

文章编号 1004-924X(2016)01-0030-09

## 微球测速聚类分析的流式液路稳定性评估

张文昌<sup>1,2</sup>, 祝连庆<sup>2,1\*</sup>, 娄小平<sup>2</sup>, 刘超<sup>2</sup>, 孟晓辰<sup>2</sup>

(1. 合肥工业大学 仪器科学与光电工程学院, 安徽 合肥 230009;

2. 北京信息科技大学 光电测试技术北京市重点实验室, 北京 100101)

**摘要:**提出了一种基于  $90^\circ$  Mie 散射的高速图像采集微球测速方法,用于准确评估流式细胞仪流动室内的层流状态及单细胞流的稳定性。利用流动室内微球速度的稳定性对流动室内单细胞流的稳定性进行了评估。首先,利用高速显微成像系统采集  $90^\circ$  Mie 散射光的图像,选取  $90^\circ$ 侧向散射光以避免激发光源直射光的干扰,同时去除背景光源并提高图像对比度;然后,利用基于梯形白化权函数的灰色聚类分析方法对微球拖尾图像进行分类,实现对不足、正常、衍射和重叠 4 种情况的准确分类;最后,利用中点法确定正常图像上升沿及下降沿的边界,提高拖尾长度计算的准确性。搭建了高速微球测速实验系统,对本文方法进行验证。结果表明,该方法能够获得清晰的微球拖尾图像并对微球拖尾图像进行准确分类。对本文实验系统测得的微球拖尾长度平均值为 116.9 个像素点,标准差为 1.7。

**关键词:**流式细胞仪;液路稳定性评估;微球测速;高速图像采集;聚类分析

**中图分类号:**TH773 **文献标识码:**A **doi:**10.3788/OPE.20162401.0030

## Stability evaluation of flow cytometer liquid path based on cluster analysis of particle velocity

ZHANG Wen-chang<sup>1,2</sup>, ZHU Lian-qing<sup>2,1\*</sup>, LOU Xiao-ping<sup>2</sup>, LIU Chao<sup>2</sup>, MENG Xiao-chen<sup>2</sup>

(1. School of Instrumentation Science & Opto-electronics Engineering,  
Hefei University of Technology, Hefei 230009, China;

2. Beijing Key Laboratory for Optoelectronics Measurement Technology,  
Beijing Information Science and Technology University, Beijing 100101, China)

\* Corresponding author, E-mail: zhulianqing@sina.com

**Abstract:** A high-speed particle image velocimetry based on  $90^\circ$  Mie scattering was proposed to evaluate the status of laminar flow and single-cell flow stability in the flow cell of a flow cytometer. The velocity stability of the particles in the flow cell was used to evaluate the single-cell flow stability of the flow cytometer. Firstly,  $90^\circ$  Mie scattering images of the particle were acquired with a high-speed image sampling system. The  $90^\circ$  Mie scattering selected could avoid the interference of the excitation light source and could remove the background source and improve the image contrast. Then, the grey cluster analysis algorithm based on trapezoid whitenization weight functions was used to classify for all different types of images with shortages, normal, diffraction and overlap. Finally, a

收稿日期:2015-06-19;修订日期:2015-08-15.

基金项目:教育部长江学者和创新团队发展计划资助项目(No. IRT1212);北京市市属高等学校创新团队建设提升计划资助项目(No. IDHT20130518);北京市教委科研计划面上项目(No. KM201511232006)

center-point method was taken to determine the boundaries of the trailing image to improve the computational accuracy of the length of particle trailing. A experimental system was carried out to verify the feasibility of the comprehensive method. The results show that the method obtains distinct trailing images and they have been classified accurately. Moreover, for the system of this article, the average length of trailing image covers 116.9 pixels, and the standard deviation is 1.7.

**Key words:** flow cytometer; flow stability evaluation; particle velocity measurement; high-speed image sampling; cluster analysis

## 1 引言

流式细胞仪是一种对悬液中处于高速、直线流动的单细胞或其他颗粒,通过检测散射光信号和荧光信号,实现高速逐一多参数定量分析的临床检验分析仪器。液路系统是该仪器的重要组成部分,其主要目的是使包含被测样品(细胞或微球)的样本液在鞘液的包裹下,形成稳定的层流,从而达到获取单细胞流的目的。液路系统的稳定性将直接影响细胞/微球通过流动室检测区域的位置及时间,进而影响散射光及荧光信号的信号强度及光脉冲持续时间。因此,液路系统稳定性的评估,尤其是对细胞/微球通过流动室检测区域时的速度稳定性进行评估,可以实现对整台仪器稳定性的快速预判<sup>[1-7]</sup>。

目前,流式细胞仪液路系统稳定性的判定方法主要有压力法和脉冲信号特征分析法。压力法通过观测液路系统中最关键的样本液压力和鞘液压力,并且根据不同的检测速率要求,两者变化幅度在一定范围之内就可判定液路系统稳定。但是,压力法是对作用于样本液和鞘液的气体压力进行检测,而不是直接对液体流速进行检测,所以无法衡量后续进样结构及管路对层流及细胞/微球速度的影响。脉冲信号特征分析法通过数据采集模块来检测细胞经过流动室检测区域时产生的散射光及荧光信号,利用得到的脉冲宽度的稳定性来表征细胞速度的稳定性。该方法需要完成细胞/微球的散射光激发、收集、光电转换、脉冲处理和参数提取等一系列操作,涉及到光路系统、电子电路处理系统,从而增加了测量过程的不确定因素,无法真实反映细胞/微球在流动室内的流动情况<sup>[6-7]</sup>。

高精度的流场特性分析方法主要有粒子图像测速法(Particle Image Velocimetry, PIV),其速

度测量依赖于散布在流场中的示踪粒子,通过测量示踪粒子在已知的很短时间间隔内的位移来间接测量流场的瞬时速度分布,并可提供详细的流场空间结构以及流动特性<sup>[5]</sup>。然而,PIV 技术用于液体流场分析所使用的微球尺寸与流式细胞仪的检测样本尺寸相近,从而无法利用多示踪粒子分析流动室内层流及单细胞流的流动特性。

针对上述问题,本文利用高速显微图像采集系统检测流动室内微球的 90°Mie 散射光,并利用灰色聚类分析法对采集到的大量图像中光强/拖尾长度不足、正常、衍射及重叠等情况进行聚类分析,获得了标准的正常拖尾图像。然后,利用中点法确定拖尾边界,并计算相应的微球流速。最后,利用微球流速的稳定性表征流式细胞仪液路系统的稳定性。

## 2 方法研究

### 2.1 90°Mie 散射高速图像采集微球测速原理

由于生物细胞尺寸接近光波长量级,遵循 Mie 散射理论。根据 Mie 散射理论,散射微球可看作在光波电场中发生极化辐射电磁波的导电小球,利用麦克斯韦方程组,在特定的粒子形状和大小等边界条件的约束下,可求解球形散射粒子,得到任意粒径、任意成分的均质球形粒子的散射光强的角分布<sup>[8]</sup>。

根据 Mie 散射理论<sup>[8]</sup>,当波长为  $\lambda$ ,强度为  $I_0$  的平面线偏振光沿  $z$  轴正向传播,电场振动方向与  $x$  轴平行。球形散射颗粒(坐标原点)的直径为  $d$ ,相对折射率为  $m$ 。则散射光场某点  $P$  的散射光强可写为:

$$I(r, \theta, \varphi) = \frac{\lambda^2 I_0}{4\pi^2 r^2} [i_1(\theta) \sin^2 \varphi + i_2(\theta) \cos^2 \varphi], \quad (1)$$

式中: $r$ 为点  $P$  与散射颗粒的距离; $\theta$ 为散射角;

$i_1(\theta)$  和  $i_2(\theta)$  称为散射强度函数, 分别表示平行与垂直于散射面(由  $r$  和  $z$  定义的平面)的强度分量, 可用散射振幅函数分别表示为:

$$i_1(\theta) = |S_1(\theta)|^2 = \left| \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{a_n \pi_n(\cos \theta) + b_n \tau_n(\cos \theta)\} \right|^2, \quad (2)$$

$$i_2(\theta) = |S_2(\theta)|^2 = \left| \sum_{n=1}^{\infty} \frac{2n+1}{n(n+1)} \{a_n \tau_n(\cos \theta) + b_n \pi_n(\cos \theta)\} \right|^2, \quad (3)$$

式中:  $a_n, b_n$  为 Mie 散射系数。

选取  $90^\circ$  侧向散射光作为观测对象可以避免激发光源的直射光干扰。同时, 去除传统显微图像采集的背景光源, 从而减小背景光信息并提高图像的对比度。当微球经过流动室激光激发区域时, 通过改变高速相机的曝光时间可以采集微球的拖尾图像, 进而获得微球的流速。基于  $90^\circ$  Mie 散射的高速图像采集微球测速原理如图 1 所示。

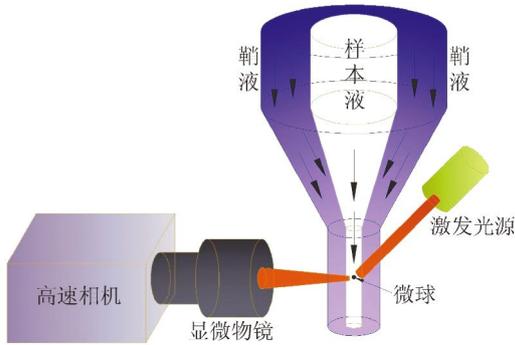


图 1 高速图像采集微球测速原理图

Fig. 1 Schematic diagram of high-speed particle image velocimetry

## 2.2 微球拖尾图像特性分析

由于流式细胞仪每秒钟可以对数万个细胞进行检测, 同时高速相机的曝光瞬间微球在流动室内的位置具有随机性, 所以采集到的微球拖尾图像一般包括空白、正常、光强/长度不足、衍射和重叠 5 种情况。其中, 空白图像不包含任何微球拖尾信息, 故未列出。其余 4 种情况如图 2 所示。

从图 2 可以看出, 正常图像中拖尾横向相对集中, 并且纵向亮度相对无变化; 衍射图像中, 横向存在扩散, 纵向亮度相对无变化; 不足图像中,

横向有扩散的可能性, 纵向亮度有明显变化, 并且拖尾长度不足; 重叠图像中, 多个拖尾存在横向或纵向的重叠。

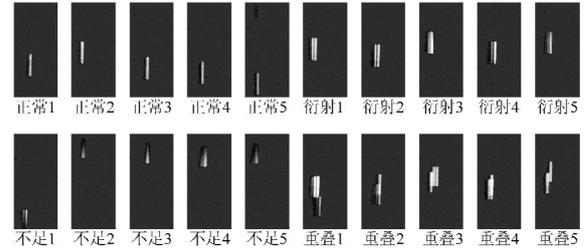


图 2 微球拖尾图像

Fig. 2 Particle trailing images

为了更加准确地评估微球的速度变化, 本文采取延长图像采集时间的方法, 以获取尽量多的图像。同时, 根据各类图像的特点, 选取合适的分类指标及聚类分析算法可以实现对各类微球拖尾图像的聚类分析, 最后进行统计学分析。

## 2.3 灰色聚类分析算法

微球图像聚类分析属于多指标综合评价的范畴, 考虑到拖尾图像的分析 and 评价具有一定的模糊性和不确定性, 而且根据图像灰度差异确定的聚类指标具有意义不同、量纲不同, 且数量上差异大等特点, 因此本文采用灰色定权聚类法进行相应的评价和分类。

灰色聚类分析法依据白化权函数, 将聚类对象对不同的聚类指标所拥有的白化值, 按  $N$  个灰类进行归纳整理, 通过计算所有指标的综合效果, 判断聚类对象所属类型<sup>[9-12]</sup>。在本文中, 聚类对象是微球拖尾图像, 4 个灰类分别是正常、拖尾、重叠和衍射。聚类指标是横向宽度 ( $I_1$ )、横向极值点个数 ( $I_2$ ); 纵向宽度 ( $I_3$ )、纵向交点个数 ( $I_4$ ), 并且采用梯形白化权函数, 其公式如下:

$$f_j^k(x) = \begin{cases} 0, & x \notin [\lambda_{k-1}, \lambda_{k+1}] \\ \frac{x - \lambda_{k-1}}{\lambda_k - \lambda_{k-1}}, & x \in (\lambda_{k-1}, \lambda_k] \\ 1, & x \in [\lambda_k, \lambda_l] \\ \frac{\lambda_{l+1} - x}{\lambda_{l+1} - \lambda_l}, & x \in (\lambda_l, \lambda_{l+1}) \end{cases} \quad (4)$$

由聚类对象属于灰类  $k$  ( $k=1, 2, \dots, s$ ) 的隶属度  $f_j^k(x)$ , 可得  $i$  ( $i=1, 2, \dots, n$ ) 关于灰类  $k$  的综合聚类系数:

$$\alpha_i^k = \sum_{j=1}^m f_j^k(x_{ij}) \cdot \eta_j, \quad (5)$$

其中:  $f_j^k(x_{ij})$  为  $j$  指标  $k$  子类白化权函数,  $\eta_j$  为指标  $j$  在综合聚类中的权重。最后,由  $\max_{1 \leq k \leq s} \{\sigma_i^k\} = \sigma_i^{k^*}$ , 判断微球图像  $i$  所属灰类  $k^*$ 。

### 3 实验及数据分析

基于上述理论分析,搭建了基于  $90^\circ$  Mie 散射的高速图像采集微球测速系统,如图 3 所示。

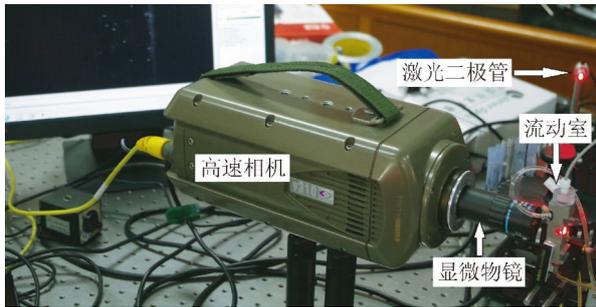


图 3 高速图像采集微球测速实验系统

Fig. 3 Experimental system for measurement of micro particle velocity with high-speed image acquisition

流动室及液路驱动系统利用美国 Beckman Coulter 公司的流式细胞仪 FC500, 细胞检测速度约为 3 万个/秒。激发光选用波长为 605 nm 的激光二极管, 功率为 80 mW。显微物镜为日本 Sigma Koki 公司的 SPAHL-50, 数值孔径为 0.42, 放大倍率为 50, 工作距离为 20.5 mm。图像采集系统使用 Dantec 公司的 Q450 高速图像采集系统, 配套的高速 CMOS 相机为 Vision Research 公司的 V310, 最大分辨率为  $1\ 280 \times 800$ , 最高速度为  $5 \times 10^5$  frame/s, 最小快门时间为  $1\ \mu\text{s}$ , 单个像素点的几何尺寸为  $20\ \mu\text{m} \times 20\ \mu\text{m}$ 。检测样品使用 Beckman Coulter 公司的标准质控微球 Flow-Check Pro Fluoro-spheres A69183, 微球直径为  $(20 \pm 1)\ \mu\text{m}$ 。曝光时间设置为  $40\ \mu\text{s}$ , 利用 FC500 执行上样操作。层流状态稳定后开始进行图像采集, 采样帧率设置为 3 300 frame/s, 采样图片总数设置为 8 000。

#### 3.1 分类指标及白化权函数

灰色聚类分析根据观测对象的多个特征指标进行分类, 将多指标决策问题转换为单一指标决策问题。为了系统、综合、直观地评价观测对象, 从采样获取的 8 000 幅图像中选取不足、正常、衍

射、重叠图片各 10 幅, 进行特征分析并确定特征指标及指标权值<sup>[13]</sup>。分别对 4 类图像中每一行像素点的灰度值求和, 得到横向灰度总和曲线如图 4 所示。

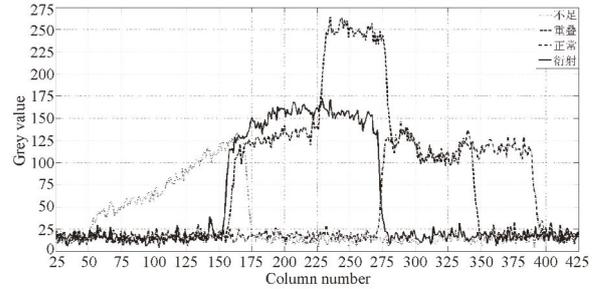


图 4 横向灰度总和曲线

Fig. 4 Grey value summation of column pixels

如图 4 所示, 设定灰度阈值为 35, 统计灰度值大于阈值的行的个数作为聚类分析的指标。不足灰类由于在纵向存在灰度值渐变过程, 其横向灰度总和曲线中上升沿为缓慢变化; 正常与衍射灰类均无纵向灰度渐变过程, 故上升沿及下降沿变化较快; 重叠灰类在纵向无渐变过程, 但存在多条拖尾重叠的现象, 故其上升沿与下降沿个数均大于 1。对图 4 中曲线求解一阶导数, 结果如图 5 所示。

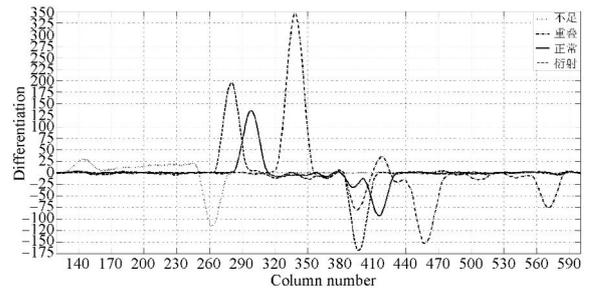


图 5 横向灰度总和导数

Fig. 5 Differentiation of grey value summation of column pixels

如图 5 所示, 设定正向阈值为 55, 负向阈值为 -50, 统计阈值范围内的极值点个数。即当极值点的幅值大于 55 或小于 -50 时, 统计有效极值点。不足、正常、衍射、重叠的有效极值点个数分别为 1, 2, 2, 4。有效极值点个数可作为聚类分析的指标。

如果不足灰类的拖尾长度严重不足或灰度值

不足,可能造成有效极值点个数为 0。重叠灰类有多种可能性,并且重叠灰类的拖尾数量、重叠位置、重叠方式等不确定,其有效极值点个数可以是大于 2 的其他整数。

同理,分别对 4 类图像中每一列像素点的灰度值求和,得到纵向灰度总和曲线如图 6 所示。

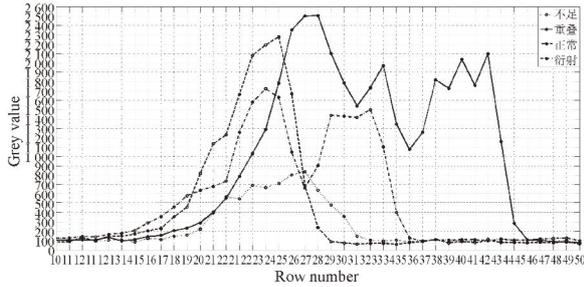


图 6 纵向灰度总和曲线

Fig. 6 Grey value summation of row pixels

设定灰度阈值为 200,统计阈值以上列的个数作为聚类分析的指标。不足灰类由于在纵向存在灰度值渐变过程,其纵向灰度总和的峰值较小;衍射灰类存在横向灰度渐变过程,故灰度值不为 0 的列数较多;重叠灰类在纵向完全重叠的几率较低,故灰度值不为 0 的列数比正常情况要多。对图 6 中曲线求解一阶导数,结果如图 7 所示。

如图 7 所示,设定正向阈值为 150,负向阈值为 -250,并统计曲线经过正负阈值的次数。正常

灰类的拖尾图像灰度分布相对均匀,故其纵向灰度总和的一阶导数曲线具有单调增减特性,在正负阈值附近不存在抖动,与正负阈值的交点为 4 个。不足、衍射和重叠灰类的拖尾图像灰度分布存在渐变或跳变,在正负阈值附近存在抖动,故交点数不小于 4。与正负阈值的交点个数可作为聚类分析的指标。

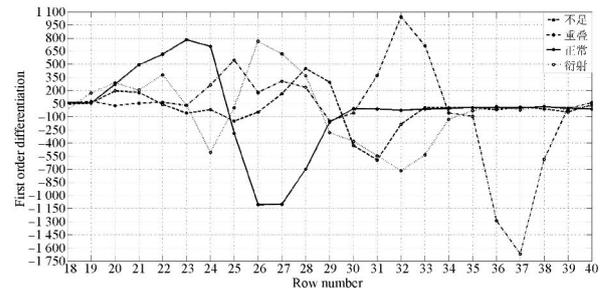


图 7 纵向灰度总和导数

Fig. 7 Differentiation of grey value summation of row pixels

综上所述,确定灰色聚类分析的指标为:横向宽度( $I_1$ )、横向极值点个数( $I_2$ )和纵向宽度( $I_3$ )、纵向交点个数( $I_4$ )。

选取不足、正常、衍射和重叠 4 类图像各 10 幅,并对选定的 4 个指标参数进行计算,从而确定各指标的分布范围。得到的灰色聚类指标如表 1 所示。

表 1 灰色聚类指标

Tab. 1 Criteria of grey clustering

序号	空白/不足				正常				衍射				重叠			
	$I_1$	$I_2$	$I_3$	$I_4$												
1	18	6	116	1	17	4	121	2	22	12	123	2	30	12	238	5
2	13	4	103	1	16	4	121	2	24	10	121	2	26	8	181	4
3	13	4	115	1	15	4	120	2	22	10	122	2	27	12	156	4
4	20	8	121	1	14	4	120	2	24	8	123	2	28	6	150	6
5	19	6	115	1	15	4	122	2	21	8	120	2	23	8	189	4
6	8	4	49	0	15	4	120	2	16	8	120	2	27	10	216	4
7	19	6	119	1	16	4	121	2	23	12	121	2	18	6	230	3
8	21	4	114	1	14	4	121	2	20	12	122	2	29	8	241	4
9	14	4	114	1	13	4	118	2	25	6	122	2	24	10	208	3
10	15	4	68	0	21	4	125	2	22	8	122	2	35	16	197	4

根据表 1 中各灰类的各个指标分布范围可确定灰色聚类指标范围,如表 2 所示。

表 2 灰色聚类指标范围

Tab.2 Range of grey clustering criteria

灰类	$I_1$	$I_2$	$I_3$	$I_4$
空白/不足	[5,20]	[4,8]	[50,120]	0 或 1
正常	[10,20]	4	[115,125]	2
衍射	[15,25]	[6,12]	[120,125]	2
重叠	[25,30]	[6,12]	>150	$\geq 3$

由表 2 可知,聚类指标横向宽度( $I_1$ )、纵向宽度( $I_3$ )覆盖一定的范围,并且各灰类的相应指标在一定范围内存在交叠。利用式(4)计算横向宽度、纵向宽度相应的梯形白化权函数,结果分别如图 8、图 9 所示。

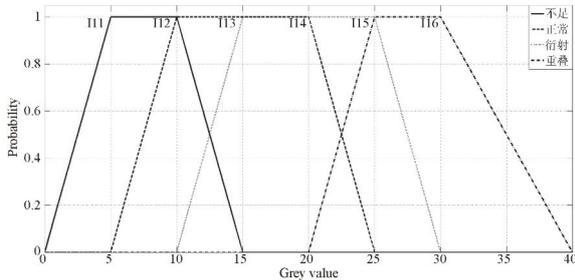


图 8 横向宽度梯形白化权函数

Fig. 8 Trapezoid whitening weight function of horizontal width

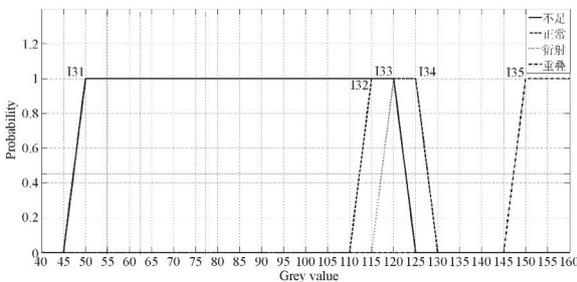


图 9 纵向宽度梯形白化权函数

Fig. 9 Trapezoid whitening weight function of longitudinal width

由于聚类指标的意义、量纲不同且在数量上悬殊较大,需采用灰色定权聚类,即对各聚类指标事先赋权来调节各指标在各灰类中的比例。利用得到的权值后对各维特征进行加权并进行聚类分析,得到最后的聚类分析结果<sup>[14-16]</sup>。本文根据各类微球图像的特点设定指标权值,如表 3 所示。

表 3 参数权值

Tab.3 Weights of criteria

灰类	指标权值			
	$I_1$	$I_2$	$I_3$	$I_4$
空白/不足	0.2	0.1	0.2	0.5
正常	0.3	0.1	0.3	0.3
衍射	0.2	0.3	0.2	0.3
重叠	0.1	0.1	0.6	0.2

不足灰类的特点是拖尾长度较小,纵向宽度及纵向交点个数两个指标与其他灰类有明显区别,因此权值分别设为 0.2 和 0.5。正常灰类的各指标权重相对平均,分别设定为 0.3,0.1,0.3 和 0.3。衍射灰类的特点是存在多条平行拖尾,横向存在扩散,纵向特征与正常灰类相近,所以各权值分别设为 0.2,0.3,0.2 和 0.3。重叠灰类的特点是多个拖尾存在横向或纵向的重叠,其纵向宽度指标明显区别于其他灰类,故设定为 0.6,其他权值分别设置为 0.1,0.1 和 0.2。

为了验证本文的灰色聚类算法,从 4 类图像中各选取 10 幅进行灰色聚类系数计算,结果如表 4 所示。从表中看出,该灰色聚类分析算法能够对 40 幅图像进行正确分类,从而验证了本文灰类指标、指标范围、指标权值和梯形白化函数选取的合理性。

### 3.2 分类结果

基于上述设计及分析,本文对高速图像采集系统获取的 80 00 幅图像进行了灰色聚类分析,分类统计结果如表 5 所示。

表 4 聚类系数

Tab. 4 Clustering coefficients

序号	空白/不足				正常				衍射				重叠			
	空白/不足	正常	衍射	重叠												
1	0.74	0.37	0.70	0.31	0.29	0.93	0.79	0.25	0.29	0.49	0.91	0.55	0.29	0.10	0.28	0.99
2	0.77	0.45	0.16	0.19	0.29	0.96	0.79	0.19	0.29	0.45	0.97	0.67	0.29	0.10	0.34	0.98
3	0.77	0.52	0.37	0.19	0.29	0.99	0.82	0.13	0.29	0.50	0.94	0.55	0.29	0.10	0.32	0.99
4	0.74	0.30	0.70	0.43	0.29	0.82	0.64	0.19	0.29	0.43	0.91	0.67	0.29	0.10	0.3	0.91
5	0.74	0.34	0.70	0.37	0.29	0.98	0.76	0.13	0.29	0.55	0.99	0.49	0.29	0.13	0.46	0.88
6	0.98	0.58	0.10	0.19	0.29	0.98	0.82	0.13	0.29	0.70	1.00	0.19	0.29	0.10	0.32	0.99
7	0.74	0.34	0.70	0.37	0.29	0.96	0.79	0.19	0.29	0.48	0.97	0.61	0.29	0.55	0.28	0.78
8	0.74	0.55	0.55	0.49	0.29	0.82	0.64	0.19	0.29	0.56	0.94	0.43	0.29	0.10	0.28	0.98
9	0.74	0.55	0.37	0.19	0.32	0.79	0.64	0.19	0.29	0.44	0.84	0.73	0.29	0.37	0.73	0.76
10	0.74	0.64	0.28	0.13	0.29	0.77	0.67	0.49	0.29	0.50	0.94	0.55	0.29	0.10	0.28	0.70

表 5 分类统计结果

Tab. 5 Statistical results of clustering

空白/不足		正常		衍射		重叠	
聚类分析	真值	聚类分析	真值	聚类分析	真值	聚类分析	真值
3 779	3 779	561	561	1 738	1 738	1 922	1 922

如表 5 所示,本文方法能够准确区分各灰类图像。同时可以看出,正常灰类的图像只有 561 幅,仅占全部图像数量的 7%。利用本文灰色聚类分析算法可以快速准确地挑选正常图像,从而减小高速微粒图像测速后期数据处理的工作量,提高液路系统稳定性的评估效率。

### 3.3 边界确定

微球速度由公式  $v = \frac{l}{t}$  求得,其中  $l$  为微球拖尾长度,  $t$  为相机曝光时间。为了准确评估液路系统的稳定性,需要分析拖尾灰度值的上升和下降过程,合理选择拖尾边界,减小微球拖尾长度的计算误差。

对正常图像的灰度值进行列求和,并以灰度值总和和最大值为中心对称选择 5 列像素点,这 5 列像素点灰度值的上升过程如图 10 所示。

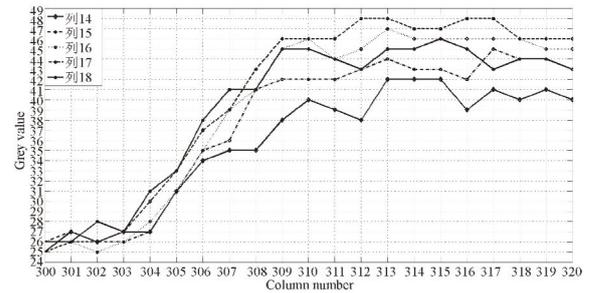


图 10 列元素灰度值上升沿

Fig. 10 Rising edges of grey values of column elements

从图 10 可以看出,这 5 列元素的灰度值在第 303 行之前只有微小抖动,基本保持平稳;从第 304 列到第 309 列,灰度值快速上升,并呈线性变化。同理,5 列像素点灰度值的下降过程如图 11 所示。

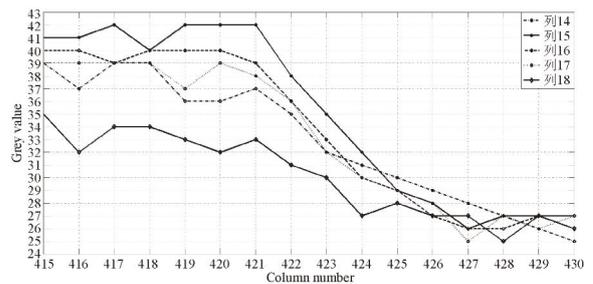


图 11 列元素灰度值下降沿

Fig. 11 Falling edges of grey values of column elements

选取的5列像素点灰度值在第420列之前基本保持平稳,从第421列到第428列灰度值快速下降,并呈线性变化。基于各列像素点灰度值快速线性变化的特性,本文选用中点法确定拖尾边界。

中点法是指选取灰度值与边缘变化过程的平均值最接近的像素点作为拖尾边界。以图10、图11为例,上升过程5列像素点的灰度平均值为36.5,36.5,34,33.1和35,与第307行像素点的灰度值(38,37,35,34和35)最接近,故将第307行作为拖尾的起始边界点;下降过程5列像素点的灰度平均值为33.2,31.7,31.2,31.4和27.4与第424行像素点的灰度值(32,30,30,31和27)最接近,故将第424行作为拖尾的终结点。

利用中点法确定561幅正常图像的拖尾边界,计算拖尾长度所占像素点个数的平均值为116.9,由公式  $\sigma = \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}$  计算标准差  $\sigma=1.7$ 。由于无法获取流动室内微球速度的真值,故可利用拖尾长度的平均值表征微球速

度,并利用拖尾长度的标准差评估微球速度的稳定性,进而完成对流式细胞仪液路系统稳定性的评估。

## 4 结 论

本文利用基于90°Mie散射的高速图像采集微球测速方法对微球经过流动室时的拖尾图像进行了连续高速采集,获得大量拖尾图像。利用基于梯形白化权函数的灰色聚类方法对不足、正常、衍射和重叠4种灰类图像进行有效区分,并利用中点法对正常图像的拖尾进行边界确定,提高了拖尾长度的计算精度。最后,对采集到的所有正常图像进行了统计学分析。实验结果表明,本文方法可以获得清晰的微球拖尾图像,并可实现图像的准确分类。本实验系统测得的拖尾长度所占像素点个数的平均值为116.9,标准差  $\sigma=1.7$ ,利用该标准差可以合理准确地评估流式细胞仪液路的稳定性。

## 参考文献:

- [1] 赵书涛. 单激光四通道流式分析仪的系统设计及性能测试方法研究[D]. 北京:中国科学院研究生院,2012.  
ZHAO SH T. *Study of the System Design and Methods for Measuring Performance of the Single-laser Four-channel Flow Cytometer* [D]. Beijing: Graduate University of Chinese Academy of Sciences, 2012. (in Chinese)
- [2] 张宇. 散射成像式流式细胞仪液流系统设计与探究研究[D]. 天津:天津大学,2012.  
ZHANG Y. *Study of the Fluid System Design of The diffraction Imaging Flow Cytometer* [D]. Tianjin: Tianjin University, 2012. (in Chinese)
- [3] HO-CHENG L, HUI-HSING H, RURY-JEN Y, *et al.*. Microflow cytometer incorporating sequential micro-weir structure for three-dimensional focusing [J]. *Microfluid Nanofluid*, 2011, 11: 469-478.
- [4] GWO-BIN L, CHEN-I H, BIN-JO K, *et al.*. Hydrodynamic focusing for a micromachined flow cytometer [J]. *Journal of Fluids Engineering*, 2001, 123(9): 672-679.
- [5] AN-SHIK Y, WEN-HSIN H. Hydrodynamic focusing investigation in a micro-flow cytometer [J].

*Biomed Microdevices*, 2007, 9:113-122.

- [6] BAUMGARTH N, ROEDERER M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping [J]. *Immunol. Methods*, 2000, 243(1/2):77-97.
- [7] HUI-HSIUNG H, CHIEN-HSIUNG T, LUNG-MING F, *et al.*. Experimental and numerical investigation into micro-flow cytometer with 3-D hydrodynamic focusing effect and micro-weir structure [J]. *Electrophoresis*, 2009, 30:2507-2515.
- [8] YE Y, ZHEN X Z, XINHUI Y, *et al.*. Blood cell counting and classification by nonflowing laser scattering method [J]. *Journal of Biomedical Optics*, 2004, 9(5):995-1001.
- [9] 肖功海,杨皓旻,舒嵘,等. 显微高光谱成像系统的设计[J]. *光学精密工程*, 2004, 12(4): 367-372.  
XIAO G H, YANG H M, SHU R, *et al.*. Design of microscopic hyperspectral imaging system [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2004, 12(4): 367-372. (in Chinese)
- [10] 张文昌,祝连庆,姜小平,等. 基于灰色预测恢复算法的流式细胞仪多参数提取[J]. *仪器仪表学报*, 2015, 36(7):1660-1665.  
ZHANG W CH, ZHU L Q, LOU X P, *et al.*. Multi-parameter extraction of flow cytometer based on grey prediction recovery algorithm [J]. *Chinese*

- Journal of Scientific Instrument*, 2015, 36(7): 1660-1665. (in Chinese)
- [11] 张仁杰, 庄松林, 臧道青. 基于聚类分析与支持向量机模型的缸盖座圈图像辨别[J]. 光学精密工程, 2011, 19(10): 2478-2484.  
ZHANG R J, ZHUANG S L, ZANG D Q. Estimation of gap width of cylinder socket sleeve based on clustering analysis and SVM [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2011, 19(10): 2478-2484. (in Chinese)
- [12] HSU K-T. Using a back propagation network combined with grey clustering to forecast policy-holder decision to purchase investment-linked insurance [J]. *Expert Systems with Applications*, 2011, 38: 6736-6747.
- [13] 杨晓敏, 吴炜, 卿颢波, 等. 图像特征点提取及匹配技术[J]. 光学精密工程, 2009, 17(9): 2276-2282  
YANG X M, WU W, QING L B, *et al.*. Image feature extraction and matching technology [J]. *Opt. Precision Eng.*, 2009, 17(9): 2276-2282. (in Chinese)
- [14] LIU S F. *Grey Systems Theory and Applications* [M]. Springer, 2010: 51-63.
- [15] 常海涛, 祝连庆, 姜小平, 等. 一种全自动酶免分析仪移液过程评估新方法[J]. 仪器仪表学报, 2014, 35(7): 1622-1629.  
CHANG H T, ZHU L Q, LOU X P, *et al.*. New method of evaluating the pipetting of automatic ELISA system [J]. *Chinese Journal of Scientific Instrument*, 2014, 35(7): 1622-1629. (in Chinese)
- [16] CHEN H ZH, PAN T, CHEN J M, *et al.*. Waveband selection for NIR spectroscopy analysis of soil organic matter based on SG smoothing and MWPLS methods [J]. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems*, 2011, 107: 139-146.

## 作者简介:



张文昌(1987—),男,山东曲阜人,博士研究生,2013年于北京信息科技大学获得硕士学位,主要从事生物医学检测技术及仪器方面的研究。E-mail: baomuay007@126.com

## 通讯作者:



祝连庆(1963—),男,浙江兰溪人,教授,博士生导师,主要从事生物医学检测技术与仪器、光电精密测试技术和光纤传感与激光器等方面的研究。E-mail: zhulianqing@sina.com