

文章编号 1004-924X(2005)06-0727-08

双荧光标记生物芯片激光共聚焦检测系统

马军山, 侯琳琳, 付东翔, 陈家璧, 庄松林
(上海理工大学 光学与电子信息工程学院, 上海 200093)

摘要: 基于激光共聚焦检测原理, 构建了针对荧光标记生物芯片的检测系统, 对用 Cy₃ 或 Cy₅ 标记蛋白点样的玻片进行了扫描检测, 并对采集的荧光数据信号进行了图像重建。针对实际荧光信号可能较微弱并存在较大动态范围的情况, 采用形态学方法对图像进行滤波、增强处理, 显著增强了图像质量。提出了标定系统信噪比和灵敏度的公式, 并据此对检测实验结果进行了详细的分析计算, 最终标定此激光共聚焦生物芯片检测系统的灵敏度约为 0.1 fluo/ μm^2 。

关键词: 生物芯片; 共聚焦系统; 双荧光; 形态学; 灵敏度

中图分类号: TN247 **文献标识码:** A

Two-laser scanning confocal system for microarray analysis

MA Jun-shan, HOU Lin-lin, FU Dong-xiang, CHEN Jia-bi, ZHUANG Song-lin

(*Optics and Electronics Information Institute, Shanghai University of
Science and Technology, Shanghai 200093, China*)

Abstract: A dual-fluorescence microarray scanner based on laser confocal principle was constructed to detect the Cy₃-protein or Cy₅-protein dotted slides. The images were constructed according to the fluorescent intensity signals, and enhanced through adopting the technique of morphologic methods to meet the situation in which the fluorescent intensity was very low and the dynamic range of the data was wide relatively. The measuring ways of the signal-to-noise ratio and the sensitivity of the system were put forward, and the measurement result shows the sensitivity of the system is about 0.1 fluo/ μm^2 .

Key words: biochip; confocal system; dual-fluorescence; morphology; sensitivity

1 引言

生物芯片在新药开发、疾病诊断及基因表达分析等方面具有广泛的应用^[1]。目前主要的检测原理和结构分为 CCD 扫描和激光共聚焦扫描。

CCD 扫描系统相对于激光共聚焦扫描系统来说, 结构较简单, 检测速度较快, 但横向分辨率

较低。若要提高横向分辨力, 需要提高成像系统的放大倍数, 相应视场将减小(即一次测量的芯片面积较小), 当需要测量的芯片面积较大时, 只能多次分块测量后再拼接。由于分块扫描实际上是通过机械运动方式使芯片与成像系统做相对运动, 故机械定位误差将形成扫描图像的拼接误差, 所以这种方法不适用于高精度的高密度生物芯片检测。另一方面, CCD 灵敏度远低于光电倍增

收稿日期: 2005-06-22; 修订日期: 2005-08-18.

基金项目: 上海市科委科技发展基金资助(No. 022261016)。

管,因此系统检测灵敏度也较低。

基于激光共聚焦原理构建的生物芯片检测系统对生物芯片进行逐点扫描,由于生物芯片始终处于焦平面,因此激发光的光斑尺寸非常小,横向分辨率较高。检测光路通过在接收端设置一共轭针孔,可以消除焦平面以外杂散光的干扰,检测灵敏度也较高。由于激光共聚焦检测方式具有高分辨率和高灵敏度的特点,能够获得生物芯片上用荧光标记的抗体等的清晰数字荧光图像和定量分析结果,故已成为高密度生物芯片扫描所主要采用的检测方法^[2]。

在实际应用中,不同的探针需要采用相应的荧光物质标记,目前使用广泛的荧光标记主要为 Cy_3 和 Cy_5 荧光染料,它们的激发光波长以及受激产生的荧光波长各异,因此检测仪器应能对不同荧光物质进行激发,并分别检测相应的荧光信号。

本文描述了可对 Cy_3 与 Cy_5 荧光物质进行检测的双荧光激光共聚焦生物芯片检测系统,并进行了相关的实验研究,运用形态学方法对荧光图像进行了有效的处理,并报道了该系统的相关实验结果。

2 系统构成

本系统可对用 Cy_3 与 Cy_5 2 种荧光物质标记的生物芯片进行检测。光路设计采用激光共聚焦检测方式,光源选用波长为 532 nm 的绿光激光器和波长为 632.8 nm 的 He-Ne 激光器。对生物芯片的扫描采用物动式的机电扫描方法,这种扫描方式的优点在于实现方法简单、价格低廉,而且光轴方向与扫描方向始终垂直,显微物镜的成像质量只对轴上点有要求,像差校正简单。

图 1 为实际实验系统照片,图 2 为实际实验光学系统的俯视图。

2.1 光学系统

装置结构如图 3 所示。由于共聚焦扫描成像系统具有较高的分辨能力,因而被广泛地应用于生物芯片的信号成像系统中以实现空间扫描成像,将二维荧光图像信号转化为一维的时间信号。共聚焦扫描成像技术将聚焦照明和空间滤波探测相结合,只让来自于焦平面的荧光信号通过,从而抑制掉该焦面之外产生的背景及激发光散射噪声。这

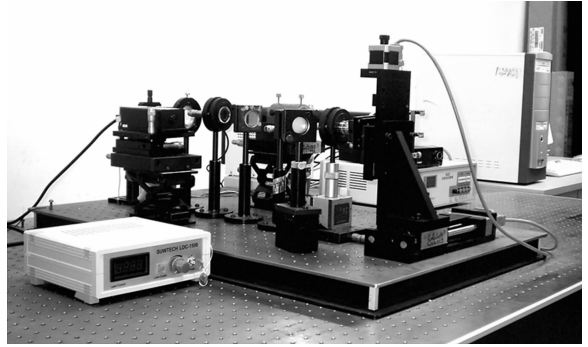


图 1 实际实验系统照片

Fig. 1 Photo of the whole experiment system

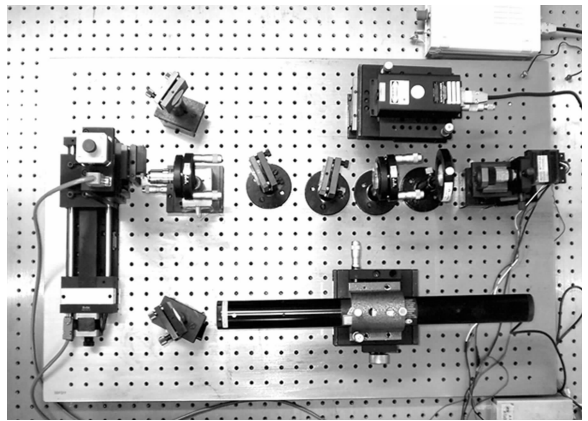


图 2 实际实验光学系统俯视图

Fig. 2 Front view of optical train

种高选择性探测技术,减少了影像模糊,可有效增加分辨率及图像的对比度和信息量^[3-4]。

Cy_3 和 Cy_5 的激发峰值波长分别为 530 nm 和 630 nm,发射荧光的峰值波长分别为 570 nm 和 670 nm。本系统光源选用波长为 532 nm 的绿光半导体激光器和波长为 632.8 nm 的红光 He-Ne 激光器,功率均为 5 mW。购买的产品分别为上海冠威光电有限公司的 DPGL-2050F+LDC-800 型号和美国 MELLES GRLOT 公司的 25-LHP-991-230 型号激光器。

以 Cy_3 检测为例介绍系统的工作原理。绿光激光器发射的 532 nm 激光经准直后,入射到窄带带阻全息滤波片 OF-1 后被衍射到物镜 1,再聚焦到生物芯片表面以激发荧光染料 Cy_3 ,激发出的荧光和被生物芯片前表面部分反射的激发光被物镜 1 收集后又返回 OF-1,其此时又充当窄带干涉滤波片来滤除其中的激发光,只让荧光信号通过。为了进一步滤除激发光,采集信号再次通过窄带带阻全息滤波片 OF-3,以进一步滤除激发光

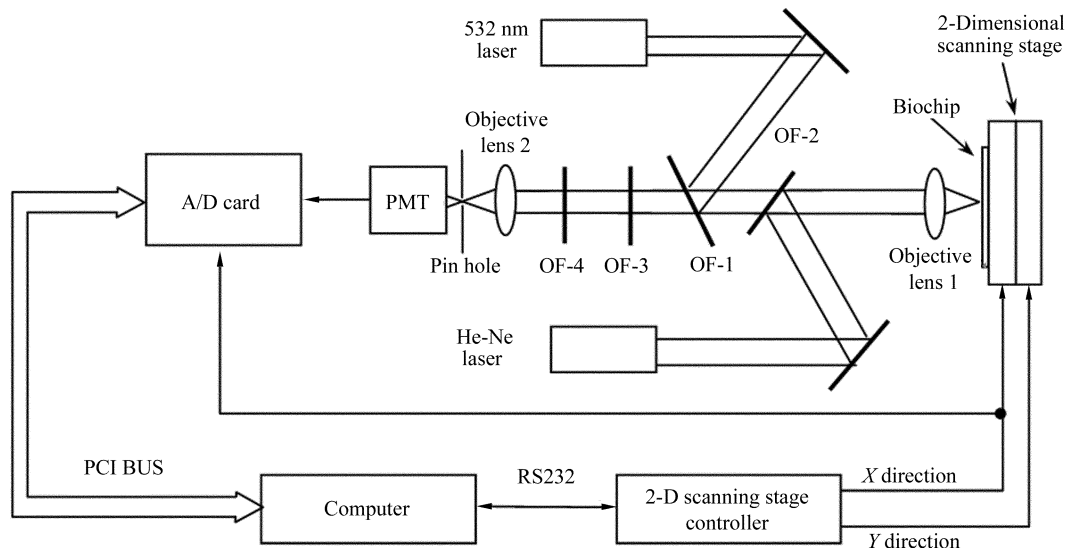
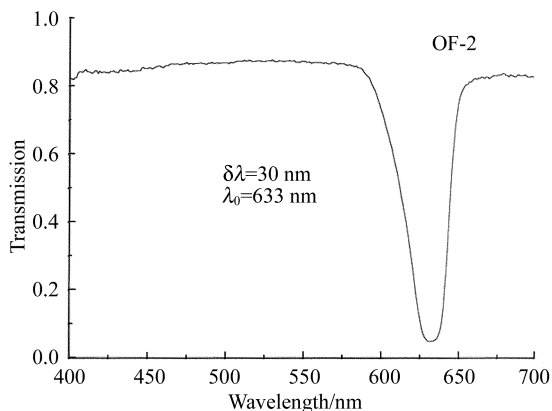


图 3 双荧光激光共聚焦测量系统原理图

Fig. 3 Schematic diagram of dual-fluorescence laser scanning confocal system for microarray analysis

所造成的系统背景噪声。

采集信号经过物镜 2 被聚焦,然后通过放置在物镜 2 焦点处的针孔(50 μm)被 PMT 采集转换成相应的模拟电信号。针孔的作用是滤除焦平面外反射的激发光及其他杂散光,故能有效提高测量系统的信噪比和分辨率。针孔尺寸需要认真选择,理论上存在一最佳值,但实际上由于激发光光斑尺寸的不确定性,需要针对实际系统在实验中进行选择。本系统在具体实验中在采用低于 50 μm 的针孔时,荧光信号功率降低;而采用高于 50 μm 针孔时,背景光增强,信噪比降低,因此针对本系统选用 50 μm 针孔较为合适。物镜 1 的数值孔径选用 0.6,可获得较高的荧光收集效率,从而提高检测灵敏度。

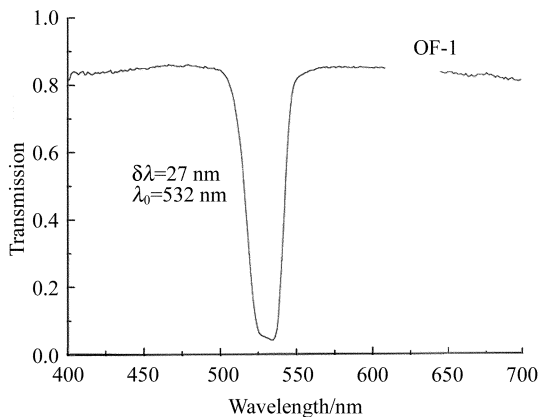


(b)OF-2 透过率曲线

(b) Transmittance of OF-2

图 4 测试得到的窄带全息滤光片透过率曲线

Fig. 4 Transmittance of volume holographic notch filter



(a)OF-1 透过率曲线

(a) Transmittance of OF-1

用来激发 Cy_5 的 632.8 nm 激光由 OF-2 衍射进入测量光路,OF-4 进一步滤除散射的激发光。小孔后的光电倍增管将荧光信号转换成电信号并放大,光电倍增管采用滨松公司的 H7711-12 型产品,其光谱特性适合于 570 nm 和 670 nm 荧光信号。反射全息滤光片效率高、带宽窄、单峰性好、调谐性能好、成本低,优于干涉滤光片和双折射滤光片。另外由于全息滤光片能起到窄带激发滤光片和二色镜 2 个光学元件的作用,故将它们同时替代。本实验采用的全息滤光片是苏州大学信光所研制的重铬酸明胶高光学密度窄带全息滤

光片,光学密度大于 4 D、带宽小于 20 nm。图 4 为测试得到的透过率曲线。窄带全息滤波片的光学特性如表 1 所示^[5]。

表 1 窄带带阻全息滤波片光学特性

Tab. 1 Optical properties of volume holographic notch filter

标号	中心波长	半最大值全宽	中心波长衍射效率	入射角 θ_λ
OF-1	532 nm	27 nm	>95%	23°
OF-2	633 nm	30 nm	>95%	22°
OF-3	532 nm	18 nm	>95%	10°
OF-4	633 nm	30 nm	>95%	4°

2.2 二维扫描控制与数据采集系统

本系统采用了物动式的机械扫描方式对芯片进行二维扫描,这种扫描方法的优点在于实现方法简单、价格低廉,而且光轴方向与扫描方向始终垂直,显微物镜的成像质量只对轴上点有要求,像差校正简单^[6]。二维扫描台由 2 个垂直放置的电控平移台组合而成,控制器提供驱动信号控制平移台的步进电机实现二维扫描。控制器由单片机系统构成,可与主机通过 RS232 串口进行通信。扫描方式为往返扫描,即首先在 X 方向进行直线扫描,完成 X 向一行扫描后,Y 向跳至下一行后从反方向进行 X 方向扫描,以此重复。扫描时,由主机向控制器发送指令,包括扫描步距、步距数、扫描速度和扫描方向等,扫描过程由主机控制。

采用 NI 公司的 PCI-6013 型 A/D 采集卡进行荧光模拟信号采集。首先,为系统构造一个共同的参考地,然后利用差动放大器对荧光信号与参考地电压进行差动放大。这种电路连接方式主要考虑到荧光信号十分微弱,而差动输入电路可以有效滤除各种电磁噪声干扰和共模信号,有利于提高信噪比。采用控制器输出的步进电机时钟信号作为 A/D 采集卡的外部触发信号,在步进电机每走完一步后采集荧光信号。利用 DMA 的方式将采集数据以数据文件形式保存到硬盘中,供后续处理。

3 采用数学形态学处理扫描图像

图像处理包括图像重建和图像增强、滤波。图像重建是将 A/D 数据文件转换为 bmp 图像文件。通常生物芯片荧光信号非常微弱,原始图像

数据绝对值较低,与图像中背景的对比度不高。虽然在前述光学系统中采用了滤波片、针孔等滤除大部分的背景杂散光等,但仍有干扰信号。为有效去除噪声,更好地识别信号与背景,需对图像进行增强、滤波处理,以提高图像的对比度和清晰度。实验中采用数学形态学方法进行图像增强、图像滤波。

灰度图像的数学形态学有膨胀、腐蚀、开、闭等基本运算^[7]。开运算削去峰值,可消除散点和毛刺,使图像平滑;闭运算去除谷底值,通过选择适当的结构元素,可将两个临近目标连接起来,或者得到图像的某些外部轮廓线。因此,数学形态学中的形态开、闭运算可分别获得图像的峰值和谷值^[8]。

采集的图像中荧光点形状基本为圆形,直径为 50~300 像素。所以,结构元素形状确定为圆形,直径大小按增强和滤波两种不同处理而不同:对图像增强而言,要提取边缘上的峰值,选择范围不能太小即结构元素不能太小,故确定结构元素形状为圆形,直径大小取 10 个像素。图像滤波根据开、闭运算的特点,通过组合使用开、闭运算及选择合适的结构元素的大小,几乎能将所有的非目标特征去除,达到滤波效果。目标大小为 50~300 像素。图像中的噪声点及划痕等非目标特征点大小从几个像素到十几个像素不等,基本形状为圆或椭圆,故结构元素形状确定为圆形,直径大小取 2 个像素。具体处理步骤如下:

(1) 设图像为 f ,结构元素 B_1 直径大小确定为 10。对 f 开运算: f^{B_1} ;提取 f 峰值 f_1 : $f_1 = f - f^{B_1}$;对 f 闭运算: f_{B_1} ;提取 f 谷值 f_2 : $f_2 = f - f_{B_1}$;

2) 图像增强:保留峰值 f_1 、去除谷值 f_2 ,将使得信号与背景的对比增强,达到图像增强的目的。 $e = f + f_1 - f_2$,结果 e 为增强后的图像;

3) 图像滤波:对增强后的图像依次进行开、闭运算。确定结构元素 B_2 尺寸为 2,对图像 e 依次进行开、闭运算: $g_1 = e^{B_2}$, $g = g_{1B_2}$ 。结果 g 为滤波后的图像。

图 5 为 Cy_3 荧光图像及处理结果。可以看出,原始图像 f 灰暗;荧光点与图像背景对比度低。经增强处理后,荧光图像清晰可辨。经滤波后,图像中的噪声点去除,荧光图像光滑,形状保持不变;达到图像增强、滤波目的。

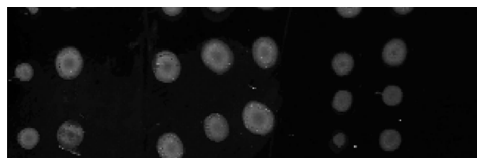
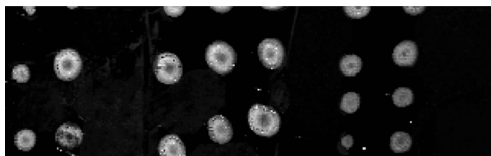
(a)原始图像 f (a)Original image f (b)增强后的图像 e (b)Enhanced image e (c)增强后的图像 g (c)Enhanced image g

图 5 荧光图像处理结果

Fig. 5 Process of enhancing the fluorescent images through morphology filtering

4 系统检测灵敏度测试

4.1 灵敏度的定义

灵敏度 S 是指扫描仪能够测定的最小荧光量的能力,通常用每平方微米能测定的荧光分子数来表示。在系统其他组件参数确定的情况下,增加荧光采集物镜(图 3 中 Lens 1)的数值孔径可以显著提高荧光采集效率;另外与小孔径激光扫描系统相比,其可以避免小孔径系统因采用高能激光提高激发荧光功率而导致的荧光信号被漂白,信噪比降低的情况,故能有效提高检测灵敏度。本实验系统中物镜 1(见图 3)采用的数值孔径大小为 0.6。实验中灵敏度 S 的计算采用式(1)方法计算^[9-10]。

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

其中取样量与荧光分子数浓度的乘积为待测的总荧光分子数,此值与点样面积相除后可得出点样

阵列的平均荧光分子数浓度,即待测玻片上每平方微米的平均荧光分子数浓度,然后再与检测信噪比相比即可得出此检测系统的检测门限,即所能测定的最小荧光分子数。由此完全可按此公式标定本检测系统的灵敏度。

4.2 原始荧光溶液荧光分子浓度的计算

由于当荧光基团的浓度过高时激发效率会受到影响,实验中选用了标记于蛋白分子上的荧光基团。购买的产品为美国 Jackson 公司的 CyTM3-conjugated * ChromPure Mouse IgG(whole molecule),此产品是将荧光分子 Cy₃ 标记于蛋白分子(小鼠的 IgG)上的 Cy₃ 荧光试剂(称之为 IgG-Cy₃)。实验中将一定浓度的标记有荧光基团的蛋白溶液点样于玻片上,然后根据所收集到的激光激发出的荧光的强度计算出单位面积上的荧光分子数,从而测定整个实验系统的灵敏度。

所购买的 IgG-Cy₃ 为固体粉末状,配置成溶液后方可使用。溶液的配置过程按照产品说明书:1.0 mg 的 IgG-Cy₃ 加入 0.5 mL 的双蒸水,完全溶解;然后加入 0.5 mL 的无水甘油,混合均匀。这样得到的 IgG-Cy₃ 溶液的浓度为 1 mg/mL,将该溶液称为原始 Cy₃ 荧光溶液,可分装后置于 -20℃ 长期保存。配置过程在暗室中进行,注意避光。

IgG 的分子量约为 160 000, Cy₃ 的分子量约为 750。IgG-Cy₃ 的每个 IgG 分子上标记有约 4.766 7 个 Cy₃ 分子,所以 IgG-Cy₃ 的分子量约为:

$$160\ 000 + 750 \times 4.766\ 7 = 163\ 575.025\ 0$$

所以 1 mg/mL 的 IgG-Cy₃ 溶液的摩尔浓度为:

$$\frac{1\ \text{mg/mL}}{163\ 575.025\ 0\ \text{g/mol}} \approx 6.113\ 4 \times 10^{-6}\ \text{mol/L}$$

所以此 IgG-Cy₃ 溶液的的分子个数浓度为:

$$(6.113\ 4 \times 10^{-6}) \times (6.022\ 05 \times 10^{23}) \approx 3.681\ 5 \times 10^{18}\ \text{IgG-Cy}_3/\text{L}$$

考虑到标记效率,可求得该溶液中的 Cy₃ 荧光分子浓度为:

$$3.681\ 5 \times 10^{18} \times 4.766\ 7 \approx 1.754\ 9 \times 10^{19}\ \text{fluor/L}$$

测试的 Cy₅ 荧光试剂是美国 Jackson 公司的

CyTM 5-conjugated * ChromPure Mouse IgG (whole molecule), 此产品是将荧光分子 Cy₅ 标记于蛋白分子(小鼠的 IgG)上(称之为 IgG-Cy₅)。Cy₅ 的分子量约为 790, 每个 IgG 分子上标记有约 2.86 个 Cy₅ 分子, 按同样方法配制原始 Cy₅ 荧光溶液, 其荧光分子浓度为 1.0606×10^{19} mol/L。

4.3 原始荧光溶液的稀释及浓度的计算

由于原始荧光溶液浓度太高, 必须将原始荧光溶液稀释后才能进行灵敏度测试。将原始荧光溶液稀释 100 万倍, $1 \mu\text{L}$ 溶液中 Cy₅ 荧光分子个数为:

$$1.7549 \times 10^{19} \text{ fluo/L} \times 10^{-6} \times 1 \mu\text{L} = 1.7549 \times 10^7 \text{ fluo}$$

将 $1 \mu\text{L}$ 该溶液点样在载波片上, 半径约为 1 mm , 则 $1 \mu\text{m}^2$ 面积上的荧光分子数为:

$$1.7549 \times 10^7 \text{ fluo} / [3.14 \times (1.0 \times 10^3)^2 \mu\text{m}^2] = 5.510 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$$

按同样方法对原始 Cy₅ 荧光溶液进行稀释和点样, 单位面积上的荧光分子数为 $3.378 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$ 。

4.4 系统噪声与信噪比

本实验系统的噪音主要来自 4 个方面, 一是在没有激发光时的系统噪音, 即暗电流噪音; 二是由于杂散光和未完全滤除的激发光引起的噪音; 三是读出噪音; 四是芯片本身引起的噪音^[1]。暗电流噪音主要是光电倍增管固有的噪音, 它是由热辐射和电子噪音等引起的, 可以通过降低其温度来降低暗电流。芯片本身的噪音是由芯片基材质的性质、片基的不均匀性、点样的不均匀性或芯片表面污染等造成的, 减少此类噪音的办法是选择高质量的玻片, 提高点样质量以及在洁净的环境下操作^[11-12]。

由于采集数据的信噪比可以表现为重构图像的清晰度, 故实验中用如下方法来确定影响扫描芯片图像质量的噪音程度。先进行图像分割确认出荧光信号点和背景区域^[13,14], 然后定义信噪比(SNR)的计算公式如式(2)。

$$\text{SNR} = \frac{\text{样点荧光信号值的均值}}{\text{背景区域值的标准差 SD}}, \quad (2)$$

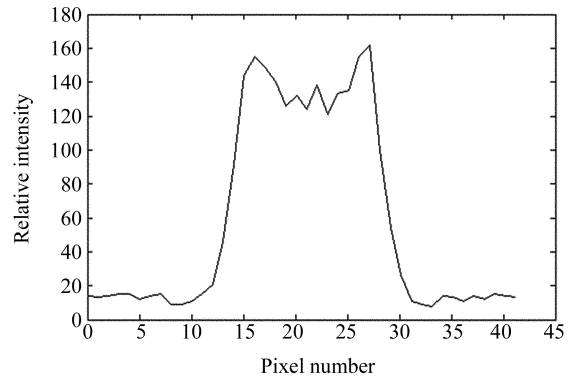
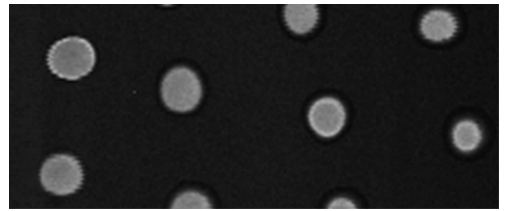
4.5 灵敏度测试结果

图 6(a)为 Cy₃ 试剂测试结果。Cy₃ 荧光信号

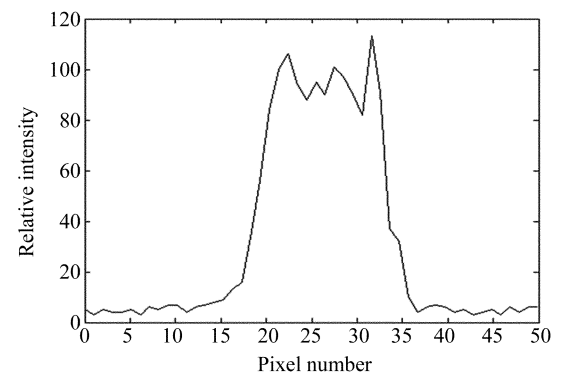
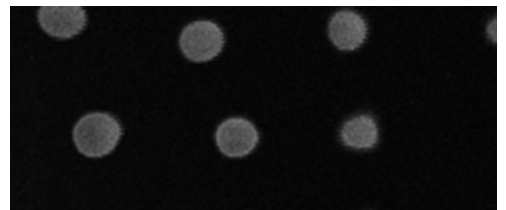
平均灰度值约为 140, 背景噪声的均方差约为 2.7, 则信噪比约为 51.9, 可得 Cy₃ 检测灵敏度为:

$$5.510 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2 / 51.9 = 0.106 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$$

图 6(b)为 Cy₅ 试剂测试结果。Cy₅ 荧光信



(a) Cy₃



(b) Cy₅

图 6 灵敏度测试图像及灰度曲线

Fig. 6 Images of testing result and their corresponding gray curves

号平均灰度值约为 90,背景噪声的均方差约为 2.5,则信噪比约为 36,可得 Cy_5 检测灵敏度为:

$$3.378 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2 / 36 = 0.094 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$$

故本系统的检测灵敏度可达到 $0.1 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$ 。

4.6 系统检测灵敏度的均一性验证

用相同浓度的荧光溶液分别均匀点样一个点阵,其中 Cy_3 为 4×2 的阵列, Cy_5 为 3×2 的阵列,点样浓度 Cy_3 为 $1.6922 \times 10^7 \text{ fluo}/\mu\text{L}$, Cy_5 为 $1.4143 \times 10^7 \text{ fluo}/\mu\text{L}$,每个样点点样量均为 $1 \mu\text{L}$ 。然后用本检测系统进行扫描检测,对得到的扫描图像进行偏差分析,图 7 和图 8 分别为 Cy_3 和 Cy_5 的横向和纵向荧光样点检测强度的分布。由程序计算得到 Cy_3 各样点信号均值的均方差为 3.1, Cy_5 各样点信号均值的均方差为 2.4。因此可以说明本检测系统的均一性良好。

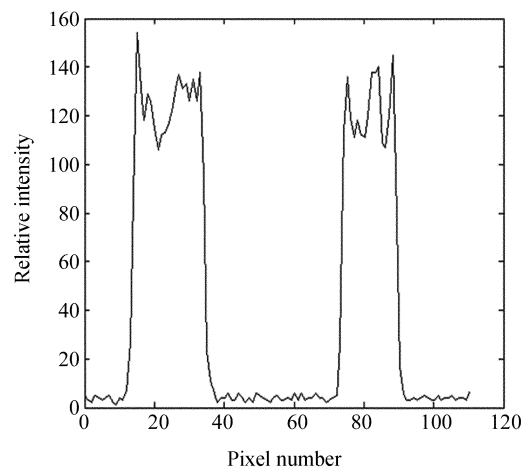
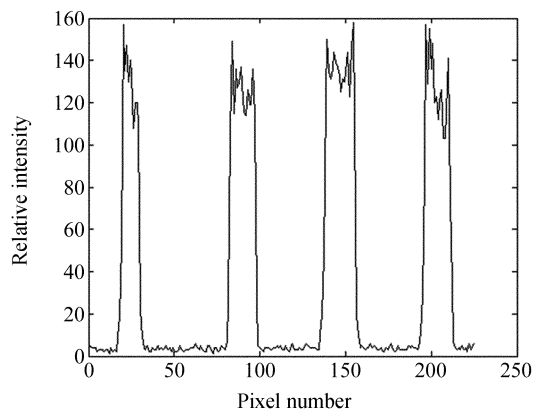


图 7 Cy_3 点样阵列横向及纵向荧光样点检测强度分布

Fig. 7 Widthways and lengthwise intensity variation of Cy_3 spots

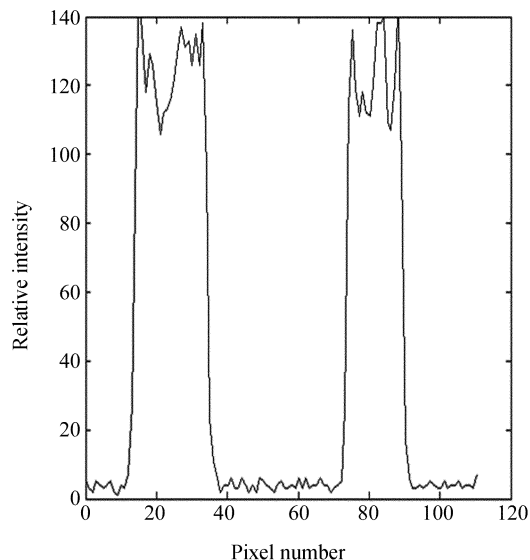
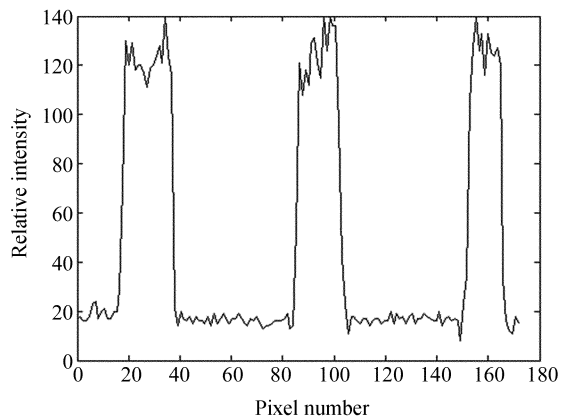


图 8 Cy_5 点样阵列横向及纵向荧光样点检测强度分布

Fig. 8 Widthways and lengthwise intensity variation of Cy_5 spots

5 结 论

实验结果证明本系统可以实现 Cy_3 与 Cy_5 荧光标记生物芯片的检测,检测精度达到了目前国内同类商业生物芯片扫描仪的最高检测精度,即 $0.1 \text{ fluo}/\mu\text{m}^2$;检测面积也符合国内外同类仪器的标准($22 \text{ mm} \times 75 \text{ mm}$)。检测系统共焦扫描光路中采用的大数值孔径(0.6)采集物镜有效提高了荧光采集效率,同时降低了激发光的功率从而减少了光漂白。本系统可同时满足常用的 Cy_3 (激发光波长为 530 nm 左右)和 Cy_5 (激发光波长为 630 nm 左右)的检测,当需要检测其它荧光试

剂时,根据采用窄带带阻全息滤光片光路设计所具有的良好扩展性,可方便地添加检测通道。本系统采用窄带带阻全息滤波片的光路设计,除了如 2.1 节中介绍的效率高、带宽窄、单峰性好、调谐性能好、成本低,优于采用干涉滤光片和双折射滤光片的光路设计外,此设计方案还可方便地切换多种荧光波长的检测,而只需一部 PMT,从而有效节省系统成本。

实验系统中采用形态学图像处理技术对原始图像进行增强、滤波处理后,图像质量显著改善。文中给出的实验数据均是在横向扫描步距 $10\ \mu\text{m}$

和纵向扫描步距 $100\ \mu\text{m}$ 的条件下的实验结果,如果横向和纵向均采用 $5\ \mu\text{m}$ 的扫描步距时,系统分辨率将会进一步得到提高。同时由于本实验系统是初步的实验装置,采用手动调焦方式使激发光聚焦到生物芯片前表面,而在实际应用中,由于玻片厚度的不一致,可能会出现离焦的情况,并导致激发光斑增大,降低横向分辨率;另外也可能由于芯片前表面与针孔的共轭关系被破坏,导致透过针孔能量的衰减,因此,增加自动调焦功能是必要的。另外通过提高带阻滤光片在激发光波长处的衍射效率,也可以进一步提高检测灵敏度。

参考文献:

- [1] SOUTHERN E M. Analyzing polynucleotide sequences[P], International Patent Application; PCT GB 89/00460, 1998.
- [2] 马立人,蒋中华. 生物芯片[M]. 北京:化学工业出版社,2002. 170-176
MA L R,JIANG ZH H. Biochip[M]. Beijing:Chemical Industry Press,2002. 170-176. (in Chinese)
- [3] GU M. *Principles of three-dimensional imaging in confocal microscopes*[M]. Singapore: World Scientific Publishing Co. Ltd., 1996. 288-290.
- [4] GRAVES D J,SU H J, ADDYA S, *et al.* Four-laser scanning confocal system for microarray analysis[J]. *Bio-Techniques*, 2002, 2(32): 346-354.
- [5] TIANCHUN Z, CE W, JIANHONG W, *et al.* A laser confocal scanning system with holographic filters used for genechip detection [J]. *Laser Journal*, 2003, 6(24):42-44. (in Chinese)
- [6] DRMANAC R, LABAT I, RUKET I, *et al.* Sequencing of megabase plus DNA by hybridization[J]. *Theory of the Method Genomics*, 1989,4:114-128.
- [7] 唐常青,吕宏伯,黄铮,等. 数学图形学方法及其应用[M]. 北京:科学技术出版社,1990:94-100.
TANG CH Q, LU H B, HUANG ZH, *et al.* *Mathematical morphologic and the application*[M]. Beijing: Scientific & Technical Publishers, 1990:94-100. (in Chinese)
- [8] 吴敏金. 图像形态学[M]. 上海:上海科学技术文献出版社,1991,160-183.
WU M J. *Morphologic image processing*[M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 1991:160-183. (in Chinese)
- [9] NICOLINI C, MALVEZZI M A, TOMASELLI A, *et al.* DNASER I: layout and data analysis[J]. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2002, 6(1): 67-72.
- [10] NAGARAJAN R, PETERSON CH A. Identifying spots in microarray images[J]. *IEEE Transactions on Nanobioscience*, 2002, 6 (1): 78-84.
- [11] SHERPPARD C J R, GU M, MAO X Q. Three-dimensional optical transfer functions in a reflection-mode confocal scanning microscope[J]. *Opt. Commun.*, 1991,81(5):281~284.
- [12] HESS K, KEITH W, BAGGERLY A, *et al.* Microarrays: handling the deluge of data and extracting reliable information[J]. *Trans. in Biotechnology*, 2001, 11(19): 463-468.
- [13] DRAZIC V. Dependence of two-and three-dimensional optical transfer functions on pinhole radius in a coherent confocal microscope[J]. *J. Opt. Soc. Am. (A)*, 1992,9(5):725-731.
- [14] 王立强,陆祖康,倪旭翔. 用于生物芯片荧光检测的共焦扫描装置[C]. 中国光学学会 2004 年学术大会论文集, 2004,16:138-142.
WANG L Q, LU Z K, NI X X. Scanning confocal system for fluorescence microarray analysis[C]. *Paper Collection of Chinese Optical Society 2004 Symposium*, 2004,16:138-142. (in Chinese).

作者简介:马军山(1967—),教授,1999年毕业于哈尔滨工业大学,获工学博士学位,2001年从中科院上海光学精密机械研究所光学工程博士后流动站出站,主要从事光学精密测量及光通信方面的科研工作,负责完成多项纵向课题,发表论文 30 余篇,其中 10 多篇被 EI 检索。

侯琳琳(1980—),女,山东人,上海理工大学硕士研究生,从事光电精密测试技术研究。