
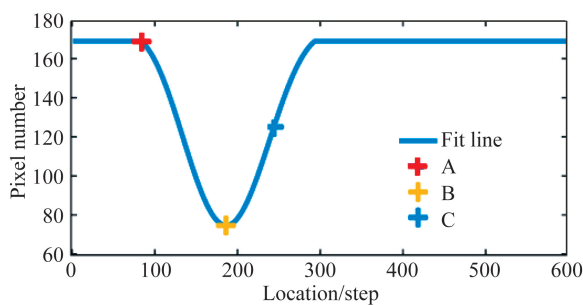


图 5 窗口内大于阈值的像素数随位置变化曲线及 A,B,C,3 点位置对应的微观孔的图像

Fig. 5 Curve of the number of pixels in the window that is greater than the threshold varies changing with position and images of microscopic holes corresponding of A, B, C, three points

传统的搜索方法通常根据一些自定义的规则来寻找最高峰,本文通过对不同芯片对焦窗口中不同灰度级像素的数量进行统计得到三组统计数据。如图 6 所示,组图左侧给出了对焦窗口内像素灰度最大值,最小值以及阈值的变化曲线,根据阈值的取值得到对焦窗口内大于阈值的像素数量的变化散点图,根据散点图的变化趋势拟合出了变化曲线。

从 3 组灰度变化曲线可知,3 个样本芯片的灰度最值及阈值选取的大小并不相同。但从像素

数量变化散点图及其正弦拟合曲线的变化趋势来说,在此阈值的选取方法下,3组像素数量变化曲线在突变区间横坐标与纵坐标的差值大小,平稳区间的纵坐标的大小上具有一定的一致性。

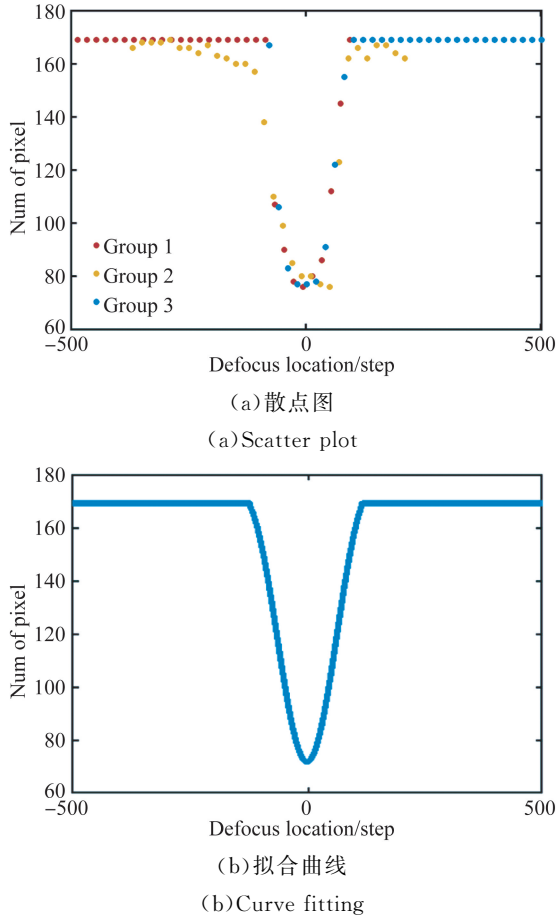


图 7 三组样本的像素数随离焦距离的变化趋势

Fig. 7 Changing trend of the pixel number in the three groups of samples with the defocus distance

根据分组图中,大于阈值的像素数量变化趋势的一致性,在同一图中做出像素数量随离焦距离的变化散点图及其拟合曲线^[30],如图 7 所示。

3组数据中,像素数量随离焦距离的变化趋势主要表现为 2 个特征:一是在一定离焦距离范围内,对于不同灰度的样本芯片,其像素数随离焦距离的变化趋势呈现高度的一致性,拟合曲线符合四参数正弦拟合曲线的变化特征^[31-32];二是,在上述离焦距离范围之外,对于不同灰度的样本芯片,其像素数量稳定在 169,即对焦窗口所包含的总的像素数。这两个特征符合光学成像原理所述的弥散斑半径及亮度分布特征,可用分段函数表示为:

$$f(d) = \begin{cases} 169, d < -122 \text{ or } d > 115 \\ a_1 \sin(b_1 d + c_1) \\ + a_2 \sin(b_2 d + c_2) \\ + a_3 \sin(b_3 d + c_3) \\ + a_4 \sin(b_4 d + c_4), \text{ other} \end{cases} \quad (6)$$

其中: d 表示离焦距离,参数 a, b, c 表示拟合曲线的参数。在 95% 的置信区间内,方差 R-square 为 0.944 条件下, a, b, c 的取值如表 1。

曲线的 d, f 取值只与离焦距离,大于阈值的像素数有关,在窗口和阈值确定的条件下,可认为曲线的变化特征唯一确定。因此,在计算得出大于阈值的像素数后,可根据拟合曲线来计算离焦距离与方向。根据像素数反推出的数字的绝对值代表离焦距离,正负代表方向,为正时,代表取相位置在准焦点位置的下方,应向上运动;为负时,代表取相位置在准焦点位置的上方,应向下运动。

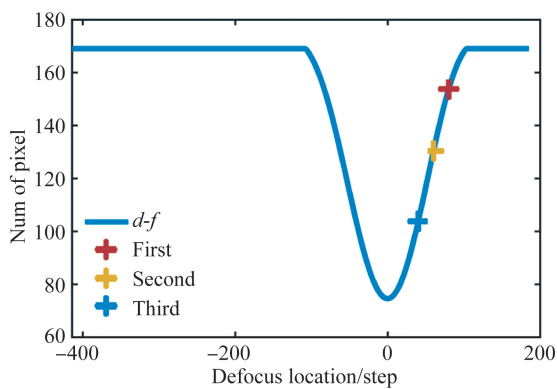
表 1 拟合曲线系数

Tab. 1 Fitting curve coefficient table

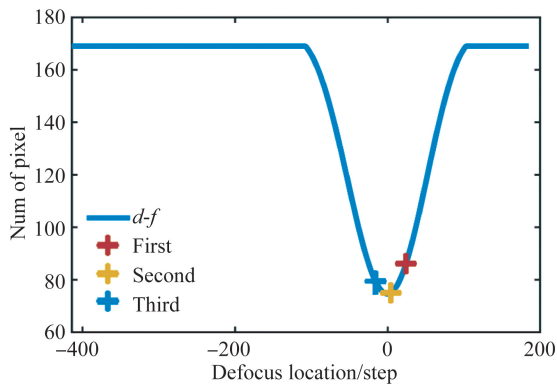
系数	取值	置信区间	方差
a_1	151.9		
b_1	8.477×10^{-3}	95%	0.944
c_1	1.343		
a_2	36.05		
b_2	0.010 34		
c_2	-1.549		
a_3	25.5		
b_3	0.02. 93		
c_3	-1.541		
a_4	14.44		
b_4	0.031 33		
c_4	-1.567		

考虑到已知 y 轴坐标求 x 时的解是双解,需要判断取相位置来判断取何解。为了得到准确解,向上等距取 3 个位置的图像, Δd 暂时定为 20 个位置差。计算其大于阈值的像素数分别为 $f_1(d), f_2(d)$ 和 $f_3(d)$,反推得到的离焦距离分别为 $(d_1, d_2), (d'_1, d'_2), (d''_1, d''_2)$,其中矩阵的第一列表示 f 在负半轴的取值,第二列表示在正半轴的取值。根据 3 个像素计数值判断对焦方向的方法如图 8 所示。 $f_1(d) > f_2(d) > f_3(d), \Delta d = 20$,一、二取相位置位于焦点下方,取 d_1, d_2 。以第二位取相位置为基准,应先下移 Δd ,再上移 d_2 。

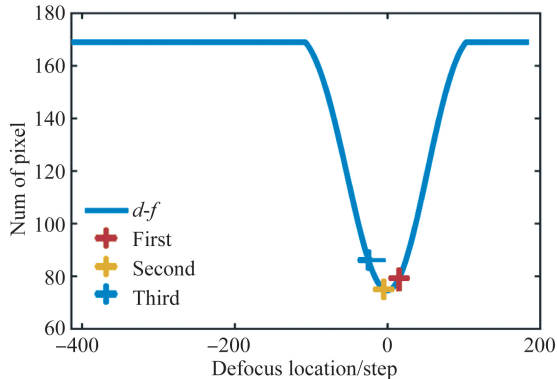
$f_1(d) > f_3(d) > f_2(d)$, 一取相位置位于焦点下方, 三取相位置位于焦点上方, 以三取相位置为基准, 应下移 d'_1 。 $f_3(d) > f_2(d) > f_1(d)$, 一取相位置位于焦点下方, 三取相位置位于焦点上方, 以三取相位置为基准, 应下移 d'_1 。 $f_1(d) > f_3(d) > f_2(d)$, 二、三取相位置位于焦点上方, 以三取相位置为基准, 应下移 d'_1 。其中, 若 $f_1(d)$, $f_2(d)$, $f_3(d)$ 中存在大于 165 的点, 则先运动到既定的初始基准位置, 以已知方向进行取相计算。



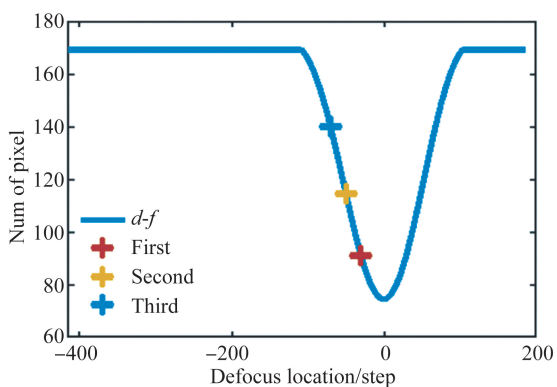
(a) $f_1(d) > f_2(d) > f_3(d)$



(b) $f_1(d) > f_3(d) > f_2(d)$



(c) $f_3(d) > f_2(d) > f_1(d)$



(d) $f_1(d) > f_3(d) > f_2(d)$

图 8 根据 3 个位置像素数值分布情况进行方向判断
Fig. 8 Judging the direction according to the distribution of the number of pixels in 3 locations

4 结果与分析

为了评估所提出方法的有效性和效率, 本文对 3 张新的芯片进行测试, 每张芯片采集 A, B, C 共 3 组不同初始位置的数据, 每组数据包含 3 个等间隔位置的图像。通过计算每个位置图像上大于阈值的像素个数, 来计算离焦距离和进行离焦方向的判断, 结果如表 2~表 4, 图 9~图 11。此外, 每张芯片在离焦到正焦再到离焦的过程中都均匀的提取了 600 张图像, 对每组的 600 张图片进行处理, 并利用清晰度计算方法对每组图像进行计算统计, 做出清晰度评价拟合曲线, 选取曲线的最值对应的位置作为准焦点位置, 进而计算出每个初始位置的实际离焦距离。

表 2、表 3、表 4 中分别统计了每张芯片的灰度及每个位置的计算离焦信息, 并与实际离焦信息进行对比, 得出对焦误差, 该误差反映到实际图像上, 即为图 9、图 10、图 11。

表 2 第一张芯片测试数据

Tab. 2 First chip test data

参数	A	B	C
平均灰度	110.3	102.1	102.2
计算离焦距离	63	-34	-57
实际离焦距离	57	-43	-63
误差	+6	+9	+6

图中 Initial 列是芯片位于初始位置时整幅芯片图像及 5 个区域微观图, A, B, C 组分别代表 3 个初始图像; Autofocus 列是对焦后整幅芯片图像及 5 个区域微观图, A, B, C 组分别代表 3 幅对焦后图像; Focus right, 即 D 组是准焦点整幅芯片图像及 5 个区域的微观图, 图中的红色方框代表截取的区域在整幅芯片图像中所处位置。

Autofocus 列的 A, B, C 三组图像中, 孔与孔之间已经可以明显分辨。经过与准焦点的 D 组图像对比发现, 在肉眼观察条件下, 并不能清晰判别几幅图像之间的差异。在预设清晰度条件下, 所有对焦测试结果已满足后续计算要求, 经过测试, 目前所界定的清晰范围为准焦点上下 15 个位置。

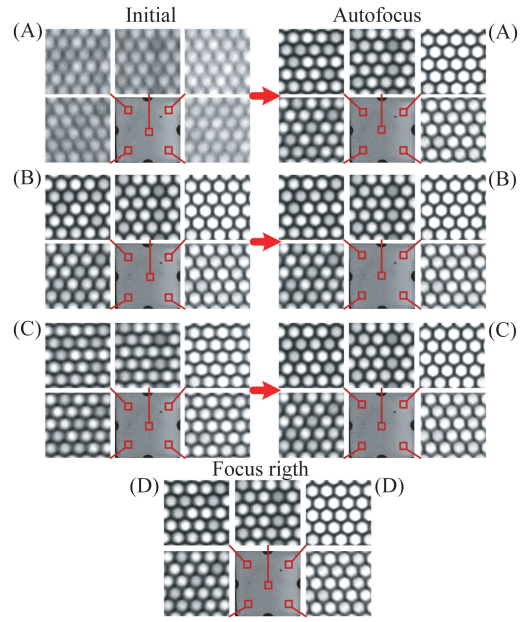


图 10 第二张芯片准焦图像与 3 组对焦前后图像
Fig. 10 Second chip quasi-focal image and three groups of pre-and post-focal images

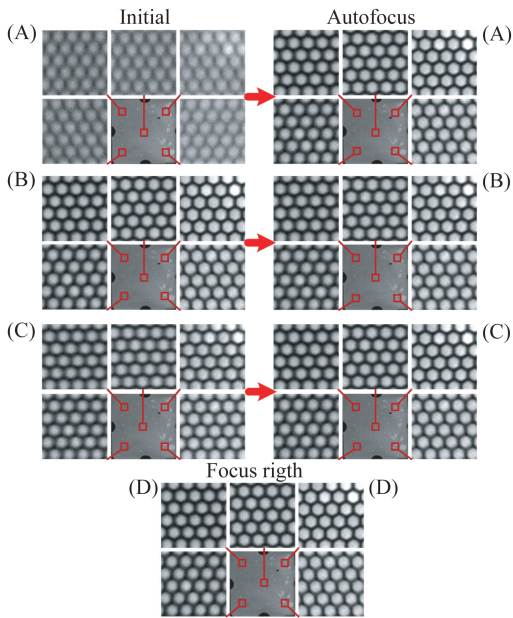


图 9 第一张芯片准焦图像与 3 组对焦前后图像
Fig. 9 First chip quasi-focal image and three groups of pre-and post-focal images

表 4 第三张芯片测试数据

Tab. 4 Third chip test data

参数	A	B	C
平均灰度	105.1	97.5	96.8
计算离焦距离	46	-21	-64
实际离焦距离	49	-31	-71
误差	-3	+10	+7

表 3 第二张芯片测试数据

Tab. 3 Second chip test data

参数	A	B	C
平均灰度	138.9	129.6	127.4
计算离焦距离	63	-32	-73
实际离焦距离	62	-18	-58
误差	+1	-14	-15

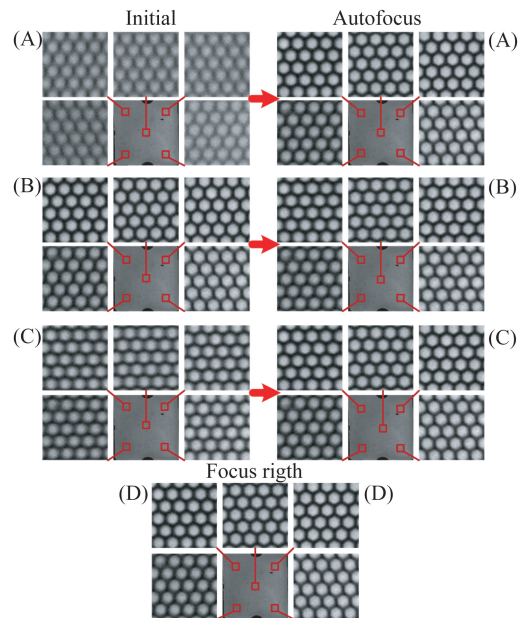


图 11 第三张芯片准焦图像与 3 组对焦前后图像
Fig. 11 Third chip quasi-focal image and three groups of pre-and post-focal images

以速度和准确性为标准,在同等初始条件下,与传统的爬山算法进行比较(各类爬山算法的区别主要在于步长与精度的选择上,但是基本思想是相同的)。Hen 等^[33]提出粗细结合的对焦方法,该方法采用粗略或较大步距找到一个峰值,然后反转方向采用精细或较小步距来缩小范围。峰和反转方向、停止搜索的条件是手动创建的,不同研究者给与的峰和反向以及停止搜索的条件是不同的。在这里,根据对象创建的搜索条件是,粗搜索步距,20 个位置差,较为精细搜索,10 个位置差,初始搜索方向定位向上搜索,搜索到峰值即停止搜索,对焦过程中,每运动一步均需要重新取相计算,直到完成对焦。假设使用两种不同的算法在相同的初始位置对同一样本进行对焦,并且电机驱动位移台进行相同的匀速运动,以此忽略多次启停造成的时间延长,则在对焦过程中耗费时间的动作集中在取相计算上,当对焦所需步骤数越多,重复取相与计算次数越多,整体上对焦耗时越多。若不忽略多次启停造成的时间延长,则步骤数越多,启停引起的时耗越多。因此,文中以所需步骤数的多少的来评价对焦过程的快慢^[34-35],对传统爬山搜索算法和本文中所提算法对焦过程中所需步骤数进行了统计。文中所提方法完成对焦仅需 4 步,与传统爬山算法相比,步骤数明显减少,并在表 5 中做出统计。

同时,爬山完成所需步骤数明显与芯片的初始位置以及初始运动方向的设定有关。当设定初始方向为向上,芯片初始位置位于焦点以下比初始位置位于焦点以上对焦步骤数明显减少,原因是少了第三次取相后的换向过程。另外,若爬山步距设置较小,并且评价函数选取不恰当,搜索过

程中很容易陷入局部极值,在未到达峰值点的情况下就退出搜索,对焦过程中断。

表 5 不同对焦方法所需步骤数对比

Tab. 5 Number of steps required by different focusing methods is compared

芯片数	组数	步骤减少百分比/%
芯片 1	A	42.9
	B	50.0
	C	55.6
芯片 2	A	55.6
	B	33.3
	C	60.0
芯片 3	A	42.9
	B	60.0
	C	66.7

5 结 论

以上研究表明,一定区域内,通过灰度大于阈值的像素数变化曲线作为微孔式数字 PCR 芯片的自动对焦算法是可行的。利用对焦窗口和判断阈值的自适应选取,统计窗口内大于阈值的像素数,并得出其随离焦距离变化的特征拟合曲线以及曲线的函数表达式,该函数在后续测试中成功实现了对焦。该方法不受灰度变化的影响,与混合爬山对焦方法相比,对焦步骤数最少减少了 33.3%,最多减少了 66.7%,平均减少了 51.89%,实现了微孔式数字 PCR 芯片微尺度阵列单元的准确快速对焦,在最大程度上减少荧光曝光时间,进而减少荧光的淬灭,为后续计算提供更为原始而准确的图像。

参考文献:

- [1] DONG L, MENG Y, SUI Z, *et al.*. Comparison of four digital PCR platforms for accurate quantification of DNA copy number of a certified plasmid DNA reference material[J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13174.
- [2] DUECK M E, LIN R, ZAYAC A, *et al.*. Precision cancer monitoring using a novel, fully integrated, microfluidic array partitioning digital PCR platform[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 19606.
- [3] DAY E, DEAR P H, MCCAUGHAN F. Digital PCR strategies in the development and analysis of molecular biomarkers for personalized medicine[J]. *Methods*, 2013, 59(1): 101-107.
- [4] WHALE A S, HUGGETT J F, COWEN S, *et al.*. Comparison of microfluidic digital PCR and conventional quantitative PCR for measuring copy number variation[J]. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(11): e82.
- [5] HUGGETT J F, COWEN S, FOY C A. Considerations for digital PCR as an accurate molecular diagnostic tool[J]. *Clin Chem*, 2015, 61(1): 79-88.
- [6] CHANG M Y, AHN S, KIM M Y, *et al.*. One-step noninvasive prenatal testing (NIPT) for autosomal recessive homozygous point mutations using

- digital PCR[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 2877.
- [7] DANDACHI N, DIETZE O, HAUSER-KRONBERGER C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma[J]. *Lab Invest*, 2002, 82(8): 1007-1014.
- [8] CHEN S, XIE X, ZHENG F, *et al.*. Auto focusing method of imaging system of digital PCR instrument based on BP neural network[J]. *International Journal of Pattern Recognition and Artificial Intelligence*, 2019, 33(12): 1954031.
- [9] LONOWSKI L A, NARIMATSU Y, RIAZ A, *et al.*. Genome editing using FACS enrichment of nuclease-expressing cells and indel detection by amplicon analysis[J]. *Nat Protoc*, 2017, 12(3): 581-603.
- [10] DEVADHASAN J P, KIM S. CMOS image sensor based HIV diagnosis: a smart system for point-of-care approach[J]. *BioChip Journal*, 2013, 7(3): 258-266.
- [11] DIEKMANN R, TILL K, MULLER M, *et al.*. Characterization of an industry-grade CMOS camera well suited for single molecule localization microscopy-high performance super-resolution at low cost[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 14425.
- [12] GUO N, CHEUNG K, WONG H T, *et al.*. CMOS time-resolved, contact, and multispectral fluorescence imaging for DNA molecular diagnostics[J]. *Sensors (Basel)*, 2014, 14(11): 20602-20619.
- [13] XIA X, YAO Y, LIANG J, *et al.*. Evaluation of focus measures for the autofocus of line scan cameras[J]. *Optik*, 2016, 127(19): 7762-7775.
- [14] SANCHEZ-ORELLANA G, CASAS-FLORES S, GUTIERREZ-MEDINA B. Automated, continuous video microscopy tracking of hyphal growth[J]. *Fungal Genet Biol*, 2019, 123: 25-32.
- [15] KUDRYAVTSEV A V, DEMBELE S, PIAT N. Autofocus on moving object in scanning electron microscope[J]. *Ultramicroscopy*, 2017, 182: 216-225.
- [16] 韩西达, 王敏, 黄强, 等. 用于多孔板细胞分析的自动显微成像系统[J]. *光学精密工程*, 2013, 21(10): 2543-2548.
- HAN X D, WANG M, HUANG Q, *et al.*. Auto-microimaging system for cell analysis with multiple well plates[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2013, 21(10): 2543-2548. (IN CHINESE)
- [17] YAZDANFAR S, KENNY K B, TASIMI K, *et al.*. Simple and robust image-based autofocusing for digital microscopy[J]. *Optics Express*, 2008, 16(12): 8670-8677.
- [18] ZHANG Y, LIU L, GONG W, *et al.*. Autofocus system and evaluation methodologies: a literature review[J]. *Sensors and Materials*, 2018, 30(5): 1165-1174.
- [19] 梁敏华, 吴志勇, 陈涛. 采用最大灰度梯度法实现经纬仪自动调焦控制[J]. *光学精密工程*, 2009, 17(12): 3016.
- LIANG M H, WU Z Y, CHEN T. Auto-focus adjustment of theodolites by largest the gradient method[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2009, 17(12): 3016. (in Chinese)
- [20] HWANG W, BAE S, HOHNG S. Autofocusing system based on optical astigmatism analysis of single-molecule images[J]. *Optics Express*, 2012, 20(28): 29353-29360.
- [21] YAMASAKI T, NAKAMURA T, FUNATSU R, *et al.*. Hybrid autofocus system by using a combination of the sensor-based phase-difference detection and focus-aid signal[C]. *2018 IEEE International Conference on Consumer Electronics (ICCE)*, 2018: 1-2.
- [22] ZHANG X, LIU Z, JIANG M, *et al.*. Fast and accurate auto-focusing algorithm based on the combination of depth from focus and improved depth from defocus[J]. *Optics Express*, 2014, 22(25): 31237-31247.
- [23] 张从鹏, 曹文政, 徐明刚, 等. 结核杆菌涂片显微镜视觉检测系统的自动聚焦[J]. *光学精密工程*, 2018, 26(6): 1480-1488.
- ZHANG C P, CAO W Z, XU M G, *et al.*. Automatic focusing of micro-vision detection system of Mycobacterium tuberculosis smear[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2018, 26(6): 1480-1488. (in Chinese)
- [24] HWANG T, CLARK J J, YUILLE A L. A depth recovery algorithm using defocus information[C]. *Proceedings CVPR'89: IEEE Computer Society Conference on Computer Vision and Pattern Recognition*, 1989: 476-482.
- [25] LIU Y-F, LO N-W, SUBBARAO M, *et al.*. Parallel implementation of a unified approach to image focus and defocus analysis on the Parallel Virtual Machine[M]. 3387. *SPIE*, 1998.
- [26] HIRAOKA Y, SEDAT J W, AGARD D A. Determination of three-dimensional imaging properties

- of a light microscope system. Partial confocal behavior in epifluorescence microscopy[J]. *Biophysical Journal*, 1990, 57(2): 325-333.
- [27] 王倩, 宋恩民, 许向阳, 等. 基于加权邻域相关性的显微镜自动聚焦函数[J]. *光学精密工程*, 2008(1):172-177.
WANG Q, SONG E M, XU X Y, *et al.*. Auto-focusing function for microscope image based on weighted neighborhood correlation[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2008(1):172-177. (in Chinese)
- [28] TIAN Y. Dynamic focus window selection using a statistical color model[C]. *Digital Photography II*, 2006: 60690A.
- [29] LIANG M, WU Z, CHEN T. Auto-focusing adjustment of theodolites by largest the gradient method[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2009, 17: 3016-3021.
- [30] 郝贤鹏, 任建岳, 邹振书. 临界角法检焦系统的设计[J]. *光学精密工程*, 2009, 17(3).
HAO X P, REN J Y, ZOU Z S. Design of focus error detection system based on critical angle method[J]. *Opt. Precision Eng.*, 2009, 17(3). (in Chinese)
- [31] DA SILVA M F, RAMOS P M, SERRA A C. A new four parameter sine fitting technique [J]. *Measurement*, 2004, 35(2): 131-137.
- [32] CHEN K F. On the condition of four-parameter sine wave fitting[J]. *Computer Standards & Interfaces*, 2007, 29(2): 174-183.
- [33] HE J, ZHOU R, HONG Z. Modified fast climbing search auto-focus algorithm with adaptive step size searching technique for digital camera [J]. *IEEE Transactions on Consumer Electronics*, 2003, 49(2): 257-262.
- [34] KEHTARNAVAZ N, OH H J. Development and real-time implementation of a rule-based auto-focus algorithm[J]. *Real-Time Imaging*, 2003, 9(3): 197-203.
- [35] LIANG Y, YAN M, TANG Z, *et al.*. Learning to autofocus based on gradient boosting machine for optical microscopy[J]. *Optik*, 2019, 198: 163002.

作者简介:



朱文艳(1993—),女,河南淮阳人,硕士研究生,2017年于郑州大学获得学士学位,主要从事系统控制及自动对焦方向的研究。E-mail: zhuwy@mail.ustc.edu.cn



姚佳(1986—),男,江苏苏州人,博士,副研究员,2011年于南京航空航天大学获得硕士学位,主要从事微纳生物传感器及其应用的研究。E-mail: yaojia@sibet.ac.cn

导师简介:



郭振(1984—),男,宁夏隆德人,研究员,硕士生导师,2011年获得中法双博士学位,主要从事微纳材料加工、制备及传感芯片研发。E-mail: guozhen@sibet.ac.cn