

多重定量 PCR 系统中多色荧光检测和 光谱串扰校正方法

臧留琴¹ 张镇西¹ 苗宝刚² 彭年才^{2*} 李 政²

(¹ 西安交通大学生命学院生物医学信息工程教育部重点实验室, 陕西 西安 710049)
(² 西安交通大学机械学院机械制造系统工程国家重点实验室, 陕西 西安 710049)

摘要 多色荧光的激发检测光路是多重定量聚合酶链式反应(PCR)系统的核心组成部分。根据系统对荧光激发的均一性、荧光检测的时间和灵敏度需求,提出一种基于磁光开关和光电倍增管(PMT)的多色荧光激发检测光路。通过四色 LED 单独激发和 PMT 检测来提高灵敏度;利用磁光效应实现光路的电控切换,配合一维扫描机构和滤光片切换装置,完成 96 孔标准 PCR 板的四色荧光扫描。该设计避免了多色荧光光路的系统串扰。由于荧光染料本身光谱特性产生的荧光光谱串扰是通过标准迭代的四维聚类分析算法计算串扰矩阵,并通过 4 种常用染料的实验研究,对所建荧光检测系统进行荧光光谱串扰评估。

关键词 光谱学;多重定量;多色荧光检测;光谱串扰校正;磁光开关

中图分类号 O439 文献标识码 A doi: 10.3788/AOS201434.0117002

Multicolor Fluorescence Detection in the Multiplex Quantitative PCR System and Spectra Crosstalk Correction Method

Zang Liuqin¹ Zhang Zhenxi¹ Miao Baogang² Peng Niancai² Li Zheng²

¹ Key Laboratory of Biomedical Information Engineering, Ministry of Education, School of Life Science and Technology, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China
² State Key Laboratory for Manufacturing System Engineering, School of Mechanical Engineering, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710049, China

Abstract Optical design for multicolor fluorescence detection is the core part of multiplex quantitative polymerase chain reaction (PCR) system. According to the system requirements for excitation uniform, detection time and sensitivity, an optical system is presented, which is based on magneto-optical switch and photomultiplier tube (PMT) detector. Four LEDs excitation unit and PMT detection unit are adopted to improve system sensitivity. Electronic optical switch combined with the one-dimensional scanning mechanism and filter to implement four-color fluorescence scanning on a 96-well standard PCR plate. The design avoids the crosstalk among the four color optical paths. Whereas the crosstalk generated by the spectral characteristics of the fluorescent dye itself can be estimated by standard iterative four-dimensional clustering analysis algorithm. We finally evaluate the systematical fluorescent spectra crosstalk by the experimental study of four commonly used dyes.

Key words spectroscopy; multiplex quantitative; multicolor fluorescence detection; spectra crosstalk correction; magneto-optical switch

OCIS codes 170.3880; 170.6280; 120.1880; 120.4570

收稿日期: 2013-07-12; 收到修改稿日期: 2013-09-13

基金项目: 国家重大科学仪器设备开发专项(2012YQ030261)、国家自然科学基金(61120106013)、国家科技支撑计划(2012BAI19B057)

作者简介: 臧留琴(1982—),女,博士研究生,主要从事生命科学检测仪器及诊断技术等方面的研究。

E-mail: lqzang@stu.xjtu.edu.cn

导师简介: 张镇西(1951—),男,博士,教授,博士生导师,主要从事生物医学光子学影像与光谱分析技术、纳米光生物物理与生物光子学调控技术等方面的研究。E-mail: zxzhang@mail.xjtu.edu.cn

* 通信联系人。E-mail: pnc@mail.xjtu.edu.cn

1 引 言

实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)技术由于其具有实时、灵敏、特异等优点,已经成为分子研究的主要手段之一,广泛应用于分子生物学和医学研究及临床。但是普通的实时定量 PCR 受荧光检测通道限制,单次反应只能分析单个靶序列,使其在科学研究中的使用受到限制。基于多色荧光检测和分析技术的多重定量 PCR 方法,通过在一个反应体系内标记不同荧光染料,可实现一次反应检测和多个靶序列鉴别^[1]。

基于多色荧光检测的多重 PCR 方法中,关键技术是多色荧光激发和检测系统的实现,而系统对激发的均一性、检测的快速性和灵敏度有很高的要求。常规的多色荧光激发和检测系统主要有单孔扫描和整板成像两大类,其中,单孔扫描方式一般以步进电机带动扫描镜头进行二维运动以实现所有荧光信号的采集,这种方式可以获取特异性较强的荧光信号,但是步进电机控制的精确性及机械运动噪声会影响荧光信号的精度^[2-3];而整板成像是基于电荷耦合器件(CCD)成像的荧光采集技术,其优点在于可以同时采集所有样品的荧光信号,但其灵敏度低,荧光信号之间有较大干扰,存在明显的“边缘效应”而造成较大的成像误差^[4]。本文提出一种多色荧光激发和检测装置,并在该装置下对实际获取的实时 PCR 荧光数据进行分析、处理及验证。

针对所设计的光学检测系统,需要解决其由于荧光染料光谱重叠引起的色彩补偿问题。要分析每一个检测通道获得的荧光数据首先必须得到纯荧光染料在每个检测通道的校准数据和自动荧光控制数据,利用这些数据计算出信号交叉常数,并通过矩阵

代数法将测量的荧光值转化为实际的荧光值。设计的多重 PCR 采用 4 个波长段的荧光报告基团,理论上在一次实验中,可以用 4 种染料作为探针的荧光报告基团,结合 4 种不同的靶基因,进行 4 重 PCR 反应。

2 实验方法

2.1 多色荧光激发检测系统的设计

采用 4 种波长冷光源发光二极管(LED)作为激发光源,组合相应的带通滤光片及聚焦透镜,形成激发单元;相应的 4 种检测波长的带通滤光和聚焦透镜,组合光电倍增管(PMT)形成检测单元;激发光通过光纤束从激发单元传输至样品池,而发射荧光也通过光纤束从样品池传输至检测单元;激发光纤束和发射光纤束利用基于磁光效应的光开关^[5]实现光路在不同检测孔间的切换;步进电机带动激发和检测单元做一维运动进行分色扫描,另一个电机带动光纤束做一维扫描,完成 96 孔的扫描检测,光路示意图如图 1 所示。系统中设计的激发和荧光发射波长如表 1 所示,使用的荧光染料分别为羧基荧光素(FAM),亚磷酰胺(HEX),德克萨斯红(Texas Red)和菁染料琥珀亚酰胺酯(Cy5)。

表 1 系统所采用激发和荧光发射波长

Table 1 Excitation and emission wavelength in the system

Channel	Excitation wavelength /nm	Emission wavelength /nm	Dye
1	470	525	FAM TM
2	523	564	HEX TM
3	571	612	Texas red
4	630	670	Cy5

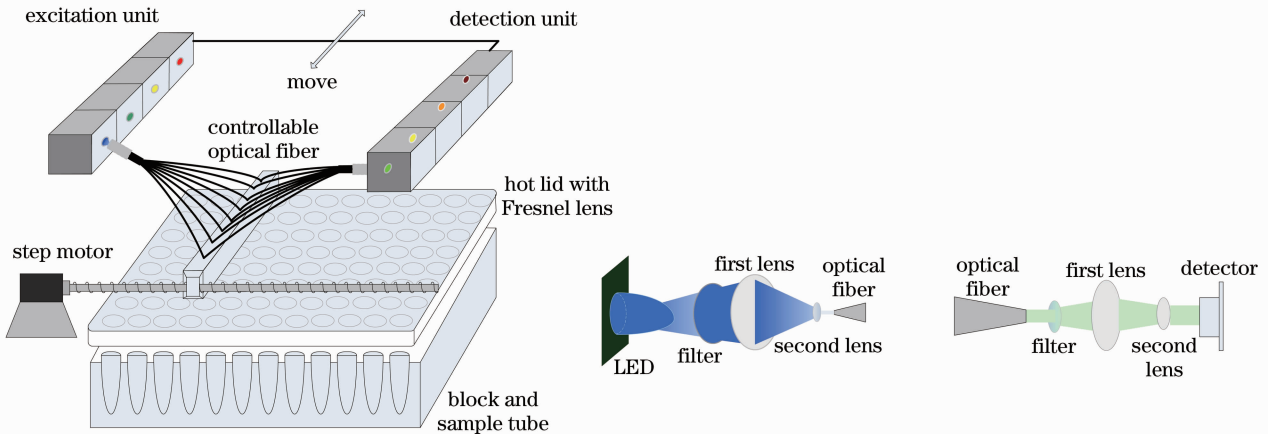


图 1 光学检测系统

Fig. 1 Optical detection system

荧光激发和检测光纤束采用一种磁光效应,利用法拉第效应,通过改变所加载的磁场改变光的传输通道^[6],如图 2 所示。

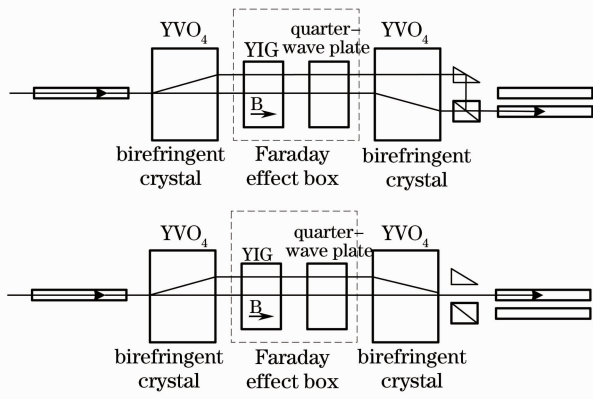


图 2 基于磁光效应的光通路切换

Fig. 2 Light path switch based on magneto-optic effect

激发光检测光纤束示意图如图 3 所示,由一个输入光纤,8 个输出光纤及光路切换模块组成,其中光路切换模块有 5 个引脚对外,实现光路切换模块的供电和控制。

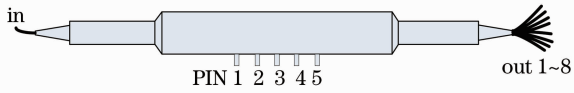


图 3 检测光纤束

Fig. 3 Optical fiber bundle for detection

通过控制端 1、2、3 的电平切换,实现光通路切换,所选用的光通路切换装置具体参数如表 2 所示。

表 2 光通路切换装置参数

Table 2 Parameters of optical path switching device

Parameter	Default value
Insertion loss /dB	0.9~1.2
Return loss /dB	≥40
Isolation /dB	≥35
Extinction ratio /dB	0.15~0.3
Switching time /μs	10~400

2.2 荧光串扰的校正方法

在基于 4 色荧光检测的 PCR 系统中,测得的原始荧光数据包含 4 个波长的荧光浓度^[7],组成“检测空间”向量 s ,而实际需要得到的模版浓度由荧光染料浓度表征,形成“染料空间”向量 f ,此处需要通过一个 4×4 的转换矩阵 M 实现检测空间到染料空间的转换,此转换矩阵即为荧光串扰矩阵, $s = Mf$ 。 M 的一列表示某一种染料发射的荧光在 4 种检测波长下的相对浓度值。通过测定多个浓度的某种纯染料

在 4 个检测通道的荧光值,计算串扰影响矩阵 M ^[8]。确定荧光串扰矩阵,必须明确各个荧光染料在各检测通道的荧光串扰系数 $k(i, j)$,由该系数形成多通道的荧光串扰矩阵 M 。荧光染料在检测通道的荧光串扰系数是该染料在该检测通道读取荧光强度去除荧光染料自体背景荧光值后,与该染料在所有通道中读取的荧光强度值与背景值之差的比值,可以表示为

$$k(i, j) = \frac{o(i, j) - a(j)}{\sum_{n=1}^N [o(i, n) - a(n)]}, \quad (1)$$

式中 $k(i, j)$ 是染料 i 在通道 j 中的串扰常数, $o(i, j)$ 是检测到的染料 i 在通道 j 中的光强, $a(j)$ 是通道 j 中的自体荧光(即背景荧光), n 是通道序号, N 是通道总数。荧光串扰矩阵可表示为

$$M = \begin{bmatrix} k_{11} & k_{12} & k_{13} & k_{14} \\ k_{21} & k_{22} & k_{23} & k_{24} \\ k_{31} & k_{32} & k_{33} & k_{34} \\ k_{41} & k_{42} & k_{43} & k_{44} \end{bmatrix}. \quad (2)$$

大多数荧光染料和荧光染料之间的串扰都是随温度变化的^[9]。校准时以 $0.2 \text{ } ^\circ\text{C/s}$ 的升温速度从 $40 \text{ } ^\circ\text{C} \sim 95 \text{ } ^\circ\text{C}$ 进行连续荧光检测。荧光强度随温度的变化曲线可以用 3 次多项式来拟合,保存最佳拟合参数用于之后的插值。

为了实现荧光数据的颜色补偿,每次采集的温度用来对校准曲线温度敏感的荧光值进行插值。荧光强度还要考虑校准时和测量时系统的电子增益。

$$o(i, j) = [w(i, j)T^3 + x(i, j)T^2 + y(i, j)T + z(i, j)][G_D(j)/G_C(j)], \quad (3)$$

$$a(j) = [m(j)T^3 + n(j)T^2 + p(j)T + q(j)] \times [G_D(j)/G_C(j)], \quad (4)$$

式中 $w(i, j)$, $x(i, j)$, $y(i, j)$, $z(i, j)$ 是荧光随温度变化的三次多项式系数, $m(i, j)$, $n(i, j)$, $p(i, j)$, $q(i, j)$ 是通道自体荧光随温度变化的三次多项式系数。 $G_D(j)$ 和 $G_C(j)$ 分别是测量时和校准时系统的电子增益系数。

测量时每种染料的实际荧光信号强度 f 为

$$f = M^{-1}[O - A], \quad (5)$$

式中 f 是每种染料的实际荧光信号强度, M 是各种染料对不同通道的串扰矩阵, O 是每个通道测量得到的荧光强度, A 是荧光染料的背景荧光强度。

计算荧光串扰矩阵的最简单的方法是:首先从原始数据中移除基线,其次需要选择 4 个与各荧光染料相关的典型峰值,然后计算出这 4 个峰值的相

对荧光强度。这种方法虽然简便,但是由于只有 4 个数据,精确性较差,一般在实际应用中不会采用。以这种方法为基础,对其进行优化提出一种通过多次扫描得到多组数据形成多个矩阵,然后对多个矩阵进行平均的方法。这种方法是在每次扫描时,每种染料在每个通道只取最大值,而其他值都设为 0,然后利用最小二乘法对串扰矩阵进行优化。

一种通过荧光检测数据直接计算荧光串扰矩阵的算法核心为四维聚类分析^[10],包括数据搜集、基线校准、峰值识别以及自动归一化。估计出的串扰矩阵的质量可以通过对训练数组中转换峰值点的三维散点分析进行评估。采用一系列标准迭代聚类技术在模式识别中进行特征选择来确定串扰矩阵。这种方法所需的处理步骤较少,但是需要移除基线且需要一组初始值来进行迭代。对该方法可通过观察色彩分离后的数据轨迹进行评估。在此基础上,提出了另一种对串扰矩阵进行估计的方法^[11],其串扰矩阵每一列数据可通过一种特定的实验进行计算,该实验方法是在每次荧光扫描和读值时,只采用单一的荧光标记物,而数据采集则在 4 个通道同时进行,以此评估出每一种染料在各个通道的荧光串扰。该方法利用迭代算法和奇异值分解算法使两次测量差异、一维散度和均方误差和达到最小值。

计算荧光串扰矩阵,需要考虑以下因素。1) 必须确定所读取的荧光值的准确性,以此作为评价各种串扰矩阵估计质量的基础,并优选出最佳矩阵估计算法。2) 在估计串扰矩阵时,需在训练过程(迭代)中采用尽量多的扫描数据组。3) 如何确定采集的荧光值的基线是一个关键问题,此处提出以下几种方法:寻求一种不需要预先确定基线轨迹的算法;然后用预先给定的串扰矩阵来近似估计基线并对荧光数据进行校正。4) 峰值的确定通常可以通过低通滤波对数据进行多点平滑处理。

提出一种实验方法确定 4 种荧光染料在 4 个检测通道的荧光值,通过确定不同荧光染料在不同通道的相互关系,确定各染料在各通道的干扰,以此确定荧光串扰矩阵。由于荧光定量 PCR 的检测值为相对荧光强度,在荧光串扰矩阵中,可以认为每一种荧光染料在其发射荧光波长的检测通道下,其影响因子为 1,这样,实际荧光串扰矩阵只需要确定 12 个元素。因此串扰矩阵 \mathbf{M} 可以改写为如下表达式:

$$\mathbf{M} = \begin{bmatrix} 1 & \frac{k_{12}}{k_{22}} & \frac{k_{13}}{k_{33}} & \frac{k_{14}}{k_{44}} \\ \frac{k_{21}}{k_{11}} & 1 & \frac{k_{23}}{k_{33}} & \frac{k_{24}}{k_{44}} \\ \frac{k_{31}}{k_{11}} & \frac{k_{32}}{k_{22}} & 1 & \frac{k_{34}}{k_{44}} \\ \frac{k_{41}}{k_{11}} & \frac{k_{42}}{k_{22}} & \frac{k_{43}}{k_{33}} & 1 \end{bmatrix}. \quad (6)$$

具体算法如下:

1) 初始化:设 $i=1$,用原始数据作为训练数据组,初始估计矩阵 $\mathbf{M}^{(0)}$ 是一个 4×4 单位矩阵。同时需要设一个阈值 α 和一个正整数 T ,其中 α 是一个小正数。

2) 抽样:用不同染料在荧光采集通道获取荧光值,每两种染料的相对荧光值组成多个二维散点图。以第一组分为 X 坐标,第二组分为 Y 坐标组成的二维散点图为例。

确定边界:选择第一组分的两个分位点作为范围的边界,在本次迭代中,当前训练数据组中处于边界范围内的这些点可用于估计出串扰矩阵中的元素 k_{21}/k_{11} 。

区域分割:将两边界所包含的范围平均分为多个相同的宽度。

选择极值点:找到所有扫描数据点中,第一组分值落在一个给定分割的区域内而其第二组分值最小的散点。

3) 一维线性回归:对从最后一个步骤中获得的扫描数据进行第二组分对第一组分的一维线性回归计算,将此处估计出的斜率值作为 k_{21}/k_{11} 的下一个估计值。同理,该图中估计出的另一臂的斜率可作为 k_{12}/k_{22} 的下一个估计值。

4) 对其他参数进行估计:根据上述步骤 2 和 3,可估计出矩阵中其他各元素的值,并估计出串扰矩阵 \mathbf{M} 。

5) 评估颜色校正的质量:计算步骤 2、3 和 4 中得到的 12 个估计斜率的绝对值的最大值,如果该值低于阈值 α ,则进行步骤 7,否则即按步骤 6 继续计算。

6) 修正:用 \mathbf{M} 的逆矩阵以逐点相乘的方法对训练数据组进行修正,得到新的训练数据组。设 $\mathbf{M}^{(i)} = \mathbf{M}^{(i-1)} \times \mathbf{M}$,其中, i 为迭代次数,每次增加 1,如果 $i > T$,则进行步骤 7,否则就从第一步骤重新计算。

7) 归一化:对 $M^{(i)}$ 进行归一化处理,使矩阵每列的数据相加为 1。

该算法的输出结果为估算出的串扰矩阵。首先,步骤 2 中选择的区域的分位点一般为训练数据组中每个组分值的 60%~99%,选取 99%的分位点来消除异常值。其次,分割的区域不能太小也不能太大,太小容易使迭代效率下降,且容易导致更大的偏差,而太大则会引起许多分割区域内不存在一个边界点,一般确定分割区域的数量时要求每个分割区域内平均包含 6~10 个有效数据点。第三,数值实验结果表明一维线性回归要优于最小二乘回归法。第四,结束迭代的基本原则是检查斜率是否平

行于 X 轴,此处通过为斜率设定阈值实现该原则,一旦估计的斜率值小于设定的阈值,迭代则终止。阈值的选择依赖于精度要求和噪声水平。根据多组数据分析和判定,一般选取 0.05 作为阈值。最后,还对估计出的串扰矩阵进行了归一化处理,使矩阵的每一列相加之和为 1。

2.3 估算荧光串扰校正矩阵的实验方法

为了评估 4 色 PCR 光学系统的荧光串扰矩阵,设计以下试验进行原始数据采集。4 个检测通道的滤光片中心波长及带宽与 4 种染料发射谱相对关系如图 4 所示。

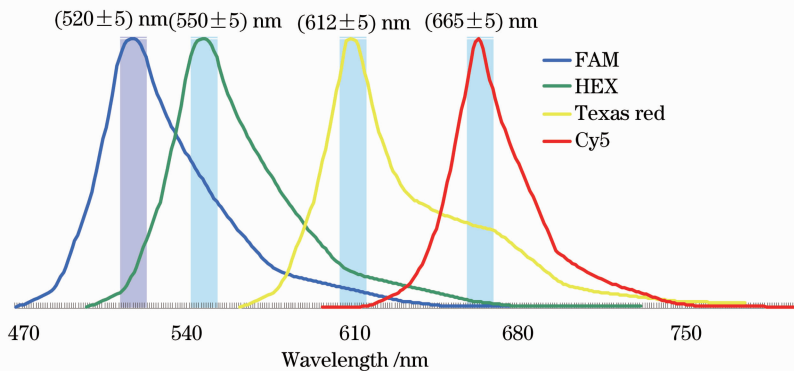


图 4 检测波长及带宽与染料发射谱关系

Fig. 4 Relationship between dye emission spectrum and detection wavelength and bandwidth

确定系统的荧光串扰矩阵,需首先对系统进行背景校正,背景荧光是 PCR 仪的环境荧光强度,主要由背景电信号、样本块中的污染物、塑料耗材中的水以及塑料耗材自身引起,背景校正就是通过实验获取系统的背景荧光值,生成校正文件用于后续实验数据处理消除背景荧光影响。然后确定此光学系统的荧光染料浓度线性范围,最后进行纯染料校正,通过对获取的数据进行分析处理得到系统的荧光串扰矩阵。

背景校正方法:在反应管中加入不含模板的 PCR 反应体系,制成背景校正板,测量其空白荧光强度。在运行校正程序期间,定量 PCR 系统在 10 min 内连续读取背景校正板的荧光强度,信号收集的温度为 60 °C (一般 PCR 反应中进行荧光采集的温度)。随后,用软件计算所收集到的荧光强度的平均值,保存到校正文件中。软件在今后的分析中将自动调用此校正文件,从实验数据中扣除背景信号。

确定系统荧光染料浓度线性范围方法:在 96 孔标准 PCR 板的 C3~C12 孔中各加入 FAM 的 8 种

梯度稀释液 25 μ L;在 D3~D12 孔中各加入 HEX 的 8 种梯度稀释液 25 μ L;在 E3~E12 孔中各加入 Texas Red 的 8 种梯度稀释液 25 μ L;在 F3~F12 孔中各加入 Cy5 的 8 种梯度稀释液 25 μ L。将反应板放入检测仪器中进行检测,在 10 min 内连续读取的反应板的荧光强度,对读取的荧光数据进行分析,确定荧光染料的浓度线性范围。

纯染料校正方法:将 4 种染料在其浓度线性范围内各稀释成 24 个浓度梯度,并按浓度大小顺序加入到 96 孔标准反应板中,制成纯染料校正板。将纯染料校正反应板放置入仪器,进行光学扫描和荧光数据采集。设置仪器以 0.2 °C/s 的升温速率从 40 °C 升到 95 °C,从 40 °C 开始,每升高 1 °C,保温 10 s,进行一次荧光数据采集,记录采集的荧光数值用于后续计算。

3 结果与讨论

3.1 光学系统性能

随机选择经定量 PCR 扩增的 DNA 试剂标本装入 96 孔载台,设置激发端和检测端的磁光开关同步切换频率为 2500 Hz,相当于每个通道的切换时

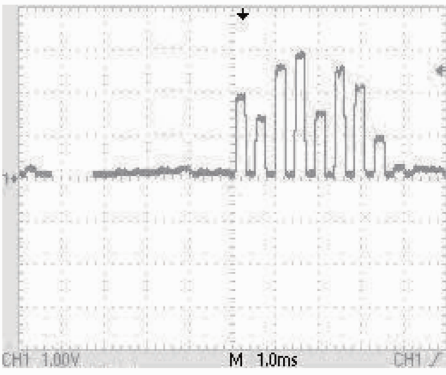


图 5 荧光检测速度测试图

Fig. 5 Speed test in fluorescence detection

间为 $400 \mu\text{s}$ 。采用 Tektronix TDS 2024B 型数字示波器记录 PMT 输出 O/E 端信号,即各路荧光对应的模拟电信号。示波器的信号如图 5 所示。从中可以看出光开关切换频率为 2500 Hz 时,随机 PCR 标

本对应的输出幅度各异的脉冲输出上升沿和下降沿很陡,能满足之后模数转换及数字和软件系统对各路信号的识别和采集,实现多路荧光检测通道的快速扫描检测。实测的单通道切换加上荧光采集时间小于 $500 \mu\text{s}$,8 通道的荧光采集不到 4 ms 。

3.2 四色 PCR 光学系统荧光串扰矩阵的实验结果

所设计的光学检测系统,根据 2.3 节提出的实验方法,可首先获得其系统的背景荧光值,然后确定其染料浓度的线性范围为 $10^{-10} \sim 10^{-3} \text{ mmol/L}$ 。利用在该浓度线性范围内的荧光染料进行纯荧光染料校正,一次校正试验可获取 55 次采集测 4 个通道各 96 个数据,根据得到的荧光值,可区分出不同浓度下某种纯染料在 4 个检测波长下的相对荧光值,其中某一次读取的 4 种荧光染料分别在 4 个通道的荧光值如图 6 所示,为了获取较多样本以减小计算误差,可进行多次校正试验以增大样本量。

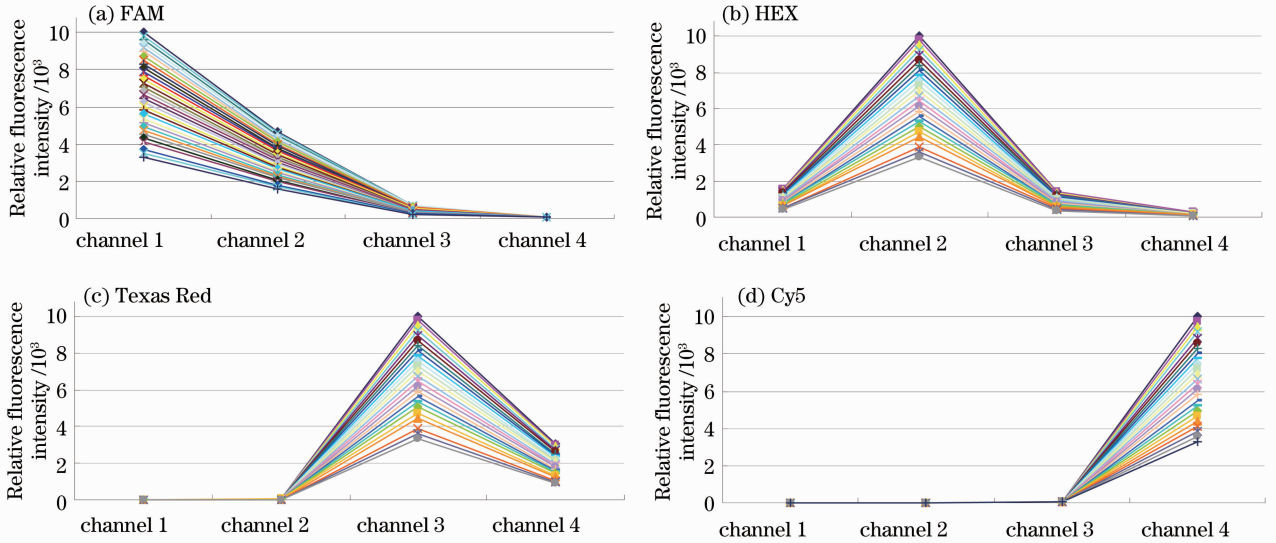


图 6 染料 Fam, Hex, Texas Red, Cy5 的荧光数据

Fig. 6 Fluorescent data of Fam, Hex, Texas Red and Cy5 dye

对于获取的数据,首先先去除其背景噪声影响,然后利用 2.2 节所述算法对数据进行处理,估计出荧光串扰矩阵。在实际应用时,在得到串扰矩阵的各参数后,要对检测数据进行反处理,得出实际荧光数据用于结果分析,即得到 \mathbf{M} 后,还要求其逆矩阵 \mathbf{M}^{-1} ,存储其逆矩阵的各参数,逐点乘以实际采集的荧光数据(即检测空间)后,得到实际荧光数据(即染料空间)值。

3.3 估计串扰矩阵并求取逆矩阵

对采集的荧光数据进行分析,建立二维散点图,根据 2.2 节所述算法,先确定分布边界,在实际应用时,选取每个组分的 $60\% \sim 99\%$ 作为信息范围,然

后将散点分布区域平均分为 200 个相等的区间,选取最大迭代次数为 9。以采集的组的数据作为训练数据组,估计出最优的串扰矩阵(表 3),最后进行归一化计算(表 4)。

表 3 最优串扰矩阵

Table 3 Optimized crosstalk matrix

	FAM	HEX	Texas Red	Cy5
Ch1	1	0.457143	0.071429	0.005714
Ch2	0.171429	1	0.157143	0.025714
Ch3	0.001429	0.002857	1	0.328571
Ch4	0.000086	0.001428	0.002861	1

表 4 归一化矩阵

Table 4 Normalized matrix

	FAM	HEX	Texas Red	Cy5
Ch1	0.852	0.313	0.058	0.004
Ch2	0.146	0.684	0.128	0.019
Ch3	0.0012	0.0020	0.812	0.242
Ch4	0.0008	0.0010	0.002	0.735

由于每个荧光检测系统在实现的时候存在个体差异,由此造成系统的背景荧光值及相对荧光强度值存在差异,因此对每个新建立的荧光检测系统都应该进行系统的背景荧光检测及荧光串扰矩阵估算,以此确保不同系统在临床应用时能较好地达到一致性要求。

4 结 论

设计了一种利用四色 LED 作为激发光源,利用 PMT 作为光检测器,基于磁光效应实现多色荧光定量 PCR 检测,配合一维扫描机构和滤光片切换装置,进行 96 孔标准 PCR 板的四色荧光扫描,完成多色实时荧光定量 PCR 检测。磁光效应组合光纤传输可有效避免光通路之间串扰。对于荧光染料本身光谱特性产生的串扰,通过标准迭代的四维聚类分析算法计算串扰矩阵。描述了荧光串扰矩阵的计算方法及算法实现,并针对 4 种常用染料的进行实验研究,对所建立的多色实时荧光定量检测系统进行荧光串扰评估计算。

参 考 文 献

- 1 E Mary, G Richard. Multiplex PCR: advantages, developments, and applications [J]. *Genome Res*, 1994, 3(4): 65-75.
- 2 K Dieter. Quantification using real-time PCR technology: applications and limitations [J]. *Trends Mol Med*, 2002, 8(6): 257-260.
- 3 N Thelwell, S Millington, A Solinas, *et al.*. Mode of action and application of scorpion primers to mutation detection [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(19): 3752-3761.
- 4 Liu Jun, Zhao Jibin, Liu Weijun, *et al.*. Gene chip microarray fluorescent spots images CCD Scanning and acquiring system [J]. *Chinese J Lasers*, 2010, 37(2): 505-509.
刘 军, 赵吉宾, 刘伟军, 等. 基因芯片荧光靶点阵列图像 CCD 扫描采集系统[J]. *中国激光*, 2010, 37(2): 505-509.
- 5 Wang Gang, Ming Anjie, Liang Jingqiu. Development of the optical switch [J]. *MEMS Device and Technology*, 2005, 4: 195-199.
王 刚, 明安杰, 梁静秋. 光开关研究进展[J]. *MEMS 器件与技术*, 2005, 4: 195-199.
- 6 Zhi Yanan, Yan Aimin, Shu Rong, *et al.*. High-speed digital beam scanner based on electro-optic crystal switch array [J]. *Acta Optica Sinica*, 2010, 30(12): 3430-3434.
职亚楠, 闫爱民, 舒 嵘, 等. 高速电光晶体开关阵列数字光束扫描器[J]. *光学学报*, 2010, 30(12): 3430-3434.
- 7 Peng Niancai, Zhang Zhenxi, Li Zheng, *et al.*. High resolution melting analyzer based on high throughput fast detection of weak fluorescence [J]. *Acta Optica Sinica*, 2012, 32(2): 0217001.
彭年才, 张镇西, 李 政, 等. 基于高通量微弱荧光快速检测的高分辨熔解曲线分析仪[J]. *光学学报*, 2012, 32(2): 0217001.
- 8 Li Lei, P Terence. An estimate of the cross-talk matrix in four-dye fluorescence-based DNA sequencing [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20(7): 1433-1442.
- 9 K Jason, N Lyle, K David, *et al.*. *The Handbook of Plant Mutagenesis and Mutant Screening* [M]. Berlin: Wiley-VCH, 2010: 149-165.
- 10 Y Zhongbing, S Jessica, G Michiel, *et al.*. Automatic matrix determination in four dye fluorescence-based sequencing [J]. *Electrophoresis*, 1996, 17(6): 1143-1150.
- 11 H Weian, Y Zhongbing, D R Fuhrmann, *et al.*. A method to determine the filter matrix in four dye fluorescence-based sequencing [J]. *Electrophoresis*, 1997, 18(1): 23-25.

栏目编辑: 韩 峰