

文章编号: 0258-7025(2006)08-1097-07

双波长激光共聚焦生物芯片检测与图像处理

付东翔^{1,2}, 陈家璧¹, 马军山¹, 侯琳琳¹

(上海理工大学¹ 光学与电子信息学院, ² 计算机工程学院, 上海 200093)

摘要 基于共聚焦检测原理,建立了双波长生物芯片检测系统。采用体全息滤光片,利用其反射衍射和带阻滤光特性,无需切换或改变光路,在同一光路中即可实现 Cy3 与 Cy5 荧光双波长扫描检测。提出了基于顺序形态变换的生物芯片荧光点阵图像的网格化处理方法,并对 Cy3 与 Cy5 荧光试剂点样玻片进行了扫描实验,对实验所得荧光点阵图像进行了网格化处理。实验结果显示,系统的检测灵敏度达到 $0.1 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$, 网格化算法简单、有效。

关键词 测量;图像处理;生物芯片检测;体全息;网格化

中图分类号 TN 247;TP 391 **文献标识码** A

Two-Wavelength Laser Confocal Scanning System for Microarray and Image Processing

FU Dong-xiang^{1,2}, CHEN Jia-bi¹, MA Jun-shan¹, HOU Lin-lin¹

(¹Optics and Electronics Information Institute, ²Computer Engineering Institute,
University of Shanghai for Science and Technology, Shanghai 200093, China)

Abstract A dual-wavelength microarray scanner based on laser confocal principle is constructed to detect two-color (Cy3/Cy5) fluorescence. Volume holographic filters are employed. It is not necessary to switch filters when samples tagged with Cy3 and Cy5 are scanned because of diffraction and band elimination property of volume holographic filter. Filter and gridding of microarray images based on order morphological methods are presented. Experimental result shows that sensitivity of the system is $0.1 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$. The gridding algorithm is simple and effective.

Key words measurement; image processing; microarray scanning; volume holographic; gridding

1 引 言

生物芯片技术是 20 世纪末产生的一项新技术。在样品与探针杂交后,采用单、双或多荧光(针对 Cy3/Cy5/其他染色剂)检测系统对生物芯片表面扫描,接收成荧光点阵图像,图像荧光点强度则代表了对相应基因表达的一种测量^[1]。目前生物芯片的荧光检测方法主要有:CCD 成像检测和激光共聚焦扫描成像检测,以及采用光纤传感器检测等^[2,3]。目前光纤传感器检测处于研究和发展中,激光共聚焦扫描检测系统比 CCD 检测具有更高的分辨率和

灵敏度,已成为高密度生物芯片的主要检测方式。多荧光检测是同一生物芯片同时用多种荧光标记,而检测系统具备对多荧光的检测能力,通过对采集数据的归一化处理来提高芯片检测的重复性和可靠性^[4]。

荧光扫描测量的典型光学结构有:1) 二色镜和窄带干涉滤光片构成光学系统,采用 $x-y$ 二维机械扫描方式,其结构简单,光轴方向与扫描方向始终垂直,像差校正简单,扫描速度较慢,二色镜和窄带干涉滤光片价格昂贵,系统成本较高。2) 扫描振镜、

收稿日期:2005-12-16;收到修改稿日期:2006-02-20

基金项目:国家 973 计划(2005CB724300),上海市教委重点(05ZZ26),上海市重点学科建设项目(T0501)和上海市教委青年基金(05EZ46)资助课题。

作者简介:付东翔(1971—),男,辽宁沈阳人,上海理工大学光学与电子信息学院博士研究生,主要从事光电精密测试技术的研究。E-mail:fudx@usst.edu.cn

导师简介:陈家璧(1946—),男,江苏南京人,教授,博士生导师,主要从事光电精密测量、信息光学与通信、全息散斑干涉术等方面的研究。E-mail:jbchenk@online.sh.cn

f - θ 物镜和滤光片构成光学系统,在 x - y 二维方向上进行振镜扫描,扫描速度较高,但扫描振镜和 f - θ 物镜结构和控制较复杂,该结构对扫描运动产生的震动敏感,因而要求有高精密的防震措施,系统成本也较高。3) 机械扫描与振镜扫描相结合的系统:在一个方向上进行机械扫描,另一方向上进行振镜扫描。以上结构每增加一种测定荧光便要在光路中增加激光器、光电倍增管(PMT)、二色镜、滤光片和聚光透镜等器件,费用较高,结构复杂,且光路一旦固定则不能更改。

荧光图像强度代表了相应基因表达的测量信息,要正确识别图像中荧光点,区分光斑像素和背景像素,提取荧光区数据,还需进行图像滤波、网格化等工作^[5];滤波去除杂散光等造成的噪声;网格化使每个荧光点被一个方格包围,通过对图像上荧光点的网格划分实现光斑与背景的分隔,网格化结果直接决定了荧光数据提取、分析的准确性。

本文提出了采用体全息滤光片建立针对 Cy3 与 Cy5 荧光进行检测的双波长激光共聚焦生物芯片检测系统,利用体全息滤光片独特的波长选择性和衍射特性,在同一光路中实现对两种荧光的扫描成像,无需切换滤光片或改变光路。同时还提出一种基于顺序形态变换的生物芯片荧光点阵图像的滤波、网格化方法,与常规数学形态学方法相比,运算简单、有效^[6];进行了相关实验研究,获得了 Cy3, Cy5 试剂点样的荧光图像,数据分析表明系统检测灵敏度达到 $0.1 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$ 。

表 2 窄带带阻全息滤光片光学特性

Table 2 Parameters of spike cut-off holographic filter

Filter	Central wavelength λ /nm	FWHM $\Delta\lambda$ /nm	Central wavelength diffracting efficiency	Incidence θ_i /($^\circ$)
Holographic filter 1	532	27	>90%	23
Holographic filter 2	633	30	>90%	22
Holographic filter 3	532	18	>90%	10
Holographic filter 4	633	30	>90%	4

滤光片和二色镜这两个光学元件。根据系统采用的两种激光器的波长,这里选择两种中心波长分别为 532 nm, 633 nm 的全息滤光片,具体参数见表 2 和图 1。

当指定波长的激光束以入射角 θ_i 入射到滤光片时,90% 以上的衍射光被反射衍射回来;当指定波长的激光束以 0° 入射角正入射到滤光片时,滤光片此时表现为带阻特性,指定中心波长光及其带宽范

2 测量原理与系统结构

2.1 测量原理

基于激光共聚焦原理构建的生物芯片检测系统对芯片逐点扫描,芯片放置在焦平面上,被激光光源聚焦照射。当荧光物质(Cy3, Cy5 等)被强光照射时,会产生不同于激发光波长的荧光,荧光的波长比激发光波长长——斯托克斯位移(如表 1 所示)。短波长激发光对荧光物质有漂白作用,所以要选用激发波长较长、斯托克斯位移较大的荧光物质标记生物芯片, Cy3 和 Cy5 符合上述条件。这样荧光信号较激发光、杂散光、背景光等的波长有较大的差异,有利于提高信噪比(SNR)。系统采用滤光片滤除其他杂散光,接收荧光成像。

表 1 Cy3/ Cy5 吸收峰值和发射峰值

Table 1 Absorption and emission peaks of Cy3/ Cy5

Excited laser wavelength / nm	Fluorescence	Absorption wavelength / nm	Emission wavelength / nm
532 (green)	Cy3	552	568
632.8 (red)	Cy5	650	667

2.2 体全息滤光片

体全息滤光片是利用体积反射全息的波长选择性制成的一种新型滤光片,其带宽窄,单峰性好。反射全息滤光片对于反射衍射光表现为带通滤光片,对于透射光表现为带阻滤光片,其作用相当于窄带

围内波长的光不能通过,其他波长的光则能通过。如 HF-2 (Holographic Filter 2) 在选定的入射角 22° , 对 633 nm 的激光衍射效率大于 90%, 透过率为 8×10^{-5} , 带宽为 37 nm。

2.3 体全息滤光片构成的双波长共聚焦测量系统

采用体全息滤光片的测量系统能实现多荧光的光路共用扫描成像,结构如图 2 所示。

系统由光源、滤光片、物镜、光电倍增管、二维精

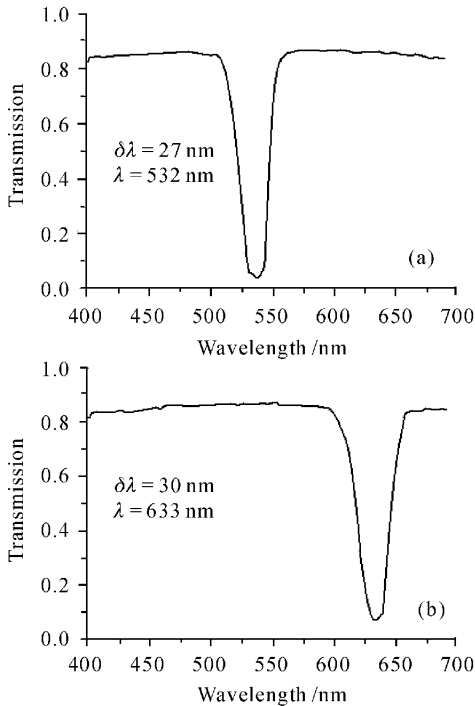


图 1 窄带全息滤光片透过率曲线

Fig. 1 Holographic filter transmission curves (a) HF-1; (b) HF-2

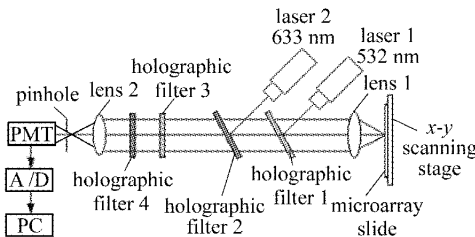


图 2 全息滤光片组成的激光共聚焦测量系统结构图
Fig. 2 Structure of laser confocal measure system with holographic filter

密机械电动平台、数据采集卡和计算机组成，系统光源选用波长为 532 nm 的半导体激光器（绿光）和波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光器（红光），功率均为 5 mW，并采用 4 片体全息反射滤光片，以及 *x-y* 二维机械平移式的扫描方式。

以 Cy3 检测为例介绍其工作原理：532 nm 激光器发射的激光经准直后，入射到窄带带阻全息滤光片 HF-1，被反射衍射至物镜 1，再聚焦到生物芯片表面以激发荧光物质 Cy3；被激发的 Cy3 荧光和被生物芯片表面反射的部分激发光被物镜 1 收集后又返回 HF-1，这时其带阻特性相当于窄带干涉滤光片，将其中的激发光滤除，荧光则能通过 HF-1，入射到 HF-2；对中心波长为 633 nm 的带阻滤光片

HF-2 而言，533 nm 的荧光能够通过，再以 0° 入射角正入射到滤光片 HF-3，荧光通过 HF-3 后激发光所造成的系统背景噪声被进一步滤除；与 HF-2 一样，荧光能通过 HF-4 到达物镜 2；荧光信号经过物镜 2 后被聚焦，到达位于物镜 2 焦点处的针孔，针孔滤除非焦点平面所反射过来的激发光及其他杂散光。同理，Cy5 的测量是 He-Ne 激光由 HF-2 衍射进入测量光路，被激发的 Cy5 荧光依次通过 HF-1，HF-2，HF-3，HF-4；其中 HF-2，HF-4 进一步滤除散射的激发光。针孔后的光电倍增管将荧光信号转换成电信号并放大，数据采集卡将其转换为数字信号并输入计算机成像。HF-1,3/ HF-2,4 两组滤光片协同工作，滤除激光，通过荧光。由于滤光片的带阻特性，两种不同波长的被激发荧光在同一光路中能随时通过，不需要切换滤光片，简化了系统结构。另外，系统这一特点还能对二色荧光同时采集、成像：两个激光光源同时打开，568 nm, 667 nm 两种不同波长的荧光被激发，两种带阻滤光片的中心波长分别为激光波长，同时滤光片的带宽很窄，因此激光被阻挡，荧光通过，同一探测器能接收到两种荧光信号，双色荧光能在同一幅图像中成像，双色荧光图像数据可以为 Cy3, Cy5 单色荧光图像数据分析提供荧光点归一化校正数据^[7]。

3 荧光点阵图像处理

3.1 顺序形态变换

对数字图像 $f(x)$ 和结构元素 B ，有以下论述^[8]：

$f(x)$ 在 B 上的 d 阶顺序量定义记为 $\text{ord}\{d; f | B\} \triangleq f(x_d^*)$, $d = 1, 2, \dots, k$, d 称为顺序形态变换的阶数。这种排序运算的定义如下：

设 $f(x, y)$ 为定义在两维离散空间 $Z^{(2)}$ 上的灰度图像, $0 \leq f(x, y) \leq M$; 结构元素 B 为 $Z^{(2)}$ 上的有限子集, $0 < \mu(B) = k < +\infty$ (测度 $\mu(\cdot)$ 为点计数); 设 $x \triangleq (x, y) \in Z^{(2)}$, $B = \{x_1, x_2, \dots, x_k\}$, $f(x)$ 在 B 上的 k 个值依次从小到大排列: $f(x_1^*) \leq f(x_2^*) \leq \dots \leq f(x_k^*)$. 在此定义顺序量的基础上, 定义数字图像 $f(x)$ 关于结构元素 B 的顺序形态变换, 记 $f \textcircled{D} B$:

$$(f \textcircled{D} B)(x) = \text{ord}\{(k-1)p + 1; f | \check{B}_x\}, p = 0, 1/(k-1), \dots, 1. \text{ 即定义为图像 } f \text{ 在 } B \text{ 上的 } (k-1)p + 1 \text{ 阶顺序量, } p \text{ 称为百分位. 令 } d = (k-1)p + 1, \text{ 则对应百分位 } p = 0, 1/(k-1), \dots, 1. \check{B}_x = \{x -$$

$b; b \in B$), 如果结构元素 B 关于原点对称, 则 $B = \check{B}_x$ 。

顺序形态运算的特点是能随着百分位值 p (或阶数 d) 的平滑变化, 在结构元素 B 内实现不同灰度的变换如极小值($p = 0$), 中值($p = 1/2$), 极大值($p = 1$) 等运算。

某一维信号 $X(x)$, 见图 3(a), x 表示一维位置信息, $X(x)$ 表示 x 处的信号强度, 其中的谷峰范围对应了信号区域, 谷底区域对应了背景。对 $X(x)$ 作顺序形态变换运算

$$X \circledast B_{1 \times h}$$

$p = 1/2$ 时, 实现中值运算, $B_{1 \times h}$ 为水平线段, 关于原点对称, 长度为 h , 为了在局部范围内平滑信号, h 应不大于 $X(x)$ 上单个谷峰(即信号) 范围 L 的一半, 这里 L 的平均值为 10, 取值 $h = 3$ 。 $p = 0$ 时, 实现极小值运算, 结构元素 $B_{1 \times h}$ 同样为直线, 关于原

点对称, 极小值运算将所有的局部最小值(谷底) 扩展为长度 h 的线段, h 取值应在信号范围长度的一半与一倍之间, 即 $0.5L \leq h \leq L$, 否则, 若 $h \geq L$, 极小值运算会将信号夷为直线, 进而破坏原始数据; 若 $h \leq 0.5L$, 即 $B_{1 \times h}$ 长度过短, 则极小运算后会出现过多的长度为 h 的谷底。这里 h 取值为 5, 运算结果如图 3 所示。图 3(b) 是 $X(x)$ 顺序中值变换后的结果($p = 1/2$), 毛刺等噪声被去除, 去噪效果明显; 图 3(c) 为 $X(x)$ 中值运算后的顺序极小变换结果, 宽度小于 h 的毛刺被剔除, 谷底被扩展为长度 h 的直线段, 相当于边界被放大 h 倍, 因为结构元素关于原点对称, 直线段的中点对应原来的谷底位置。从顺序极小值运算结果可以看出信号的范围清晰, 信号与背景的边界很容易确定。因此可利用顺序中值、顺序极小值变换对生物芯片图像滤波和确定荧光点信号的范围。

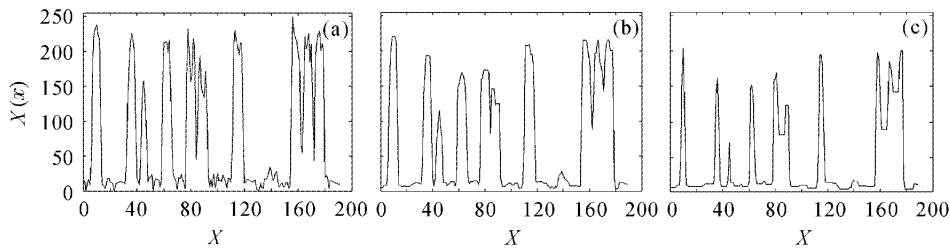


图 3 一维信号 $X(x)$ 的顺序中值、极小值运算

Fig. 3 Order median and minimum operation of $X(x)$

(a) $X(x)$; (b) $X(x) \circledast B_{1 \times h_1}, p = 1/2, h_1 = 3$; (c) $X(x) \circledast B_{1 \times h_1} \circledast B_{1 \times h_2}, p_1 = 1/2, p_2 = 0, h_1 = 3, h_2 = 5$

3.2 滤波

采用顺序中值运算进行中值滤波, 分别按水平和垂直方向对图像 f 作顺序中值变换: $f \circledast B_{1 \times h} \circledast B_{1 \times v}, p = 1/2, B_{1 \times h}, B_{1 \times v}$ 分别为水平与垂直线段, 由于荧光点为圆形, 可取 $v = h$, 直线型结构适于按一定方向处理图像。这种中值运算不仅具有清除噪声之功能, 而且又能保持水平与垂直方向的边界信息。

3.3 网格化

网格化实质是分割荧光点阵图像中的信号与背景, 图像中荧光点按水平、垂直方向排成行、列。如果由于扫描导致荧光点阵成像出现整体偏转, 应根据偏转角度反向旋转图像, 以保证图像中荧光点阵行、列的水平 and 垂直, 否则网格化结果将有误。点阵图像中荧光点行与行之间的分界线称为行网格线, 列与列之间的分界线称为列网格线。根据顺序极小值运算原理, 分析水平方向的一维荧光灰度信号即可确定列网格线, 同理, 分析垂直方向的一维荧光信

号亦可确定行网格线。

图像中穿越荧光点水平中心线的一维荧光灰度信号, 记为 X_p , 该行数据有许多谷峰和谷底, 这些谷峰中, 有的代表荧光点范围; 有的则是局部毛刺, 不代表位置信息; 同样, 在那些谷底中, 有的代表相邻两个荧光点的边界位置; 有的则是局部谷底, 与位置信息无关。利用顺序形态变换可对上述含有位置信息的谷峰和谷底做有效识别, 对 X_p 作顺序形态极小值运算: $(X_p) \circledast B_{1 \times h}, p = 0$, 结构元素 $B_{1 \times h}$ 为水平直线, 关于原点对称, 长度为 h , 单位为像素, h 取决于荧光点平均半径 $R, R \leq h \leq 2R$ 。已知共聚焦扫描仪的分辨率及样本点的半径, 可计算出样点成像后荧光点的半径 R 。极小值变换后宽度小于 h 局部谷底被去除, 真正的谷底(边界) 将被扩展为长度为 h 的直线段, 该直线段的中点对应原来的谷底位置, 由此可以确定列网格线。由于 $R \leq h$, 宽度小于 h 的噪声将被去除, 即使有一定噪声存在, 也不会影响结果的

判断,该运算兼有滤波的作用。

按同样的方法分析垂直方向的一维荧光信号,记为 Y_p ,该信号穿越荧光点垂直中心线,对 Y_p 作顺序形态极小值运算: $(Y_p) \textcircled{D} B_{1 \times v}, p = 0$, 结构元素 $B_{1 \times v}$ 为垂直直线,关于原点对称, $R \leq v \leq 2R$, 荧光点为圆形,可取 $v = h$ 。从其顺序形态极小值变换结果可确定荧光点行与行间的边界,即行网格。

因此,依据 X_p/Y_p 可确定列、行网格;而且 X_p/Y_p 上荧光点越多,一次可确定的网格数量越多。这意味着芯片图像上荧光点越多,处理速度越快。对 X_p/Y_p 存在的灰度等值区,即无法通过 X_p/Y_p 确定网格的区域,在该区域通过荧光点的平均直径 $2R$ 来划分网格。

4 实验及处理结果

4.1 实验及结果

按上述测量系统结构建立实验系统:激光束共

聚点大小为 $5 \mu\text{m}$, 针孔大小为 $50 \mu\text{m}$, 物镜 1 数值孔径大小为 0.65, 二维扫描电控平移台由步进电机驱动,其步距分别为 $5 \mu\text{m}$, $10 \mu\text{m}$, $20 \mu\text{m}$, $50 \mu\text{m}$, 可根据样点大小的不同,选择不同的扫描步距,这里采用 $5 \mu\text{m}$ 步距。往返扫描方式为:首先在 x 方向进行直线扫描,完成一行扫描后, y 方向跳到下一行再从反方向进行 x 方向扫描。数据采集卡采用 NI 公司的 PCI-NI6013,最大采集速度 200 K,16 位 A/D。光电倍增管采用滨松公司高性能的 H7711-12(电压输出型),其光谱特性适合于 570 nm 和 670 nm 的荧光信号,暗电流对应的典型电压值为 1 mV。将 Cy3, Cy5 荧光试剂(IgG-Cy3, IgG-Cy5)稀释为 Cy3, Cy5 溶液,将溶液点样在玻片上,分别制成 Cy3, Cy5 标记的样本芯片,样片大小 $22 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$ (生物芯片标准尺寸)。这样已知溶液的浓度、点样量、试剂的分子量,就可以计算出每个样点上的荧光分子数,为定量计算灵敏度提供了依据。荧光试剂点样配制参数见表 3。

表 3 荧光试剂点样配制参数

Table 3 Sample parameter

Fluorescence	Molecular weight	Concentration / ($\text{fluo} \cdot \mu\text{L}^{-1}$)	Sampling bulk / μL	Spot diameter / mm	Fluorescence molecule number density / ($\text{fluo}/\mu\text{m}^2$)
IgG-Cy3	163575	1.7549×10^7	1	2	5.58
IgG-Cy5	162259	1.0606×10^7	1	2	3.378

按上述方法配制完 Cy3, Cy5 试剂后,分别点样在两个玻片上,每个玻片上有 3 行,6 列共 18 个样点。考虑到样点直径较大,数据采集间隔为 $100 \mu\text{m}$ 。系统分别对其扫描得到荧光图像见图 5(a) 和图 5(c), 单次扫描时间 10 min。根据所收集到的图像荧光强度计算出单位面积上的荧光分子数 (fluo), 即可计算出整个实验系统的检测灵敏度。

4.2 灵敏度

灵敏度是指检测系统能够测定的最小荧光量的能力,记为 S , 通常用每平方米能测定的荧光分子

数来表示。实验中灵敏度 S 的计算采用的方法为

$$S = \frac{\text{取样量} \times \text{荧光分子数浓度}}{\text{点样面积}} \times \frac{1}{\text{信噪比}}, \quad (1)$$

式中根据采集的 Cy3, Cy5 图像的荧光信号平均灰度和背景标准差计算信噪比 (SNR), 计算公式为

$$\text{SNR} = \frac{\text{样点荧光信号均值} - \text{背景信号均值}}{\text{背景信号值标准差}}, \quad (2)$$

根据以上数据,按公式(1)计算出检测灵敏度,结果表明,系统对 Cy3, Cy5 两种荧光的检测灵敏度达到 $0.1 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$, 计算数据见表 4。

表 4 Cy3, Cy5 样点荧光图像检测灵敏度

Table 4 Detecting sensitivity of Cy3 and Cy5-fluorescence

Fluorescence	Mean foreground	Mean background	Background standard deviation	SNR	Sensitivity / ($\text{fluo} \cdot \mu\text{m}^{-2}$)
Cy3	130	20	3.2	34	0.164
Cy5	110	10	3.0	33	0.102

4.3 图像处理结果

系统采集的 Cy3 荧光图像的第三行样点的

X_p/Y_p 见图 4(a) 和图 4(d), 其顺序形态中值滤波和极小值运算结果见图 4(b), (c), (e), (f), 网格化结

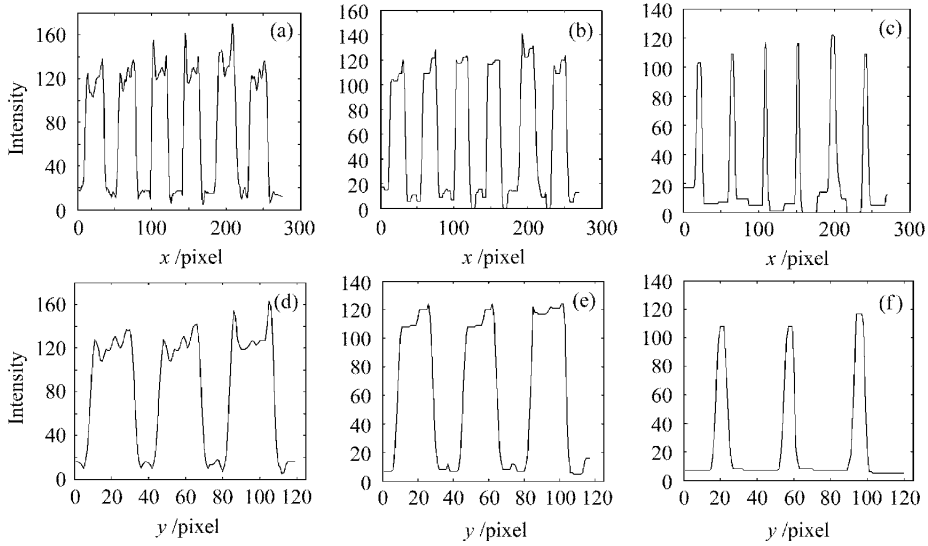


图 4 Cy3 荧光图像的 X_p/Y_p 顺序形态变换

(a) X_p ; (b) X_p 顺序形态中值变换; (c) X_p 顺序形态极小值变换;
(d) Y_p ; (e) Y_p 顺序形态中值变换; (f) Y_p 顺序形态极小值变换

Fig. 4 Order morphology transform of Cy3- fluorescence image

(a) X_p ; (b) order median operation of X_p ; (c) order minimum operation of X_p ;
(d) Y_p ; (e) order median operation of Y_p ; (f) order minimum operation of Y_p

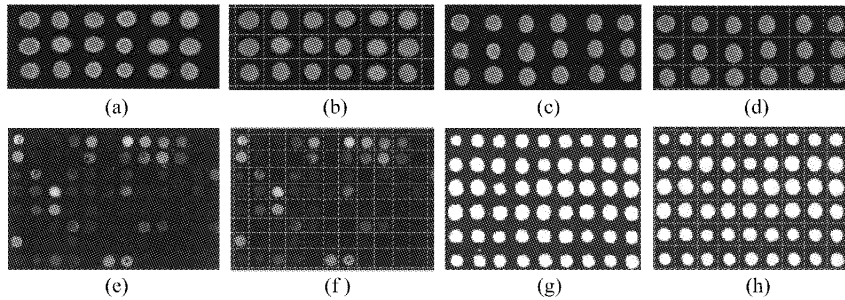


图 5 荧光点阵图像及其滤波、网格化结果

(a) Cy3 荧光图像; (b) Cy3 荧光图像网格化; (c) Cy5 荧光图像; (d) Cy5 荧光图像网格化;
(e) 图像 f_1 ; (f) f_1 滤波及网格化结果; (g) 图像 f_2 ; (h) f_2 滤波及网格化结果

Fig. 5 Filtering and gridding results of fluorescent images

(a) Cy3 image; (b) gridding of Cy3 image; (c) Cy5 image; (d) gridding of Cy5 image;
(e) image f_1 ; (f) filter and gridding of image f_1 ; (g) image f_2 ; (d) filter and gridding of image f_2

表 5 顺序形态变换参数

Table 5 Parameters of order morphology transform

Image	$B_{1 \times h}$	$2R$	h_1 (median filter)	h_2 (minimum filter)
Cy3-fluorescence	Line	30	5	15
Cy5-fluorescence	Line	28	5	15
f_1	Line	15	3	9
f_2	Line	18	3	11

果见图 5(b)和图 5(d)。为验证网格化方法对生物芯片荧光点阵图像处理的可行性,对另外两幅不同

生物芯片荧光图像 f_1, f_2 进行了处理,原图见图 5(e)和 5(g)^[9,10],图 5(e)图像质量较差,原图中可见

一些噪声点和荧光散点;图 5(g)图像质量较好,但也存在两个荧光散点,经滤波和网格化处理后,噪声和散点被去除,结果见图 5(f)和(h)。顺序变换运算参数见表 5。

5 结 论

全息滤光片构成的双波长激光共聚焦检测系统实现了生物芯片的荧光测量,全息滤光片效率高,调谐性能好,其反射衍射和带阻特性实现了在同一光路中同时对双波长荧光的检测,无需切换不同波长的滤光片或改变光路,还能实现双荧光同时成像。基于这种方案,可扩展实现多荧光检测。系统采用一个光电倍增管接收单元,不但系统结构简单,而且成本较低。实验表明,系统对 Cy3, Cy5 荧光检测的精度达到 $0.1 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$, 达到目前一般商业化生物芯片扫描仪的灵敏度水平。基于顺序形态变换的荧光点阵图像滤波灵活、有效,网格化方法能有效发现生物芯片图像中荧光点的区域和荧光点之间的边界,运算简单。同时,网格化运算本身兼有滤波性质,即使图像滤波效果不佳,网格化结果受到的影响也很小。芯片图像上荧光点越多,处理速度越快,尤其适用于目前的高密度生物芯片图像处理。后续工作将是双荧光同时成像且实现数据归一化的实验与研究。

参 考 文 献

- 1 Thomas Kukar, Sarah Eckenrode, Yunrong Gu *et al.*. Protein microarrays to detect protein-protein interactions using red and green fluorescent proteins [J]. *Analytical Biochemistry*, 2002, **306**(6):50~54
- 2 Huang Huijie, Zhai Junhui, Zhao Yongkai *et al.*. Multi-probe fiber-optic evanescent wave biosensor and its characterization [J]. *Chinese J. Lasers*, 2004, **31**(6):718 ~ 722
黄惠杰,翟俊辉,赵永凯 等. 多探头光纤倏逝波生物传感器及其性能研究[J]. 中国激光, 2004, **31**(6):718~722
- 3 Huang Huijie, Zhai Junhui, Ren Bingqiang *et al.*. Fiber-optic evanescent wave biosensor and its application [J]. *Acta Optica Sinica*, 2003, **23**(4):451~454
黄惠杰,翟俊辉,任冰强 等. 光纤倏逝波生物传感器及其应用[J]. 光学学报, 2003, **23**(4):451~454
- 4 GenePix Pro 5.0 User's Guide & Tutorial [M]. Axon Instruments Inc. 2004, 28~30
- 5 Claudio Nicolini, Andrea Marco Malvezzi, Alessandra Tomaselli *et al.*. DNASER I: Layout and data analysis [J]. *IEEE Transaction on NanoBioscience*, 2002, **1**(2):67~72
- 6 Roberto Hirata Jr, Junior Barrera, Ronaldo F. Hashimoto *et al.*. Segmentation of microarray images by mathematical morphology [J]. *Real-Time Imaging*, 2002, **8**(6):491~505
- 7 Radhakrishnan Nagarajan, Charlotte A. Peterson. Identifying spots in microarray images [J]. *IEEE Transaction on NanoBioscience*, 2002, **1**(2):78~84
- 8 Wu Mingjin. Image Morphology [M]. Shanghai: Shanghai Science Technology Literature Press, 1991. 224~229
吴敏金. 图像形态学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 1991. 224~229
- 9 Nicole L. W. van Hal, Oscar Vorst, Ade'le M. M. L. van Houwelingen *et al.*. The application of DNA microarrays in gene expression analysis [J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, **78**(3):271~280
- 10 Antonio P. G. Damianc Jr., Liang Zhao, Andre C. P. L. F. Carvalho. A dynamical model with adaptive pixel moving for microarray images segmentation [J]. *Real-Time Imaging*, 2004, **10**(4):189~195