

文章编号: 0258-7025(2010)02-0505-05

基因芯片荧光靶点阵列图像 CCD 扫描采集系统

刘 军^{1,2} 赵吉宾¹ 刘伟军¹ 王天然¹

(¹ 中国科学院沈阳自动化研究所, 辽宁 沈阳 110016)
² 中国科学院研究生院, 北京 100049

摘要 为提高芯片图像扫描采集效率, 研制了一种基因芯片荧光靶点阵列图像 CCD 扫描采集系统, 通过将落射式荧光显微镜、紫外荧光激发光源、精密电控平移台和半导体制冷 CCD 相机等仪器进行有效集成构建成像扫描机构, 以工业控制计算机(IPC)为测控核心, 实现了显微镜自动调焦控制、荧光靶点图像自动扫描和采集、靶点阵列图像拼接等功能, 提高了核酸扩增杂交反应基因芯片试验效率。

关键词 机器视觉; 微阵列图像扫描采集; 自动调焦; 图像拼接; 基因芯片

中图分类号 TP29; TN29 **文献标识码** A **doi**: 10.3788/CJL20103702.0505

Gene Chip Microarray Fluorescent Spots Images CCD Scanning and Acquiring System

Liu Jun^{1,2} Zhao Jibin¹ Liu Weijun¹ Wang Tianran¹

(¹ Shenyang Institute of Automation, Chinese Academy of Sciences, Shenyang, Liaoning 110016, China)
² Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract To promote the efficiency of microarray gene chip images scanning and acquiring, a microarray fluorescent spots images scanning system is developed, in which an epi-fluorescence microscope, a precision three-dimensional (3D) translation motion platform, and a thermo electric cooling CCD camera are integrated effectively to construct an imaging and scanning mechanism. This system utilizes the industrial personal computer (IPC) as the core of measurement and control and realizes three specific functions, such as microscope auto focusing control, fluorescent spots images auto scanning and sampling and microarray spots images stitching. Many assays and experiments have been preformed to manifest that the system can effectively promote the efficiency of the microarray polymerase chain reaction (PCR) experiments and analysis.

Key words machine vision; microarray images scanning and acquiring; auto focusing; images stitching; gene chip

1 引 言

在生命科学研究以及临床医学诊断领域, 核酸扩增杂交反应(PCR)试验逐渐成为广泛采用的常规试验, 用于核酸扩增杂交反应试验的基因芯片已经得到广泛采用^[1,2]。基因芯片是一种使核酸扩增杂交反应及反应控制动作在其微反应池内进行的人造封闭试剂反应盒, 反应结果以分布于芯片探针支持物上的荧光靶点阵列图像的形式表现出来, 而荧光靶点阵列图像必须采用生物芯片扫描仪^[3,4]进行扫描和采集。生物芯片扫描仪主要有两种类型: 激光

共聚焦芯片扫描仪和 CCD 芯片扫描仪^[5~7]。前者图像分辨率高、扫描速度快, 但价格昂贵; 后者价格低廉, 图像分辨率较高, 扫描速度较快, 在临床医学诊断应用中具有发展前景。芯片扫描仪的性能极大地影响着基因芯片试验质量和分析效率。

在生物芯片 CCD 扫描仪中, 成像系统调焦方法^[8~12]、图像扫描和采集^[13]、靶点阵列图像拼接^[14~16]是制约扫描仪质量和工作效率的几个关键技术。通过将相关厂商生产的荧光光学显微镜、紫外荧光激发光源、半导体制冷 CCD 相机、图像采集

收稿日期: 2009-03-12; 收到修改稿日期: 2009-04-21

作者简介: 刘 军(1972—), 男, 博士研究生, 讲师, 主要从事机器视觉、图像处理方面的研究。E-mail: liujun@sia.cn

导师简介: 王天然(1943—), 男, 研究员, 博士生导师, 中国工程院院士, 主要从事机器人与先进制造技术方面的研究。

E-mail: trwang@sia.cn

卡、三坐标精密电控平移台和工控机(IPC)等仪器和设备进行有效集成来构建基因芯片荧光靶点阵列图像自动扫描采集控制对象平台,以便实现基于计算机自动控制技术的自动调焦、图像扫描采集、快速拼图等软件功能。

2 系统总体方案

系统分为3个模块:显微成像模块,由荧光显微镜、紫外荧光激发光源、半导体制冷 CCD 相机和 PCI 总线图像采集卡组成,用于采集基因芯片荧光靶点阵列图像并传输到计算机进行处理;信息处理模块,主要由工控机和信息处理软件组成,该模块负责对采集的图像进行图像清晰度评价、利用调焦和扫描机构进行调焦和扫描控制以及完成图像拼接处理;调焦和图像扫描机构,由步进电机控制器、三坐标精密电控平移台和芯片安装盒组成,用于接收计算机控制指令,驱动电控平移台运动,实现成像系统自动调焦和图像扫描。系统结构如图1所示。

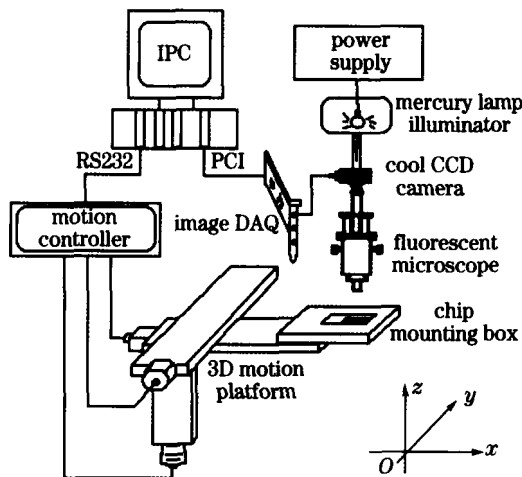


图1 基因芯片靶点阵列图像扫描采集系统的结构
Fig. 1 Architecture of microarray gene chip images scanning and acquiring system

2.1 系统硬件平台

系统硬件平台中的荧光显微镜采用日本 Nikon 公司的 Eclipse E200 型落射式荧光显微镜,其目镜放大倍率固定为 $10\times$,4 种物镜倍率分别为 $100\times$, $40\times$, $10\times$, $4\times$, 焦深范围为 $0.4\sim 63.2\ \mu\text{m}$, 视场范围 $\phi 0.2\sim 5\ \text{mm}$, 工作距离 $0.23\sim 30\ \text{mm}$; 因需要对基因芯片上具有荧光标记的探针分子进行激发并产生荧光,故选用 Nikon 公司生产的 C-SHG 型高压汞灯紫外光源照明器作为激发光源;半导体制冷彩色 CCD 相机采用 Nikon 公司的 DS-5Mc 型,其 CCD 芯片为 $16.9\ \text{mm}$, $-20\ ^\circ\text{C}$ 冷却,500 万像素 2560×1920 ;数据采集卡(DAQ)采用北京大恒公司

的 DH-CG300 彩色图像采集卡;调焦和图像扫描机构中的精密三维(3D)电控平移台为 TSA50-C 型,步进电机控制器选用 SC300-3A 型,二者均为北京卓立汉光公司生产的精密运动控制仪器。

2.2 系统软件设计

系统软件由 VC++ 6.0 编写,主要完成聚焦清晰度计算、调焦控制、图像扫描控制、图像采集与存储、图像拼接、图像显示等功能。软件部分主要由图像输入模块、图像处理模块和控制输出模块3个模块组成。图像输入模块负责实时连续采集图像,把采集卡采集的图像数据存储到计算机中;图像处理模块负责对输入图像分析以得到步进电机控制器的控制信号。因原始图像含有噪声,故需先对图像进行去噪等预处理。控制输出模块负责根据图像处理结果(图像清晰度曲线、扫描起点、靶点中心间距、扫描步长、拼接结果)进行运动、调焦、扫描、图像显示等控制和输出。

3 系统关键技术

3.1 基于图像处理的自动调焦控制技术

按照粗精调焦结合的原则和基于图像处理方法对成像系统进行自动调焦控制,调焦通过沿 z 轴移动芯片物面实现。

调焦控制过程为:采用图像熵函数作为粗调焦清晰度评价函数进行清晰度计算,得到粗调焦清晰度函数曲线。图像熵函数计算公式为

$$f(n) = - \sum P_k \lg P_k, \quad (1)$$

式中 k 为图像灰度级数。设 N 为图像像素总数, H 为图像直方图中某灰度级像素的个数,则有 $P_k = H/N$;根据粗调焦清晰度函数曲线,向步进电机控制器发出沿 z 轴方向的位移控制信号,同步采集图像并实时进行清晰度计算,直到清晰度达到峰值时令电控平移台在 z 轴方向停止大范围移动;完成粗调焦后,采用梯度平方函数作为精调焦清晰度评价函数进行清晰度计算,得到精调焦清晰度函数曲线。梯度平方函数计算公式为

$$f(n) = \sum_i \sum_j \{ [I(i+1, j) - I(i, j)]^2 + [I(i, j+1) - I(i, j)]^2 \}, \quad (2)$$

式中 $I(i, j)$ 为图像灰度;再根据精调焦清晰度函数曲线对芯片物面位置进行微动控制,直到清晰度达到峰值时令电控平移台在 z 轴方向停止微步移动。

3.2 基因芯片靶点阵列图像的自动扫描与采集

芯片图像扫描与采集过程为:首先根据显微镜

目镜安装位置及芯片结构参数,确定芯片扫描起始位置,然后沿 x 及 y 轴方向移动芯片进行芯片预扫描;预扫描时先捕捉到阵列中起始位置靶点图像,再利用图像处理中的投影法根据靶点图像的垂直投影特征计算出近似圆形的靶点中心位置;沿 x 轴方向移动芯片再捕捉到与起始位置靶点左右相邻的靶点图像,依上述方法计算出该靶点的中心位置,将左右相邻靶点中心位置相减得到左右相邻靶点之间的几何间距;用上述方法再算出靶点阵列中上下相邻靶点之间的几何间距;确定 x, y 方向扫描步长约为 x, y 方向相邻靶点之间距离的 $1/3$ 或更短,以保证相邻图像相互重叠;通过预扫描确定芯片扫描初始位置和扫描步长后,控制电控平移台带动芯片沿 x, y 方向等距移动进行图像扫描和采集,获得在 x 和 y 方向上相互交叠的靶点图像序列;将扫描采集得到的序列图像按 x 和 y 方向依行列顺序编号并存盘,完成靶点阵列图像的扫描与采集。

3.3 靶点阵列显微图像拼接算法

算法基本思想为:对在 x 方向相互重叠的两幅显微图像进行拼接;拼接得到的新图像与其沿 x 方向相邻且相互重叠的图像再进行拼接,直到对所有 x 方向上的相互重叠图像完成拼接;将得到的在 y 方向上相互重叠的水平拼接结果图像再沿 y 方向依次进行拼接,最终完成整幅芯片靶点阵列图像的拼接。至于图像匹配检测与拼接,相互重叠的两幅图像是采用图像匹配检测技术实现拼接的。采用基于归一化互相关测度的图像匹配检测技术对相互重叠的两幅显微图像进行最佳匹配位置检测。归一化互相关测度算式为

$$P(k, l) = \frac{\sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} f(i, j)g(i+k, j+l)}{[\sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} f^2(x, y) \sum_{i=0}^{M-1} \sum_{j=0}^{N-1} g^2(i+k, j+l)]^{1/2}} \quad (3)$$

式中 $f(i, j)$ 为模板图像灰度, $g(i, j)$ 为待匹配图像灰度。按(3)式计算值越大,则 $f(i, j)$ 和 $g(i, j)$ 在匹配区域上越相似,据此得到相互重叠的两幅图像的最佳匹配位置 (k, l) 。

两幅相互重叠图像的拼接过程为:在二者重叠部分占整幅图像的 $20\% \sim 50\%$ 条件下,在后一幅图像中提取用于图像匹配的模板图像;利用该模板图像基于归一化互相关测度在前一幅图像中搜索到最佳匹配位置;将前一幅图像中最佳匹配位置前的像

素复制到新图像中,将后一幅图像整体复制到新图像中,从而实现两幅图像的最佳拼接。

4 实验结果

4.1 显微成像系统的自动粗精调焦控制实验

显微镜采用 $10\times$ 倍率目镜和 $4\times$ 倍率物镜,其数值孔径为 0.1 , 实际视场数为 5 mm , 焦深为 $63.2\ \mu\text{m}$, 分辨率为 $2.8\ \mu\text{m}$, 工作距离为 30 mm ; 采用高压汞灯紫外激发光源照明以获取均匀亮度视场;电控平移台控制分辨率即脉冲当量为 $0.625\ \mu\text{m}$ 。采集芯片在各离焦位置的图像,在正焦面前后采集 100 幅图像,取样间隔为 $10\ \mu\text{m}$, 然后进行粗调焦清晰度计算,得到图像清晰度函数曲线如图 2 所示。

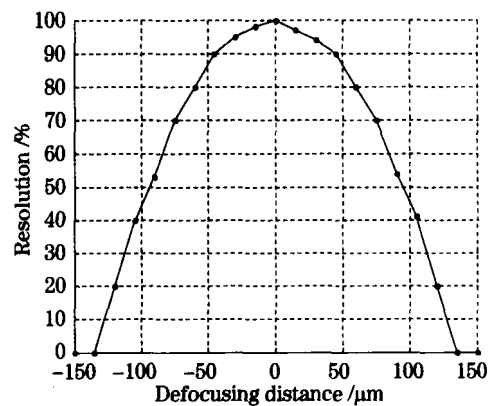


图 2 粗调焦清晰度函数曲线

Fig. 2 Coarse focusing resolution curve

粗调焦控制结束后,物距在正焦面前后 $\pm 30\ \mu\text{m}$ 范围内。选取精调焦范围在正焦面前后 $\pm 40\ \mu\text{m}$ 内,采集 100 幅图像,取样间隔为 $5\ \mu\text{m}$, 且仅对各图像中央 $128\ \text{pixel} \times 128\ \text{pixel}$ 的区域进行精调焦清晰度计算,得到精调焦清晰度函数曲线如图 3 所示;精调焦控制结束后,芯片物面控制在正焦面前后 $\pm 5\ \mu\text{m}$ 以内,调焦过程耗时约 $2\ \text{min}$ 。

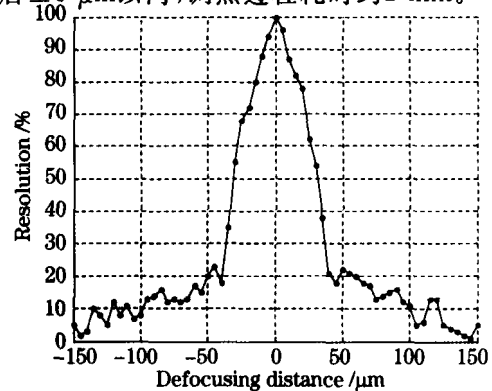


图 3 精调焦清晰度函数曲线

Fig. 3 Fine focusing resolution curve

4.2 基因芯片靶点阵列图像扫描采集控制实验

芯片扫描控制由工控机通过 RS232 接口与控制器 SC300-3A 通信实现,电控平移台在 SC300-3A 的驱动下通过丝杠传动和芯片安装盒带动芯片按图 4 中扫描路径运动完成图像扫描采集过程。其中芯片面积为 1 cm^2 , 阵列密度为 6×6 , 靶点直径约 $150\ \mu\text{m}$, 靶点间距约 $0.5\ \text{mm}$ 。扫描采集过程: 首先将芯片定位到扫描初始位置, 再对芯片沿 x 和 y 方向进行预扫描、扫描并同步拍摄图像, 对芯片扫描包括 x 方向的往复扫描和 y 方向的步进向下扫描。扫描采集图像耗时约 2 min。

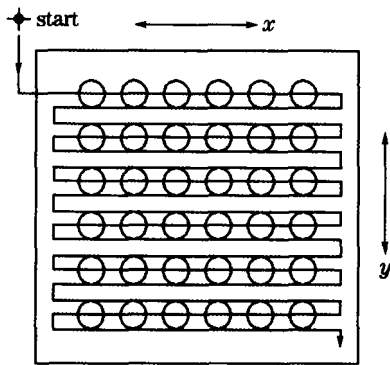


图 4 基因芯片扫描路径

Fig. 4 Scanning path for microarray gene chip

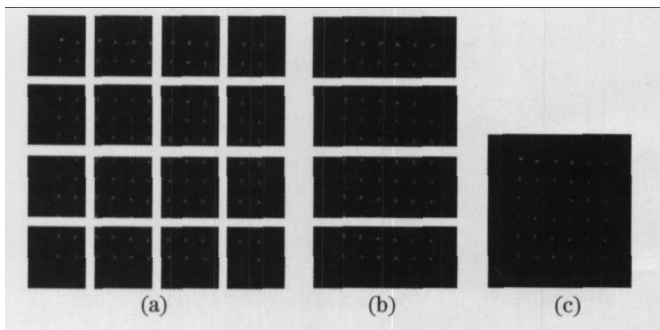


图 5 靶点阵列图像拼接过程和结果

Fig. 5 Stitching process and results of microarray images

4.3 靶点阵列图像拼接实验

图 5 为对采集的阵列密度为 6×6 的相互重叠靶点序列图像进行拼接的过程和结果。其中图 5 (a) 为经图像扫描采集后获得的在 x 和 y 方向上相互重叠的靶点阵列图像; 图 5 (b) 为对图 5 (a) 中在 x 方向互相重叠图像沿 x 方向完成拼接且在 y 方向上相互重叠的靶点阵列图像; 图 5 (c) 为对图 5 (b) 中获得的在 y 方向上互相重叠的拼接图像再次沿 y 方向进行拼接得到的最终靶点阵列图像拼接结果。拼接耗时约 40 s。

5 结论

研制了一种基因芯片荧光靶点阵列图像 CCD

扫描采集系统, 系统关键技术包括: 基于粗精结合原则和图像处理方法实现了显微镜自动调焦控制; 基于工控机和电控平移台运动控制系统, 采用图像处理和扫描控制策略, 实现了荧光靶点阵列图像的快速扫描和采集; 基于归一化互相关图像匹配检测技术, 实现了基因芯片靶点阵列图像的快速拼接。实验表明, 系统能够在 5 min 内完成低密度基因芯片荧光靶点阵列图像的扫描、采集、图像拼接, 显著提高了核酸扩增杂交反应基因芯片试验效率。

参考文献

- 1 Wang Shengqi. Development of gene chip technology and its application [J]. *China Biotechnology*, 1999, 19(4): 45~51
王升启. 基因芯片技术及应用研究进展 [J]. *生物工程进展*, 1999, 19(4): 45~51
- 2 Charlie C. Xiang, Yidong Chen. cDNA microarray technology and its applications [J]. *Biotechnology Advances*, 2000, 18: 35~46
- 3 Zhang Qiang, Hu Song, Liu Yeyi. Bio-chip scanner [J]. *Micronanoelectronic Technology*, 2002, 3: 43~45
张强, 胡松, 刘业异. 生物芯片扫描仪 [J]. *微纳电子技术*, 2002, 3: 43~45
- 4 Zhou Qiang, Zong Guanghua, Bi Shusheng. Research advance of microarray scanner [J]. *Optical Technique*, 2004, 30(2): 225~228
周强, 宗光华, 毕树生. 生物芯片扫描仪研究进展 [J]. *光学技术*, 2004, 30(2): 225~228
- 5 Wang Liqiang, Lu Zukang, Lin Bin. Biochip and fluorescence detection [J]. *Optical Instruments*, 2002, 24(4-5): 7~13
王立强, 陆祖康, 林斌. 生物芯片及其荧光信号检测 [J]. *光学仪器*, 2002, 24(4-5): 7~13
- 6 Zhou Qiang, Zong Guanghua, Bi Shusheng et al.. Research and design of the CCD-based microarray scanner [J]. *Chinese J. Scientific Instrument*, 2005, 26(2): 164~167, 176
周强, 宗光华, 毕树生等. CCD 微阵列生物芯片扫描仪的研制 [J]. *仪器仪表学报*, 2005, 26(2): 164~167, 176
- 7 Zhou Qiang, Zhao Dong, Zong Guanghua et al.. CCD technology in biochip scanner [J]. *Chinese J. Scientific Instrument*, 2002, 23(3): 97~99
周强, 赵东, 宗光华等. 生物芯片扫描仪中的 CCD 技术 [J]. *仪器仪表学报*, 2002, 23(3): 97~99
- 8 Yang Zaihua, Li Yuhe, Li Qingxiang et al.. Visual feedback autofocusing method combining fine and rough adjustment [J]. *Computer Engineering and Design*, 2005, 26(9): 2271~2273
杨再华, 李玉和, 李庆祥等. 一种粗精结合的图像反馈自动调焦方法 [J]. *计算机工程与设计*, 2005, 26(9): 2271~2273
- 9 Duan Ruiling, Duan Huibo, Li Qingxiang et al.. Micro-assembly autofocusing system based on image processing [J]. *Optics and Precision Engineering*, 2006, 14(3): 468~472
段瑞玲, 段惠波, 李庆祥等. 基于图像处理的微装配自动调焦系统 [J]. *光学精密工程*, 2006, 14(3): 468~472
- 10 Bai Lifan, Xu Yuxian, Yu Shui et al.. Study on the microscope auto-focus method based on image processing [J]. *Chinese J. Scientific Instrument*, 1999, 20(6): 612~614
白立芬, 徐毓娴, 于水等. 基于图像处理的显微镜自动调焦方法研究 [J]. *仪器仪表学报*, 1999, 20(6): 612~614
- 11 Hu Tao, Chen Shizhe, Liu Guodong et al.. Selection of auto-focus function in micro visual system [J]. *Semiconductor Optoelectronics*, 2006, 27(2): 216~220

- 胡 涛,陈世哲,刘国栋 等. 显微视觉系统中自动调焦评价函数的选取[J]. 半导体光电, 2006, 27(2):216~220
- 12 Sun Jie, Yuan Yuehui, Wang Chuanyong. Comparison and analysis of algorithms for digital image processing in autofocusing criterion [J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, 27(1):35~39
- 孙 杰,袁跃辉,王传永. 数字图像处理自动图像聚焦算法的分析和比较[J]. 光学学报, 2007, 27(1):35~39
- 13 Zhao Jibin, Zhao Yujie, Yu Yanfeng *et al.*. Cross testing instrument of nucleic acid amplification gene chips [J]. *Chinese J. Scientific Instrument*, 2006, 27(6):209~211
- 赵吉宾,赵雨杰,于彦凤 等. 一种核酸扩增基因芯片杂交检测仪[J]. 仪器仪表学报, 2006, 27(6):209~211
- 14 Chen Guo, Zuo Hongfu. A fast mosaicing algorithm for microscope image [J]. *Chinese J. Scientific Instrument*, 2003, 24(4):343~347
- 陈 果,左洪福. 显微图像的一种快速拼接算法[J]. 仪器仪表学报, 2003, 24(4):343~347
- 15 Feng Zhongyao, Jia Fang, Zhou Jinghui *et al.*. Three-dimensional surface shape measurement of big objects by image splicing in digital holography [J]. *Chinese J. Lasers*, 2008, 35(12):2017~2021
- 冯忠耀,贾 防,周景会 等. 数字全息中利用图像拼接测量大物体的三维形貌[J]. 中国激光, 2008, 35(12):2017~2021
- 16 Zhao Lin, Jin Weiqi, Chen Yinan *et al.*. Blind restoration for defocus blurred image based on autocorrelation of derivative image [J]. *Acta Optica Sinica*, 2008, 28(9):1703~1709
- 赵 琳,金伟其,陈翼男 等. 基于微分图像自相关的离焦模糊图像盲复原[J]. 光学学报, 2008, 28(9):1703~1709