

用于管盖基因芯片荧光图像信息的采集及数据分析系统

刘全俊 周庆 白云飞 葛芹玉 陆祖宏*

(东南大学生物电子学国家重点实验室, 南京 210096. * 联系人, E-mail: zhlu@seu.edu.cn)

摘要 管盖基因芯片是将基因探针固定在特制的 Eppendorf 管盖内表面, 与内置杂交缓冲液贮液池的 Eppendorf 管一起构建的基因检测器件. 在这个全封闭的系统内, 可以完成基因扩增、荧光标记、芯片杂交及检测等一系列生物化学操作, 实现多基因高通量并行检测. 报道了用于管盖基因芯片的检测分析系统, 它包括光学检测平台、图像采集系统、图像分析系统及结果报告系统. 光学检测平台利用 NIKON 显微镜光学系统, 通过电荷耦合器件(CCD)进行图像的采集. 管盖基因芯片杂交后, 经过荧光信号被 CCD 捕获, 经通用串行总线(USB)传递给计算机. 图像经过旋转、去噪声点、图像分色、杂交信号计算、结果判定、有效性判定及结果输出. 用该系统成功地对呼吸道的 10 种病毒杂交结果进行了检测.

关键词 管盖基因芯片 图像处理 检测系统

基因芯片检测技术由于其高通量的检测能力, 越来越受到重视. 在细胞凋亡、肿瘤及常见疾病研究、毒理和药理等方面具有广泛的应用. 基因芯片把大量已知序列探针集成在同一个基片上, 经过标记的若干靶核酸序列通过与芯片特定位点上的探针杂交, 可以对生物细胞或组织中大量的基因信息进行分析^[1,2]. 目前, 主要的体系有 affymetrix 公司为主导的原位合成高密度基因芯片, 在 1 cm^2 的面积上合成上百万的核酸片段, 常用于基因表达水平、单碱基多态性(SNP)的研究. Illumina 公司以 Integrated Bead-Array System 技术实现了基因信息, 特别是 SNP 筛选的应用^[3]. 目前研究与使用最广泛的基因芯片主要是基于玻片或硅片的固定化核酸探针微阵列芯片. 基于玻片的基因芯片制作工艺相对简单、技术成熟. 但在使用过程中, 如果不采用完全封闭的杂交与清洗系统, 易造成基因扩增产物的扩散, 污染后续样品, 造成假阳性检测结果. 由于基因芯片的检测系统要求较高, 检测过程的操作复杂, 并且需要在完善的实验室条件中进行检测, 限制了基因芯片在临床检验中的应用.

我们开发了一种新的集基因扩增、扩增产物荧光标记、基因芯片杂交、清洗与荧光检测于一体的管盖基因芯片, 可以将以上步骤在一个完全封闭的体系中完成. 其主要特点是将基因检测探针固定在特制的 Eppendorf 管盖的内表面, 同时在管体的中部内置一个杂交缓冲液贮液池. 管盖基因芯片对多基因检

测时所需要的基因扩增、荧光标记、芯片杂交及信号检测均可在同一封闭的 Eppendorf 管中完成, 可以避免扩增产物的外泄而引起的后续样品检测的假阳性信号, 具有操作简单、容易控制实验室污染、结果重现性好等特点, 因此具有广泛的应用前景.

目前大部分生物芯片采用荧光染料标记, 主要使用共焦扫描荧光技术进行杂交信号检测. 检测过程是通过芯片的 X-Y 移动进行二维点阵扫描, 检测器通常是光电倍增管(PMT). 适用于大规模 DNA 芯片杂交信号检测, 广泛应用于基因表达分析研究^[4~7]. 在荧光信号检测方面, 主要研究仍然集中在提高检测分辨率和拓宽荧光光谱的检测范围, 如 Sinclair 等^[8]设计的扫描仪能够使用 $3\sim 30\text{ }\mu\text{m}$ 的分辨率在 $490\sim 900\text{ nm}$ 范围内进行荧光检测, 芯片扫描仪的研究推动了包括基因芯片在内的微阵列芯片的广泛应用. 目前商业扫描仪的设计主要有两大类, 一类是用于以标准玻片为载体的基因芯片扫描仪, 如 Cartican, AXON 系统, 国产的有北京博奥公司和中国科学院成都光电技术研究所研制的微芯扫描仪等系统; 另一类如惠普公司为 Affymetrix 产品和 Illumina 公司为其自己产品研制的专用基因芯片扫描系统^[11,12]. 前者具有较好的适应性; 但后者只能扫描特定的基因芯片. 上述基因芯片扫描系统主要是采用基于激光共聚焦原理开发的, 扫描精度高于 $10\text{ }\mu\text{m}$, 荧光检测下限是 $0.1\text{ 荧光分子}/\mu\text{m}^2$, 适应于基因表达水平等大规模基因检测的要求. 但这种基因芯片扫描仪不能用于管盖

基因芯片.

由于管盖基因芯片相对于标准玻片是一个异型器件, 目前尚没有合适的基因芯片扫描仪对其图像进行采集; 因此, 本实验室研制和开发了用于管盖基因芯片的荧光图像信息的采集及数据分析系统.

1 管盖芯片及其检测方案

1.1 管盖芯片结构

管盖基因芯片是将标准的基因扩增管——200 μL Eppendorf 管原来的穹窿型的管盖, 经特别的加工后, 将管盖形成了一个平面窗口的管盖. 新加工的管盖能够与 Eppendorf 管形成紧密的密封, 并且在管盖的内表面上经过改性, 固定了多种核酸探针, 形成了探针微阵列——基因芯片, 并且在基因扩增管内置了一个小的杂交缓冲液贮液池, 用于贮存杂交液(图 1).

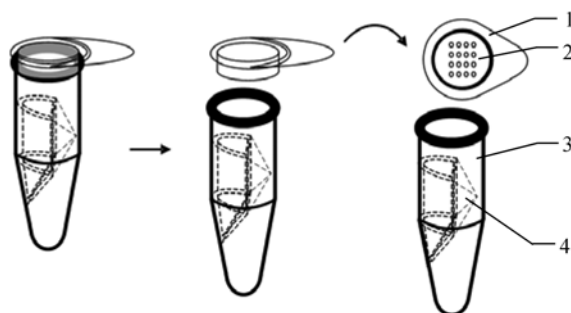


图 1 管盖基因芯片结构图

1, 经过改造后的基因扩增管管盖; 2, 管盖的内表面上固定的基因探针;
3, 基因扩增管的管体; 4, 管盖基因芯片系统中的杂交缓冲液贮液池

1.2 系统框架

检测系统分为硬件系统和软件系统. 硬件系统有光学系统、图像采集系统和信号传递系统等 3 个部分组成. 软件系统分为图像采集、图像矫正、图像预处理、半自动匹配、有效性验证、杂交强度计算及结果判定等 7 个子系统, 如图 2(a)所示.

图像采集工作原理: 汞灯光源经过聚光, 滤除红光及红外线后, 经入射滤光片滤除其他波长的光线后, 经过二色镜反射至物镜组, 通过物镜后照射到管盖上, 杂交点的荧光基团被其激发并发出荧光, 通过物镜和二色镜到数字相机, 其信号被数字相机捕获. 图像信号被计算机所读取后存贮于计算机硬盘中, 然后由图像分析软件对图像进行图像矫正、图像预处理、半自动匹配、有效性验证、杂交强度计算及结果

判定等步骤的处理, 并可输出相应的检测结果.

1.3 管盖基因芯片检测系统的结构

NIKON 荧光显微镜具有稳定、可靠、易于操作和调节等特点, 管盖基因芯片检测系统的光学部分采用的是 NIKON E200 显微镜的光学器件, 使用电荷耦合器件(CCD)进行图像的采集. 其结构与实物图如图 2(b)所示. 光学系统由光源、透镜组、滤色片组和机械部分组成. 光源系统采用 100 W 汞灯, 并使用与 NIKON 显微镜配套的光源校准系统, 而滤色片使用的是 488 nm 低通滤色片, 1 个二相色镜和 1 个 520 nm 高通滤色片. 物镜采用的是 NIKON10 倍荧光物镜.

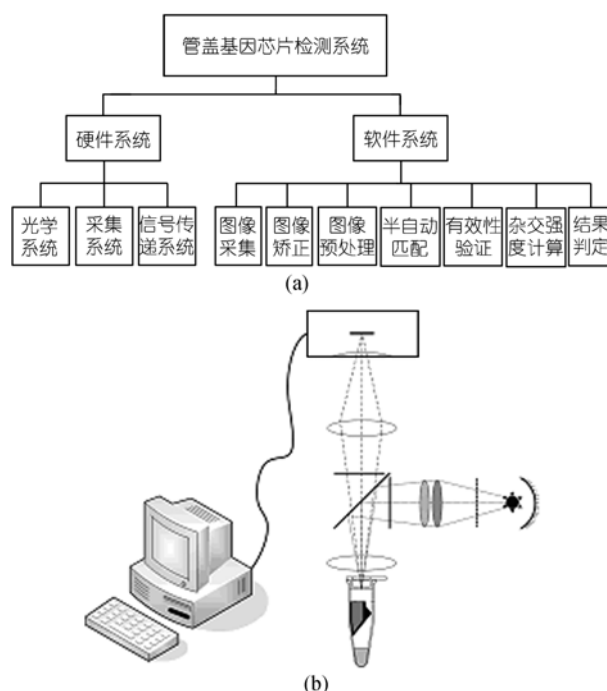


图 2 管盖基因芯片检测系统的结构

X-Y 移动平台, 本系统的光学移动平台是提供给多个管盖基因芯片轮换观察使用的, 在每一个管盖基因芯片检测时不需要移动检测对象, 一次采图就可完成对单一管盖基因芯片的图像采集. 在实际使用中, 我们发现使用普通数码相机可以满足需要, 根据软件开发需求, 我们选用提供了软件开发包 OLYMPUS C-5060 的数字相机, 像素为 500 万. 在图像中有 2592×1944 像素的分辨率, 在管盖基因芯片的点阵上, 每个点至少可有 10×10 点的数字信号, 为下一步的杂交信号分析提供了足够的信息.

2 管盖基因芯片分析系统(GAS)

2.1 图像矫正

由于数字相机的位置、样本放置的位置带来图像的旋转误差,所以 GAS 系统要矫正采集的图像的旋转误差,系统提供手动的方法进行图像(旋转)矫正. GAS 自动设置一些网格标尺,帮助用户方便地通过鼠标进行图像(旋转)矫正.

2.2 图像预处理

图像预处理的目的是减少污点、噪声以及各种影响因素的干扰,提高图像的质量,从而提高后面分析的准确性.

图像预处理包括处理区域裁剪、滤除整体背景以及消除点噪声等.在预处理中,最基本的一个准则是尽量保证图像的有用信息不丢失.

(1) 处理区域裁剪.由于采集的图像中只有部分区域包含信息,所以我们先根据芯片的类型确定采集的范围,将包含信息的图像区域裁剪出来,以提高处理的速度.

(2) 滤除整体背景.由于采集的图像含有大量的背景信号(比如光源等引起),所以要先进行滤除.背景滤除的方法是将图像中的 RGB 三色分离,在使用 FAM 作为荧光标记基团时, R 色的图像值小于 10,而 B 色与 G 色的均表现出了光学不均现象,数字化图像的中央值大于周围值,荧光信号以 G 色为主.但在图像中, B 值表现为背景值.所以以 G-B 值为信号值.这样对整体背景的降低及图像信号均匀性提供了基础.

(3) 消除点噪声.图像滤波方法有两种:平滑滤波和中值滤波.

平滑滤波是通过将每个像素的光密度值 $f(x,y)$ 与周围各个像素光密度的平均值作比较,如果与平均值的差异在一定的范围内,则处理后的光密度值 $g(x,y)$ 不改变,如果过大或过小,则用平均值代替.即

$$g(x,y) = \begin{cases} \frac{1}{N \times N} \sum_{(x,y) \in S} f(x,y), & \text{If } |f(x,y) - \sum_{(x,y) \in S} f(x,y)| > T \\ f(x,y) & \text{others} \end{cases} \quad (1)$$

其中, S 表示 $N \times N$ 大小的平滑窗口, T 表示阈值.这种方法的滤波效果取决于平滑窗口的大小.如果平滑窗口较小,往往只能消除比较尖细的刺峰干扰.对于比较粗的刺峰干扰,必须通过扩大平滑窗口的尺寸

加以滤波.但随着平滑窗口尺寸的增加,整个芯片图像的光密度值降低,有用信号被大大地衰减.我们知道突变型芯片的分析主要依赖于有突变发生的信号与完全匹配信号之间的荧光强度差异,如果差异的区分度降低了,就很难判断是否有突变发生.所以平滑滤波是以牺牲重要的信息为代价实现滤波的,无法确保后面分析的准确性.

中值滤波就是用一个有奇数点的滑动窗口,将窗口中心点的光密度值用窗口内各个像素点光密度值的中值代替.即

$$g(x,y) = \text{Med}_{(x,y) \in S} \{f(x,y)\}. \quad (2)$$

中值滤波是一种非线性滤波器.它利用局部中值替代了局部平均,在一定条件下可以克服线性滤波器(如平滑滤波)所带来的图像细节模糊,而且对滤除脉冲干扰及图像扫描噪声最为有效.对于芯片图像而言,中值滤波的效果比较理想,但仍存在一个不足.由于杂交反应的扩散性,芯片图像上的像素点分布并不均匀,一个亮的像素点可能紧接着一个比较暗的像素点,它们对于分析都很重要,在滤除噪声时应尽量减少对这些有用信号的淹没.而中值滤波在处理这种细节比较多的图像时,具有一定的局限性.

2.3 半自动匹配

对于大多数芯片来说,往往通过机械点样的方法制备,图像上的目标点排列规则,形状呈圆状或方形,所以我们采用最常用的人机交互的半自动网格定位方法,即通过手工输入芯片参数,产生大致的粗网格,然后再通过基于形状、亮度、方向敏感性的自动搜索方法进行精确定位.

粗网格的定位方法有两种:三角确定法和点线法.三角确定法是输入芯片的行数、列数以及芯片三个角(左上角、右上角、左下角)点的位置、形状、大小,通过公式自动生成网格,使每个网格中包括一个目标点.假设行数为 Row,列数为 Column,左上角、右上角、左下角的坐标分别为(LeftTopX, LeftTopY), (RightTopX, RightTopY), (LeftBottomX, LeftBottomY), 则第 i 行、第 j 列的信号点中心位置 (X,Y) 为

$$X = \text{LeftTopX} + j \times \text{StepX} + i \times \text{MinStepX}, \quad (3)$$

$$Y = \text{LeftTopY} + i \times \text{StepY} + j \times \text{MinStepY}, \quad (4)$$

$$\text{StepX} = (\text{RightTopX} - \text{LeftTopX}) / (\text{Column} - 1), \quad (5)$$

$$\text{StepY} = (\text{LeftBottomY} - \text{LeftTopY}) / (\text{Row} - 1), \quad (6)$$

$$\text{MinStepX} = (\text{LeftBottomX} - \text{LeftTopX}) / (\text{Row} - 1), \quad (7)$$

$\text{MinStepY} = (\text{RightTopY} - \text{LeftTopY}) / (\text{Column} - 1)$, (8)
其中 StepX , StepY 分别表示列间间距、行间间距,
 MinStepX , MinStepY 是 X 方向和 Y 方向的微调间距
(图 3). 这种三角确定的方法通过 MinStepX , MinStepY
可以克服信号点位置发生角度偏转所带来的位置
偏差. 但如果 3 个角的信号点为暗点, 三角确定法
就不适用了.

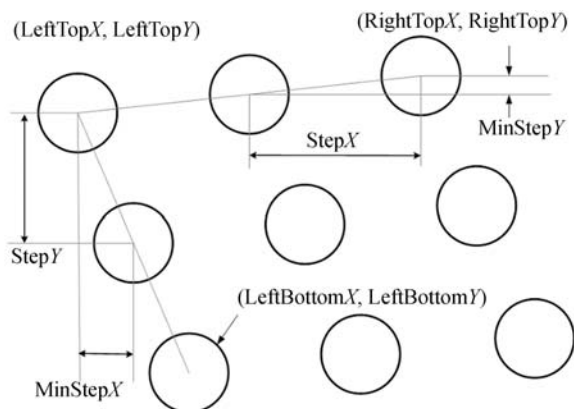


图 3 三角确定法示意图

为此我们又提出点线法确定粗网格位置(图 4).
点线法是通过标尺工具测得 X, Y 方向的间距, 然后利
用公式(10)~(13)求得每个信号点的中心位置. 设 X 方
向间距为 SpaceX , Y 方向间距为 SpaceY , 图像高度为
 ImageHeight , 宽度为 ImageWidth , 则第 i 行、第 j 列
的信号点中心位置 (X, Y) 为

$$X = \text{StartX} + j \times \text{SpaceX}, \quad (9)$$

$$Y = \text{StartY} + i \times \text{SpaceY}, \quad (10)$$

$$\text{StartX} = [\text{ImageWidth} - (\text{Column} - 1) \times \text{SpaceX}] / 2, \quad (11)$$

$$\text{StartY} = [\text{ImageHeight} - (\text{Row} - 1) \times \text{SpaceY}] / 2, \quad (12)$$

其中 $(\text{StartX}, \text{StartY})$ 为第一个信号点的中心位置. 点

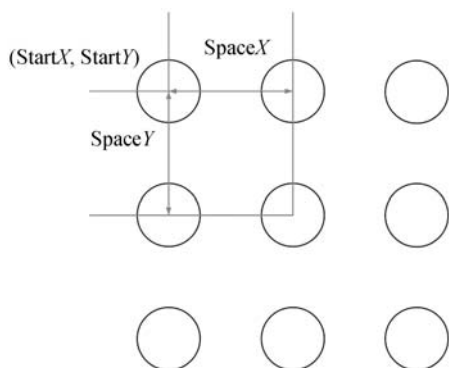


图 4 点线法示意图

线法的输入参数简单, 只需确定 X, Y 方向的间距, 但
由于间距以像素为单位, 累积误差比较大. 三角确定
法和点线法各有利弊, 应视具体芯片图像的特点选
择适当的方法.

粗网格定位后, 需要通过基于形状、亮度、方向
敏感性的自动搜索方法进行精确定位. 该定位方法
的基本思想是对于每个信号点确定一搜索范围, 将
该范围内最亮的圆形或方形区域作为目标信号点的
区域. 设 $(\text{LeftTopX}, \text{LeftTopY}, \text{RightBottomX}, \text{RightBottomY})$ 是第 i 行, 第 j 列信号点的当前区域, Radius 为
搜索半径, SenX , SenY 分别是 X, Y 方向的敏感性参数,
则最佳区域为搜索范围 $(\text{LeftTopX} + j \times \text{SenX} - \text{Radius},$
 $\text{LeftTopY} + i \times \text{SenY} - \text{Radius}, \text{RightBottomX} + j \times \text{SenX} +$
 $\text{Radius}, \text{RightBottomY} + i \times \text{SenY} + \text{Radius})$ 内荧光强度最
亮的大小为 $(\text{RightBottomX} - \text{LeftTopX}) \times (\text{RightBottomY} -$
 $\text{LeftTopY})$ 的长方形或半径为 $(\text{RightBottomX} - \text{LeftTopX}) / 2$
的圆形区域. 自动搜索方法对噪声比较敏感,
因此搜索时必须注意搜索范围的设定.

2.4 杂交强度计算

荧光信号计算的可靠性在很大程度上依赖于计
算方法的选择. 我们计算荧光信号的方法有两种: 平
均法和中值法. 平均法是一种广泛使用的统计方法,
它将信号点区域内所有像素点光密度的平均值减去
该信号点的背景值作为该点的荧光强度. 设 S_j 为第 j
个信号点区域, N 表示属于该信号点区域的像素点个
数, $f(n)$ 表示第 n 个像素点的光密度值, B_j 表示第 j
个信号点的背景强度, 则第 j 个信号点的荧光强度为

$$F_j = \frac{\sum_{n \in S_j} f(n)}{N} - B_j. \quad (13)$$

平均法的优点在于方法简单, 运算速度快, 它代表
了整个信号点的总体特征, 所以该方法对于光密度分
布均匀或不均匀的信号点都很适用. 但如果信号点
区域误含了较多的背景点, 平均法的准确性就会降
低.

中值法是将信号点区域内的像素按光密度值从大
到小排列, 选择位于中间位置的光密度值, 将其与背
景值的差值作为信号点的荧光强度. 用公式表示如下:

$$F_j = \text{Med}_{n \in S_j} f(n) - B_j. \quad (14)$$

中值法由于要进行排序, 所以运算速度慢. 同时对于
光密度分布不均匀的信号点, 中值法易受光密度分
布情况影响, 所确定的信号荧光强度不稳定, 可能大

可能小,并且该值不能反映整个信号点的特征,所以中值法不适合处理不均匀信号点.特别是如果信号点区域误含了较多的背景点,中值法可能将信号点的荧光强度取为背景值,致使计算出错.所以为了确保计算的可靠性,一般不采用中值法.

为了降低背景点的干扰,我们提出了二次滤波的方法来计算信号点的荧光强度.二次滤波法是在平均法计算结果的基础上,通过一定的判别准则来筛选信号点区域内的真实信号点,然后将真实信号点的平均值与背景的差值作为信号点的荧光强度.二次滤波法的关键在于判别准则的选择.一般采用以下3个判别准则:

(1) 如果信号点区域内的某个像素点的光密度值大于背景值,则认为该像素点是真实的信号点,否则是背景点.

(2) 如果信号点区域内的某个像素点的光密度值大于阈值 T ,则认为该像素点是真实的信号点;否则是背景点. $T = k \times M$. M 是信号点区域内所有像素点的平均值, k 是可信度因子,通过 k 调节阈值大小,使其能适应不同的芯片图像.

(3) 设 S_j 为第 j 个信号点区域, N 表示属于该信号点区域的像素点个数, $f(n)$ 表示第 n 个像素点的光密度值, M 表示信号点区域内所有像素点的平均值, k 为控制因子,则判别准则为

$$I = \begin{cases} 1 & \text{if } |f(n) - M| \leq k \times \text{mad} \\ 0 & \text{other} \end{cases} \quad (15)$$

$$\text{mad} = \frac{\sum_{s \in S} |f(n) - M|}{N}.$$

如果 I 为 1,则表示第 n 个像素点是真实信号点;否则为背景点.

上述 3 个准则分别建立在背景(准则 1)、平均值(准则 2)、方差(准则 3)的基础上.从准确性来讲,准则 3 最精确,因为真实的信号点应该是在平均值附近波动的,但准则 3 运算比较复杂.具体采用何种判别准则,还应视芯片图像的特点而定.但二次滤波的方法可能将不均匀信号点区域内的比较暗的信号点当作背景点处理,从而使信号点的荧光强度偏亮.

2.5 有效性验证

实验中由于各种情况,比如样品中核酸纯化效率低、RT-PCR 酶失效、引物失效、探针固定不好而引起的探针脱落、试剂保存问题、荧光试剂失效而引

起的杂交信号缺失的假阴性结果等产生芯片实验结果失效, GAS 通过验证标准样点是否符合一定的荧光值及相应的信噪比来判断实验是否有效.

2.6 检测实例

我们制备了 SARS、副流感 I、肠病毒、风疹、副流感 III、流感 B、麻疹、RSV、鼻病毒、流感 A 等 10 种病毒的 12 种探针(其中 SARS 有 3 个探针),固定在本实验室制备的管盖内侧的琼脂糖膜的表面(图 5).在管盖基因芯片的杂交缓冲液贮液池中贮存杂交液,在基因扩增管的底部加入多重基因扩增的体系.将 SARS、肠病毒、流感 A 等 3 种病毒的 RNA 混合后,加入管盖芯片的管底部,并用管盖密封整个体系.在 MJ PTC200 型 PCR 仪上进行多重基因扩增、荧光标记,整个管盖基因芯片倒置后,基因扩增管与杂交缓冲液贮液池中的溶液在管盖部位混合,基因扩增的产物与基因芯片进行杂交,30 min 后经短时离心,杂交混合液离开管盖部位,得到杂交完成的管盖基因芯片.

阳性	SARS	副流感 III	肠病毒	风疹	副流感 I	流感 B
阴性	麻疹	RSV	SARS	SARS	鼻病毒	流感 A
阳性	阴性	阳性	阴性	阳性	阴性	阳性
阴性	流感 A	鼻病毒	SARS	SARS	RSV	麻疹
阳性	流感 B	副流感 I	风疹	肠病毒	副流感 III	SARS

图 5 各探针的分布相对位置图

使用该检测系统对管盖基因芯片进行表征,通过检测系统对管盖基因芯片的杂交结果进行捕获、转存(图 6(a))、经过图像矫正(处理区域裁剪、滤除整体、背景消除点噪声)(图 6(b))、半自动匹配(图 6(c))、有效性验证等处理步骤,得到了处理的杂交结果. SARS 阳性、肠病毒、流感 A 等 3 种病毒是阳性,其中 SARS 有两个探针的杂交结果是阳性,1 个探针的杂交结果是阴性(探针设计参照相关文献^[9,10]),符合中国国家疾病预防控制中心及美国疾病控制预防中心(CDC)关于 SARS 检测的指导意见.

3 结论

成功地研制开发了对非玻片基因芯片——管盖基因芯片的检测系统.管盖基因芯片的特点是基于常用的基因扩增管——Eppendorf 管的改进,并在管盖的内侧面固定基因芯片的探针.应用管盖基因芯片进行的基因检测技术,是在一个封闭的体系内完成基因扩增、产物的标记、杂交及荧光信号检测的新

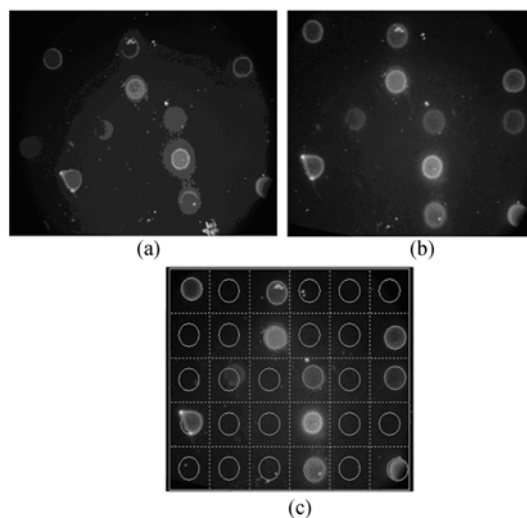


图 6 管盖基因芯片的检测结果及 GAS 系统分析结果

(a) 检测系统对管盖基因芯片的杂交结果进行捕获、转存; (b) 图像矫正(处理区域裁剪、滤除整体、背景消除点噪声); (c) 半自动匹配

技术. 该管盖基因芯片及其检测系统具有多病原体高通量的检测能力, 可实现 10 种病毒的同时检测分析. 该技术也可根据需要设计可进行更多病原体同时检测的芯片产品. 完成检测只需要使用常规的分子生物学实验室仪器及本文报道的管盖基因检测系统. 在检测完成以后, 封闭的基因扩增管连同基因扩增的产物以及医疗垃圾的处理, 不会带来交叉污染. 具有通用性好、重现性好、操作简单等优点.

由于需要将基因扩增管及基因芯片组合在一起进行杂交信号的检测, 体积较大, 没有现成的基因芯片扫描仪. 由于我们管盖基因芯片的阵列数一般不超过 100, 检测范围较小, 因此以 CCD 相机的荧光显微镜为探测装置的核心, 无须扫描传动平台. 由于不需要逐点激发探测, 激发光照射光场为整个芯片区域, 并由 CCD 相机获得整个 DNA 芯片的杂交结果.

我们还开发了管盖基因芯片的杂交信号处理软件, 为使用者提供了一种成套的系统解决方案. 在软件中集成了图像采集、图像处理、杂交结果判定、图像及结果贮存、检测样本数据库、分级管理等组成部分. 该系统减少了操作者的技术要求, 可极大地提高临床检验的效率. 经过设置基因的阴性和阳性内标以及杂交信号的判别和有效性验证后, 系统能够将实验结果给出以下结论之一: 试剂不合格, 并给出不合格代码; 纯化步骤不合格; 基因扩增标定不合格; 检测结果阴性; 检测结果阳性, 并给出阳性结果. 以上结果输出时, 提供检测结果的图像、操作者代码、检测的详细数字化结果、检测对象的基本信息等. 同

时, 本系统开发的软件为以后的医院或相关检测单位提供了网络数据接口, 可以非常方便地进行软件的性能提高, 为数字化医疗提供了一个新的平台.

本文报道的管盖基因芯片检测仪, 取代了普通基因芯片荧光扫描仪的复杂而昂贵的 X-Y 扫描、共聚焦方法和光电倍增管检测技术, 降低了仪器的使用复杂性和成本, 提高了基因芯片检测的智能性, 有利于基因芯片技术在实际现场检测和临床诊断中推广使用.

致谢 本工作为国家高技术研究发展计划(批准号: 2003AA2Z2007)和国家自然科学基金(批准号: 60341002)资助项目.

参 考 文 献

- 1 Gerhold D, Rushmore T, Caskey C T. DNA chips: promising toys have become powerful tools. *Trends in Biochemical Sciences*, 1999, 24(5): 168~173
- 2 Khan J, Bittner M L, Chen Y D, et al. DNA microarray technology: the anticipated impact on the study of human disease. *Biochimica et Biophysica Acta-Reviews on Cancer*, 1999, 1423(2): M17~M28
- 3 Oliphant A, Barker D L, Stuelpnagel J R, et al. BeadArray (TM) technology: Enabling an accurate, cost-effective approach to high throughput genotyping. *Biotechniques*, 2002, 32(Suppl): S56~S61
- 4 Shalon D, Smith S, Brown P. DNA microarray system for analyzing complex DNA samples using two-color fluorescent probe hybridization. *Genome Res*, 1996, 6(7): 639~645
- 5 Guo Z, Guilfoyle R A, Thiel A J. Direct fluorescence analysis of genetic polymorphisms by hybridization with oligonucleotide arrays on glass supports. *Nucleic Acids Res*, 1994, 22(24): 5456~5465
- 6 Heller R A, Schena M, Chai A, et al. Davis discovery and analysis of inflammatory disease-related genes using cDNA microarrays. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6): 2150~2155[DOI]
- 7 Lashkari D A, DeRisi J L, McCusker J H, et al. Yeast microarrays for genome wide parallel genetic and gene expression analysis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(24): 13057~13062[DOI]
- 8 Sinclair M B, Timlin J A, Haaland D M, et al. Design, construction, characterization, and application of a hyperspectral microarray scanner. *Applied Optics*, 2004, 43(10): 2079~2088[DOI]
- 9 Drosten C, Gunther S, Preiser W, et al. Identification of a novel coronavirus in patients with severe acute respiratory syndrome. *N Engl J Med*, 2003, 348(20): 1967~1976[DOI]
- 10 Yam W C, Chan K H, Poon L L M, et al. Evaluation of reverse transcription-PCR assays for rapid diagnosis of severe acute respiratory syndrome associated with a novel coronavirus. *J Clin Microbiol*, 2003, 41(10): 4521~4524[DOI]
- 11 Fodor S P, Read J L, Pirrung M C, et al. Light-directed, spatially addressable parallel chemical synthesis. *Science*, 1991, 251: 767~773
- 12 Fodor S P, Rava R P, Huang X C, et al. Multiplexed biochemical assays with biological chips. *Nature*, 1993, 364: 555~556[DOI]

(2005-03-26 收稿, 2005-08-29 接受)