



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1609593 B

(45) 授权公告日 2012. 04. 25

(21) 申请号 03152601. 2

(22) 申请日 1997. 08. 12

(30) 优先权数据

60/024, 043 1996. 08. 16 US

(62) 分案原申请数据

97197924. 3 1997. 08. 12

(73) 专利权人 GE 保健尼亚加拉公司

地址 加拿大安大略

(72) 发明人 彼得·拉姆 孙刚 罗尔夫·米勒

蒂莫西·奥姆斯比

肯尼思·R·卡斯尔

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

代理人 刘春元

(51) Int. Cl.

G01N 21/17(2006. 01)

G01N 21/64(2006. 01)

G01N 21/76(2006. 01)

(56) 对比文件

US 4922092 A, 1990. 05. 01, 说明书的第 8 栏第 41 行至第 11 栏第 38 行、图 1-8A.

WO 96/18205 A, 1996. 06. 13, 全文.

审查员 熊茜

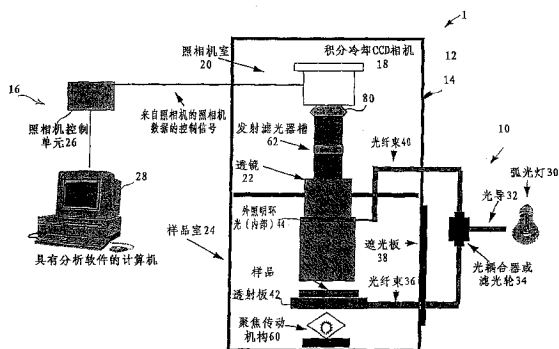
权利要求书 1 页 说明书 24 页 附图 11 页

(54) 发明名称

用于分析井板、凝胶和斑点的数字成像系统

(57) 摘要

本发明披露了一种电子成像系统,用于评定矩阵中的比色的荧光或亮度信号的强度,所述矩阵由井,微井,在膜上、凝胶上或其它样品上的杂交斑点。该系统包括非常灵敏的面积 CCD 检测器(18),具有外部照明(44)的高速远心透镜(22),反射/透射照明系统,照明波长选择装置(34),和光密封分室(24)。使用计算机和图像分析软件控制硬件,校正和校准图像,并检测和量化图像内的靶。



1. 一种用于化验的成像系统,包括:

多样品板,所述多样品板在凹井中具有样品,所述板被放置以具有在其上入射的或者源自样品的光;

远心透镜,所述远心透镜适合于成像所述多样品板,所述远心透镜被放置为收集来自所述板中的所述样品的光,所述收集的光穿过所述远心透镜而被传送;以及

图像检测装置,所述图像检测装置被放置为接收穿过所述远心透镜而被传送的光并产生表示所述板的图像的信号,

其中所述系统使用宽带照明光源,并且提供精密滤光器来选择单色照明的任何波长。

2. 如权利要求 1 所述的系统,其中所述图像检测装置是 CCD 照相机。

3. 如权利要求 1 所述的系统,其中所述板具有复数个井,用于容纳复数个样品。

4. 如权利要求 1 所述的系统,其中通过所述远心透镜的外部照明被施加于所述试样的整个表面。

用于分析井板、凝胶和斑点的数字成像系统

[0001] 本申请是申请日为 1997 年 8 月 12 日、申请号为 97197924.3、发明名称为“用于分析井板、凝胶和斑点的数字成像系统”的发明专利申请的分案申请。

[0002] 本发明一般涉及化验分析系统,尤其涉及一种用于产生随机排列得到样品(例如凝胶内的珠(bead),培养皿内的菌落)或排列成规则阵列的(例如塑料板中的井,被设置在膜上的斑点)样品的数字图像的系统和方法。本发明能够产生数字图像并能够进行发出非常低的荧光、化学光或生物光的样品的自动分析。特别是,本发明被设计用于分析在井板内和凝胶介质内以及膜上,玻璃上,微型器件或其它载体上的样品产生的亮度。

[0003] 许多化学和分子生物学分析被这样设计,使得在样品内的光反射作用的吸收、透射或发射发生变化。因此,用于对这些进行定量分析的仪器必须检测亮度的改变。

[0004] 一些样品被设置在分立的长颈瓶或小瓶内,而有些样品被设置在塑料板内,在塑料板上含有许多按一定间隔设置的井。“井板”样品和在分立容器中的类似的样品相比,生产率高而成本低。标准的井板在 8×12cm 的面积内含有 96 个井。发展趋势是在相同大小的板内含有较多的井。现在最高的工业密度是 384 个井。由小的井(微井,例如每板数千个,其全体积小于是每个井 1 μ l)排列而成的极高密度的阵列正在研究中,并将作为成熟的微井填充和检测技术在工业上利用。

[0005] 在扁的载体膜上或在处理过的玻璃条上设置小点(反应处)的网格。高密度网格可以含有数千个分立的点。网格样品通常涉及和低核苷酸杂交,以便寻找含有特定序列的基因,或者确定特定基因起作用的程度。其应用包括库筛选(library screening),利用杂交排序,利用杂交诊断以及基因表达的研究。如果能够简单而可靠地对网格进行分析,高密度网格可以以低的成本提供极高的生产率。因此,在研究用于产生、检测和分析基因组序列的高密度阵列的技术的公司引起了相当的重视。

[0006] 有些样品涉及小的颗粒(一般是由化合物涂敷的珠),其作为反应点。可以有数千个珠,每个珠用组合库中的不同的化合物(例如酶的分子变种)涂敷。这些珠被暴露于井中或凝胶基体中感兴趣的物质(例如克隆受体)。和靶物质相互作用的珠借助于在每个珠周围的区域内的荧光发射或吸收进行识别。相互作用的珠被暗的不同亮度的区域包围着。需要非常灵敏的检测器来识别在和靶相互作用的珠周围的亮度的微小变化。

[0007] 把制成溶液的样品涂在基体上,在基体上施加电压。因为蛋白质和具有不同氨基酸或核苷酸的核酸都具有特征静电荷和分子尺寸,所以在试样内的元素可以提供其响应所加电压而产生的不同的运动速度来进行分离。被分离开的元素通过使用同位素标记、荧光标记或亮度标记被可视化。在许多情况下(例如化学光),由样品产生的亮度是很小的。

[0008] 位于排列成规则阵列的反应点(井,网格内的斑点)的样品可被称为固定格式的样品。而不规则地分布在凝胶或斑点基体内的样品可被称为自由格式样品。

[0009] 固定格式样品通常不利用成像来进行化验。相反,自由格式样品需要使用图像分析系统,其可以对图像内的任何位置的反映进行检测和定量分析。

[0010] 被设计用于固定格式样品的仪器一般没有成像功能,因而尚不能用于自由格式样品。同样,被设计用于自由格式样品的很少的几种成像仪器尚不能用于井和其它的固定格

式的靶。

[0011] 非成像计数系统（液体闪烁计数器，光度计，荧光偏振仪等）基本上是光学仪器。它们使用光电倍增管（PMT）检测井内的光透射与光发射的变化。类似于光度计，这些系统把每个井发出的光集中成一个数据点。它们不提供关于井内空间变化的信息，也不允许作用点的充填密度或位置改变。

[0012] 每个 PMT 一次读出一个井，并且在计数系统中，只允许设置数量有限的 PMT（在现有的系统中最大为 12 个）。虽然数量有限的 PMT 意味着一次只能读出少数的井，但通过多次移动 PMT 检测器可以分析井的阵列。

[0013] 非成像计数系统的主要优点是它们是一种（按钮）技术（容易使用），并且是成熟的。因此，许多这种仪器在工业上是可以利用的并且其性能是好的。

[0014] 计数系统的主要缺点是：

[0015] a 有限的灵活性 — 只有少数的仪器可以处理 384 个井，并且绝对处理不了较高密度的荧光或发光的样品阵列。

[0016] b 只设计有固定格式用作井或小瓶读取器，并且不能以自由格式读取样品。

[0017] c 对于暗的样品，其处理速度慢 — 虽然在强光下一次扫描几个井可以很快，但暗的样品要求在扫描内的每个位置花费较长的计数时间。因为有许多位置要被扫描，因而使生产率降低。

[0018] 总之，非成像计数系统是不灵活的，并对于有些样品提供有限的输出。

[0019] 用于扁的样品的不同于非成像计数器的一种装置是扫描成像器。扫描成像器，例如分子动态学（MD）风暴，MD 荧光成像器，或 Hitachi FMBIO 在样品上通过激光束或其它的光束，以逐点的或逐线的方式激励荧光或反射光。可以使用共焦点的光学系统，通过牺牲速度和灵敏度来减少焦点之外的荧光（例如 Biomedical Photometrics MACROscope）。利用这些装置，通过以串行方式在一段时间对点和线进行累加而构成图像。

[0020] 扫描成像器一般用于凝胶或斑点，此时它们提供方便的操作。样品被插入，并通过小的用户影响（没有聚焦、和调整亮度等），进行扫描并得到图像。和非成像计数系统一样，扫描成像器通常是一种按钮技术。其容易使用以及好的性能导致其越来越多地被用于凝胶和斑点分析中。

[0021] 扫描成像器具有 4 个主要缺点：

[0022] a 扫描速度慢。必须使光束和检测器装置在整个样品上通过，同时在扫描过程中读取数据。扫描一个小的样品至少用 5-10 分钟。而扫描一个大的样品要用半小时。这限制了生产率，并且使在扫描处理期间变化的样品的定量分析复杂化。

[0023] b 有限数量的的波长。由光学系统提供有限数量的荧光激励波长。因此，只有有限数量的分析方法可以使用。

[0024] c 低的灵敏度。大部分扫描成像器比本领域的成像器的灵敏度低。

[0025] d 亮度不合适。扫描成像器要求由对样品施加光束而产生的亮的信号。因此，发射暗的内源性亮度的光的样品（例如涉及荧光素酶或鲁米诺的反应）不能被成像。

[0026] e 没有合适的井。只有扁的样品可以被成像。数量有限的共焦点仪器可以进行光学分段，然后把划分的部分重新构成聚焦的浓的图像。

[0027] 一种面成像系统每次把整个样品放在检测器平面上。不需要移动 PMT 或扫描激光

器,因为照相机并行地使在许多小的检测器元件(通常是 CCD)上的整个样品成像。在同时获取图像之后,从检测器读出整个图像。读出是一个串行的过程,但是相当快,其速率范围为几千到几百万个像素/每秒。

[0028] 面成像系统提供了有些很有吸引力的优点。

[0029] a 因为一次便使整个样品成像,检测处理可以非常快。

[0030] b 对于给定的合适的照明系统,可以应用任何激励波长。

[0031] c 可以对亮度反应(没有入射光而发光)成像,包括闪烁光和生物光或化学光辉光。

[0032] d 可以对自由格式或固定格式的样品成像。

[0033] 亮度成像更容易实现,其中不必施加照明。然而,大多数亮度反应是很暗的,这使得极其需要现有的面成像技术。标准的对策是使用用于这些类型的样品的灵敏的、科学等级的 CCD 照相机。然而,在没有本发明的情况下,积分照相机不能使许多亮度样品成像。因此,本发明可以使用其它系统不能成像的样品成像。

[0034] 一般的现有技术的系统对于在平的膜上的亮度样品和在井中的亮度样品采用面成像。总是使用标准的照相机镜头。井成像的结果是有缺陷的,其中没有对视差误差进行校正。

[0035] 有多种关于使用荧光进行面成像的现有技术。荧光显微镜(见 Brooker 等人的美国专利 5332905)和常规的凝胶与斑点成像是最常用的方法。在显微镜方面的现有技术几乎没有什么关系,因为没有提供对大的样品面积进行成像。

[0036] 关于大的样品的现有技术主要包括对于常规的凝胶与斑点进行荧光成像的低成本的商业系统。这些系统可以使用标准的积分的 CCD 照相机对大的、亮的面成像。然而,它们具有以下主要缺点:

[0037] a 局限于由气体放电灯发射的波长。一般提供 UVA,UVB,UVC 与 / 或白光灯的一些组合。不能获得其它的波长。

[0038] b 在化验期间波长不能改变。如果在化验期间波长必须改变(例如关于用 fura-2 进行的钙计量),则不能采用这种装置。

[0039] c 对于荧光中小的改变不敏感。透射光从样品的正下方进入检测器光学系统。因此即使非常好的滤光器也不能除去所有的直射光,这便产生非特定亮度的亮的背景。在荧光中的小的改变(一般是许多样品的)在非特定背景内被丢失。

[0040] d 低能的照相机和镜头。只有极少数的系统使用高性能的照相机。即使这些少数的系统也使用标准的 CCTV 或照相镜头,这限制了它们对于亮的样品的应用。

[0041] e 视差误差使得不能进行精确的井成像。事实上,远心的透镜尚不能使用,这些系统在对井成像时呈现视差误差。

[0042] 本发明的新的特征减少了已有的大的荧光系统的缺点。这些新的特征包括:

[0043] a 照明波长可以被选择,而与气体放电灯或激光器的峰值无关。

[0044] b 使用计算机控制的滤光轮或其它装置,在化验期间可以改变照明。

[0045] c 可以检测荧光发射中的小的变化。因为荧光照明是通过外部照明(epi-illumination)得到的,或者来自脊部源或横向源,直射激励照明不会进入光学系统。这提供了尽量低的非特定背景。

[0046] d 对于暗的样品可以使用极高效的照相机和透镜。

[0047] e 独特的远心透镜是极快的,并消除了视差误差,从而使得能够进行精确的井板分析。

[0048] 本发明的主要优点在于它的高速远心透镜,它可以立刻对整个井板成像,并可以对透明的或不透明的样品提供高效率的外部照明。和样品耦联的光纤可用于代替透镜耦联。例如,光纤透镜一直被用于运行在光子计数方式下的图像放大的 CCD 照相机,用于分析固定格式或自由格式的数据。这种方法产生好的灵敏度,但是具有以下主要缺点:

[0049] a 虽然建议系统可用于荧光样品,但局限于透射照明的样品,因为没有位置用来插入外部照明机构。因此,光纤透镜系统将使灵敏度变差,并不能用于不透明的样品。许多样品是不透明的(例如许多井板、尼龙膜)。

[0050] b 井板是 8×12cm 的,这种尺寸的成像光纤的制造是很困难的和昂贵的。因此,必须对样品获得若干个小的图像,然后重新组装,以便本身整个样品。

[0051] 这种多次获取使得不能使用具有随时间而改变的样品的装置。

[0052] 一种面成像分析系统(LUANA)被 D. Neri 等人披露了

[0053] (“Multipurpose High Sensitivity Luminescence Analyzer”, Biotechniques 20 :708-713, 1996),其使用冷却的 CCD,侧面安装的光纤照明器和激励滤光轮来实现一些类似于本发明的功能(波长选择,面成像)。然而,LUANA 使用侧面安装的光纤,这在实验室安装的系统中被广泛使用,并具有被本发明克服的问题。具体地说,使用侧面安装的光纤提供极不均匀的照明,特别是在利用井板时。本发明的外部和透射照明系统对扁的样品和井板都提供均匀的照明。此外,在 LUANA 的技术中,由于视差而不能对井板的样品成像。

[0054] 另一种系统(Fluorescence Imaging Plate Reader-FLIPR of NovelTech Inc., Ann Arbor MI)使用面 CCD 检测 96 井板中的荧光。这种装置是一种非成像计数系统,并使用面 CCD 代替多个 PMT。为了达到合理的灵敏度,其以 96 个井的格式运行,并把在每个井内的所有的像素集中成为一个值。这种装置不适用于亮度成像、自由格式成像或较高密度的井成像,并且成本非常贵。

[0055] 有许多现有技术使用成像检测显微装置(例如“基因”检测器)内包含的样品。一些基因检测器使用扫描图像仪,并检测由光电倍增管发出的光。另一些使用面积 CCD,检测被直接被设置在 CCD 上或被设置在可以放置在 CCD 上的遮片上的样品点的变化。当固定的靶被限定时,基因检测器具有大的潜力。例如,为寻找基因组信息而制造一种遮片,并使该遮片用于筛选大量的血试样。当使其设计的序列具有高的效率时,遮片必须含有大量的活性点,如果其用于筛选各种序列的话。具有几千个点的遮片的制造是困难而昂贵的。因此,第一代基因检测器将用于筛选非常特殊的核苷酸序列。

[0056] 显微装置的不灵活性和本发明形成了对比,本发明不需要试样基片的微观制造。而本发明允许把试样放置在井中、膜上、硅化载片或其它环境中。几乎任何反应都可以量化。因而,本发明可以用作显微制造的替换技术。因为本发明是灵活的,并可以分析任何化学样品,适用于分析研究的所有阶段。其中包括设计原型和质量筛选。因此,当微观制造不适用或成本-效果比低时,本发明提供了一种微观制造的方法。

[0057] 上述的每种现有技术都是处理成像样品的某些方面。然而,现有技术没有解决在以低的光值成像大的样品时遇到的所有主要问题。这些问题是:

[0058] a 需要非常高的检测器灵敏度；

[0059] b 需要灵活的单色的大面照明；

[0060] c 必须避免视差误差；以及

[0061] d 需要更可靠的处理以便发现和量化靶。

[0062] 广义上说,本发明的目的在于提供一种克服现有技术的缺点的用于化验的成像系统。尤其是旨在提供一种用于对井中或膜上的样品进行面成像的完整的系统。特别是,本发明提供一种完整的系统,用于对化学光、荧光、化学荧光、生物光或其它非同位素杂交样品,包括高密度的斑点阵列,进行成像。

[0063] 本发明的另一个目的在于,对化学光、荧光、化学荧光、生物光或其它非同位素样品,包括组合的样品,以自由格式进行成像。

[0064] 本发明的一个目的在于,提供一种用于对荧光图像数据进行数字消卷积软件。应用这种软件可以减少闪烁和丢失焦点信息。

[0065] 本发明还有一个目的在于,提供一种用于对样品成像的方法和系统,该系统是灵活的、可靠的和有效的,特别适用于低值发射。

[0066] 本发明提供一种检测器、透镜、成像系统和照明技术的协同的组合,其可以对利用非成像计数器和扫描图像仪预先获得的样品进行成像。尤其是,其可以用于固定格式或自由格式,并利用井板或扁的样品。其能够检测荧光、亮光或透射光。

[0067] 本发明的特点包括,其检测并量化大的规则排列的靶的阵列,检测并量化不按规则阵列排列的靶,进行任何数量的按规则排列的样品的自动分析,从少量的大的井到大量的极小的井或斑点。

[0068] 本发明的另一个特点是提供一种面照明系统,其使用标准的低成本的非相干滤光器选择激励波长,能够对整个井板或类似尺寸的样品提供均匀的单色激励;并且在计算机控制下可以对整个井板或类似尺寸的样品提供不同波长的均匀单色激励。

[0069] 一种使用本发明的系统提供一种专门设计用于井板格式的样品的透镜。这种透镜在把光子从样品转移到 CCD 阵列方面非常有效(是快的),最好包括外部照明系统,并可用于非常暗的样品。该透镜还是远心的。远心透镜具有可以直接射进井板内所有点的性能,并且没有标准透镜具有的视差误差。

[0070] 一种优选的系统提供一种远心的高速透镜,其在需要时产生均匀的外部照明场。透镜配备有内部光纤照明系统,该系统不需要分色镜。透镜的结构最好能够接收一个作为阻挡滤光器(barrierfilter)的内部相干滤光器。通过透镜的光线当照射到阻挡滤光器上时几乎平行,使得滤光器工作在其规定的波长和带宽允差下。

[0071] 本发明的特点在于,其提供一种光汇聚效率高的高速远心透镜或者标准的摄影透镜。

[0072] 一种优选的系统提供一种 CCD 面阵列照相机,其具有高的量子效率(大约为 80%),和高的灵敏度(16 位精度),使得大多数样品都可以通过积分而不放大便可以检测。该系统最好具有一个和可选择的图像放大器耦联的积分冷却 CCD 照相机。在一个用于极低光强的实施例中,来自样品的入射的照明被放大器放大,在积分时间内,放大的光在积分相机上积累。在积分时间结束时,照相机由一专用控制器或成像装置读出,从而重现光图像。可以使用多次曝光,以便增加照相机的动态范围。提供光密封的样品室,其中可安装所

有的照明和检测元件,并且其中放置样品。

[0073] 按照本发明的一种系统可以包括平移装置 (translationstage) (选择的),其也位于光密封室内,并用于移动大的样品(例如 22×22cm 的膜)通过光学系统。本发明通过软件控制该装置的移动,并由利用平移装置获取的多个“瓦片”形成一个合成的图像。

[0074] 本发明最好提供有软件控制系统,其校正阴影,几何失真,散焦和照相机与透镜系统固有的噪声误差;并使用由不同的激励滤光器产生的多个图像尽量多地除去非规范荧光。

[0075] 具体地说,本发明提供一种软件,用于利用先前由透镜和检测器系统测量的光学特性对一个焦面中的图像进行消卷积。应当理解,来自多个焦面的数据也可以被消卷积。

[0076] 虽然本发明的优选实施例使用高精度的冷却 CCD 照相机,但是如果成本是主要因素,本发明可以使用低成本的照相机构成。在这种情况下,通过降低图像质量和最终灵敏度,可以实现短的积分时间。

[0077] 本发明的其它目的、特点和优点从下面结合附图对优选实施例进行的详细说明可以更清楚地看出,其中:

[0078] 图 1 用于示意地说明按照本发明第一优选实施例(直立的)的系统;

[0079] 图 2 用侧视图示意地说明高速的远心透镜;

[0080] 图 3 详细表示透镜的光学以及机械元件和发射滤光器支架;

[0081] 图 4 示意地说明按照本发明的系统的第二实施例,其用于极低的光,具有设置在透镜和 CCD 照相机之间的放大器;

[0082] 图 5 示意地表示放大器的结构;

[0083] 图 6 用侧视图示意地表示扩散照明板,表示来自自主光纤束的单个的光纤束如何被取出并被设置在矩形光纤支架内;

[0084] 图 7 用顶视图示意地表示扩散照明板,表示来自自主光纤束的单个的光纤束是如何被引入光纤支架内的通道阵列的;

[0085] 图 8 是 CCD 照相机的示意图;

[0086] 图 9 是按照本发明用于进行图像获取和分析的方法的流程图;以及

[0087] 图 10 是说明在图 9 的处理中用于定位靶的方法的流程图;

[0088] 图 11 为空间上可变的靶基因和格网靶基因;

[0089] 图 12 为一个包含 1536 个分立点状斑的格网;

[0090] 图 13 为用探针从三个细胞系中筛选 cDNA 库。

[0091] 现在参看附图,图 1 示意地表示按照本发明的成像系统 1 的优选实施例。系统 1 大体上包括照明系统 10,被提供在壳体 14 内的成像子系统 12,以及控制子系统 16。成像子系统 12 包括设置在壳体 14 的照相机室 20 内的 CCD 照相机子系统 18 和在照相机室 20 和样品室 24 之间延伸的透镜子部件 22。在操作时,照明子系统 10 提供被施加于室 24 内的样品上所需的光能。由样品发出的光能通过透镜子系统 22 被传递到照相机 18,在其中形成图像,并将图像传递到控制子系统 16 进行处理。控制子系统 16 包括照相机控制单元 26,其是一种和特定照相机 18 以及计算机 28 匹配的常规单元,计算机 28 对于控制单元 26 编程,并接收来自照相机 18 的数据,以便按照本发明进行独特的控制和处理。

[0092] 用于照明子系统的光源最好是弧光灯 30。来自灯 30 的光通过液体光导 32 被引入

光耦合器或滤光轮 34。液体光导 34 的优点在于,它能传递 UV 范围内的光,并且比光纤对输入的光的扩散作用强。

[0093] 光耦合器 34 包括常规的用于标准的一英寸直径的相干滤光器的滤光器支架(未示出)。在优选的结构中,使用计算机控制的滤光轮代替光耦合器。滤光轮可以包括多个滤光器,在计算机的控制下,它们可以快速地改变。

[0094] 光纤束 36 把来自光耦合器或滤光轮 34 的照明传递到不透光的样品室 24 内。光纤束 36 通过遮光板 38,其允许光纤束在样品支架聚焦期间上下移动。此外,来自透镜 22 内的外照明环光的光纤束 40 可以和光耦合器 34 相连。

[0095] 描述了 3 种形式的照明系统,其中每种形式由单个光纤束输入光。它们是透射板(42),透镜外侧的环光(未示出),和进行外部照明的透镜(22)内侧的环光 44。

[0096] 透射板是一个矩形室 50(见图 6 和图 7),在其内来自光纤束 51 的单个光纤 52 被分开并被转动 90 度,使得它们沿横向指向样品。光纤 52 以这样的方式被分布在室内,使得它们在照明图形中的阴影最小。为此,在室的外圆周部分比在其中心部分设置较多的光纤。

[0097] 矩形室 50 包括扩散栅 54 和石英玻璃扩散板 56。这些扩散部件把来自光纤 52 的单个的光点作为其输入,并在板 56 的表面上产生均匀的照明。室 50 还可以包括暗场阑(dark field stop),以便使光从侧面进入样品。

[0098] 外部的环光由和透镜的轴线对准的光纤环构成,其中心具有足够大以便包围透镜 22 的孔。环光的工作距离和透镜 22 的焦距匹配。

[0099] 内部环光 44 由光纤环构成,其被设置在远心透镜 22 的本体内并和其轴线对准,位于远心透镜的前透镜元件的后方。扩散器、偏振器或其它的圆形元件可以设置在光纤环 44 的前方。

[0100] 样品井板被设置在被安装在光纤室 50 的支架 58 内(图 6)。支架 58 在其边缘抓住井板。支架 58 的底部是空的,从而不影响对井的观察。支架 58 被固定在可以使其沿垂直方向移动的传动装置上。通过调节传动装置 60,支架 58 相对于透镜 22 而移动,从而使光集中在样品上。

[0101] 透镜 22 是高速远心透镜。透镜具有发射滤光器槽 62,其接收 3 英寸直径的相干滤光器用于荧光成像。它包括位于前透镜元件后方的内部光纤环光源 44。透镜 22 在其中部由法兰 64(见图 2)被设置在照相机室内。透镜的后部伸入照相机室 20 中,提供到发射滤光器槽 62 的现成的通路而不干扰样品。透镜的前方伸入样品室 24 中。

[0102] 被冷却的 CCD 照相机 18 被直接固定在透镜上。因为照相机具有其自身的室 20,所以不用担心在冷却装置、电源和从室内到照相机控制单元的数据电缆周围的光的泄漏。

[0103] 所有的控制、成像和分析功能都设置在计算机 28 中。

[0104] 用于单色区域照明的标准技术是使用气体放电照明灯(例如 UV-光盒),在发射峰值其可以提供大约 $5000\text{uW}/\text{cm}^2$ 的表面。灯被涂敷用于把光发射限制于一个特定峰值的滤光器。虽然相当亮,但气体放电灯在波长上被限制于由灯内的气体激发的峰值。

[0105] 除去气体放电灯之外,对于区域照明没有更多的描述。主要问题是波长的选择,以及把照明光束直接引入集中的光学系统会使灵敏度变差。为避免这些问题,光可以从上部、从侧面。或者通过暗场或通过折射进入样品。所有这些技术具有若干限制。侧面安装的光纤照明器是不均匀的。它们也不适合于井或其它非扁平的样品,因为光以一定角度进入样

品,因而不能穿透靶的深部。折射或暗场照明器需要在井板处设置空间光学元件,并且不能用于不透明的样品。

[0106] 一种更灵活的照明系统使用宽带照明光源,并能够通过精密的滤光器(通常是相干滤光器)可以选择单色照明的任何波长。使用滤光器是最好的,因为不同的照明器或低成本的可调激光器当在大面积上扩散时其光输出将不足。

[0107] 通常选择汞弧或氙弧灯作为基于滤光器的单色激励。弧光灯的优点在于可以使其输出成为窄的光束,使得在被散布在样品的整个表面上之前可以通过小的容易得到的相干滤光器。可以使用透镜或光纤把单色光从滤光器传输到样品。

[0108] 本发明比已有的任何装置都更加灵活。其对整个样品表面施加扩散的穿透照明(通过样品)、脊部照明(通过环光或其它光源)或外部照明(通过透镜)。外部照明是最好的,因为它通常产生较暗的背景、较宽的动态范围以及在真实状态下更线性的荧光响应。提供大面积的单色外部照明的能力是本发明区别于现有技术的一个基本因素。

[0109] 本发明在提供照明方面解决了3个主要问题。

[0110] a 滤光器的可利用性 - 容易以小的尺寸实现的精密的滤光器(例如 10nm 带宽滤光器)不能用于大面照明。这问题通过使用标准的相干滤光器被解决了。

[0111] b 照明输出 - 在 $8 \times 12\text{cm}$ 的面积上施加均匀的、单色的和可选择的照明是本发明的特点。光耦合器或计算机控制的滤光轮接收标准的相干滤光器,并被用于选择波长。光耦合器或轮可以被设置在专门设计的光纤板上用于穿透照明,被设置在光纤环上或被形成平面光用于脊部照明,或被设置在透镜内的光纤照明装置上,用于外部照明。

[0112] c 强度大 - 激励照明被散布在大的面积上(一般 96cm^2)。因为强度随被照射面积的平方而减少,所以得到的激励强度的确是非常低的。在许多情况下,发射的荧光将不能用标准的工业等级的被冷却的 CCD 照相机检测到。本发明的非常灵敏的检测器能够使大的样品发出的低的荧光成像。在极低的光的条件下,本发明包括可选择的光放大系统,其可被插在透镜和 CDD 照相机之间(如下所述)。

[0113] 图 2 表示在远心透镜 22 内的照明和滤光器元件的总体布置。透镜内已安装有光纤环光源 44,其通过前透镜元件在样品(图 2 的左侧)上投射单色照明。环光源的焦面在 B,而整个透镜的焦面在 B 的前方 A。把环光源的焦点置于样品之外的一点上可以减少来自样品的特定的反射。

[0114] 发射滤光器槽 62 使得能够插入相干滤光器,其从输入的光线中除去激励照明,只剩下由样品发出的荧光。

[0115] 图 3 表示远心的大的透镜 22 的光学元件。透镜具有 39 个表面,并具有以下的特征:

[0116] 有效的焦距 164.436mm

[0117] 数值孔径 .443

[0118] 放大率 0.25

[0119] 注意在发射滤光器槽 62 内光线几乎是平行的。这使得滤光器能够在其特定的波长和带宽下操作。

[0120] 虽然本发明可以使用任何透镜,但使用其专门设计的透镜可以得到最高的灵敏度。这种透镜是高速的远心透镜,并包括适合于大的样品的外部照明系统。

[0121] 外部照明在荧光显微镜中是一种标准的技术,其中小的面积被照射。照射小的面积的最有效的方式是把二色分光镜置于物镜的后方。二色分光镜或平面镜是一个局部反射平面,其反射一个波长范围,而允许另一个波长范围通过。

[0122] 在显微镜上,照明从侧面进入二色分光镜。使二色分光镜具有一个角度,以便向下通过物镜朝向样品反射激励光。由样品发出的荧光(其波长比激励光向上偏移)被物镜采集,使其向上通过朝向分色镜。分色镜对于发射波长是透明的,使得光线通过分色镜向着检测器平面行进。对于每个激励/发射波长需要不同的分色镜。

[0123] 在对于大的成像系统应用标准形式的基于二色分光的外部照明系统时存在的主要困难是:

[0124] a 二色分光镜至少必须和其必须填满的物镜那样大。照相机透镜比显微镜物镜大得多,因而需要相当大的二色分光镜。这样大的二色分光镜是不容易得到的。

[0125] b 在高速大透镜(macro lens)中,重要的是后透镜元件要固定在尽可能靠近 CCD 的位置。在最后透镜和 CCD 之间的距离的任何增加都显著地减少工作数量和采集光的效率。因此,不可能把二色分光镜设置在透镜的后面。

[0126] c 在常规的外部照明系统中,二色分光镜通过整个透镜反射激励光。为此,激励照明的传输极大地受到在透镜中使用的玻璃的光学特性的影响。UV 外部照明需要非常贵(并且难于加工)的石英光学玻璃。这些光学玻璃可以制成小尺寸的而用于显微镜物镜,但是,用于本发明所述的大尺寸的情况将是非常贵的。

[0127] d 二色分光镜吸收光。一般地说,其效率为 80-90%

[0128] 本发明的独特的性能在于其不需要二色分光镜。远心透镜是大的,因而有余地在其本体内安装照明装置。照明装置被如此安装,使得其在前透镜元件处从后方直接照射。这样便照到样品,而不需要反射的二色分光镜。通过透镜被反射回的任何杂散的激励照明都通过位于照明光源后方的发射阻挡滤光器被除去。

[0129] 此外,透镜被如此设计,使得只有 15 个内部透镜元件中的 1 个处于内部照明器的前方。其优点在于,可以减小内部闪烁和反射。同等重要的是,只需要前方透镜对于 UV 是透明的。一个 UV 透明的透镜是贵的,但是并不至于不能接受。

[0130] 透镜的前方元件被这样计算,使得把光源聚焦在样品的平面之外。光源不聚焦在样品平面内能够减小反射。因为许多井板由抛光的塑料板制成,因而易于发生镜面反射,这是一个重要特征。

[0131] 这种透镜是高效的。透镜的汇集 $F/\#$ 是 4.5。这意味着汇集的空间角是 0.03891sr , 汇集效率是 $0.03891/4\pi = .3096\%$ 。预期的透射值是 0.85-0.90,给出的整体汇集效率为 0.263-0.279%。和 $F/1.2$ 照相透镜相比,利用本透镜的预期的改进大约为 340%。

[0132] 本透镜是远心的,远心透镜没有视差误差。利用标准透镜得到的深色的图像和窄的靶呈现视差误差。在图像中心的圆的靶被认为是真正的圆形。然而,透镜以一定角度射进横的靶。因此,这些横的靶被看作是月牙形的。在许多情况下,根本看不到井的底部。远心透镜在井板的整个面积上汇集平行光线。因而,不以一个角度射进任何井中,因而没有视差误差。

[0133] 本发明的透镜的主要优点在于,内光束在适合于插入阻挡滤光器的位置被准直。即,透镜是这样计算的,使得大致在透镜筒的中部的一点上,光线几乎是平行的。在这一点

上,透镜中安装相干滤光器。该滤光器用于除去激励照明和它的非规范光。在这一点上被准直的光束这重要的,因为相干滤光器必须以垂直于进入的照明的方式被安装。如果进入的照明处于一个角度,则滤光器通过的波长将发生变化。在本发明中,当光线射到滤光器上时,它们几乎是平行的,从而产生尽可能好的性能。

[0134] 远心透镜具有固定的视野(在这种情况下直径大约为 14.5cm),但是,如果需要较大的样品成像,在不透光的室内可能要安装电动的平移台。在计算机的控制下,平移台使样品相对于透镜而移动。在每次移动之后,获得一个“瓦片”。当对整个样品完成成像之后,所有的瓦片被重新组合(由软件)成一个大的图像,从而保持远心度无视差误差以及在整个表面的高分辨率。

[0135] 图 4 表示图 1 的系统的一种改型,其中增加了选择的放大器 70,以便提供用于对极低的光成像的另一种系统。在其它各个方面,该系统 and 图 1 的系统基本相同。放大器 70 被安装在远心透镜 22 和 CCD 照相机 18 之间。

[0136] 图 5 表示 GEN3 型的放大器 70,其包括光敏阴极 72,微通道板(MCP) 74,荧光屏 76,和真空密封的壳体或本体 78。高速远心透镜 22(图 2,3)置于部件 70 的前方。在其输出侧,透镜被聚焦在阴极 72 的输入窗上,从而把样品图像传递给部件 70。光敏阴极 72 被这样选择,使得其与照到其上的光强成正比地反射电子。MCP74 位于真空密封本体 78 内,在阴极 72 和荧光屏 76 之间,并在每端和阴极 72 相连。MCP74 具有小直径的 MCP 通道,其每个涂敷有镱的砷化物。从阴极 72 发射的电子沿着 MCP 通道被向着荧光屏 76 加速。当来自阴极的电子沿着小直径的通道被加速时,它们撞击涂敷的通道壁,从而产生附加的电子。当附加的电子离开 MCP 通道时,它们撞击荧光屏 76,从而在输出窗产生样品的放大的图像。该图像通过透镜 80 和照相机中的 CCD 元件 84 耦联。

[0137] 已经发现,使用 Extended Blue GEN3 图像放大器比使用其它图像放大器的优点在于,其在输出屏上提供的图像是锐的,具有小的阴影误差,并且比 GEN1 和 GEN2 放大器的噪声小。不过,可以理解,随着较好的放大器的研制,它们可以用于本发明中。

[0138] 积分照相机 18 被这样配置,使得在输出窗 78 上产生的被高度放大的图像通过中间透镜 80 被聚焦在 CCD 元件 84 上。对于低光强样品的图像,照相机 18 的 CCD 元件 84 积分一段时间。在这段积分时间内,来自输出窗的入射到 CCD 元件 84 的光子作为负电荷(信号)被存储在 CCD 元件 84 的大量单独的区域中。在 CCD 元件 84 的每个单独区域中的电荷量被累积如下。

[0139] 信号 = 入射光 × 量子效率 × 积分时间

[0140] 来自放大器 70 的入射光的相对强度越大,存储在 CCD 元件 84 的相应区域中的信号越大。

[0141] 对于最低的光强的情况,因为闪烁接近样品,本发明允许光放大器被插入透镜和 CCD 照相机之间,这种光放大器是一种图像放大器。例如,在 Simonet 的美国专利 5204533 中披露的放大提及把图像放大器和 CCD 照相机相连。图像放大器一般包括光阴极、荧光屏和连接在光阴极和荧光屏之间的微通道板(MCP)。利用这种类型的装置,可以得到高达大约为 90000 的光放大倍数。

[0142] 利用被插入光路链中的放大器,本发明成为一种图像放大的 CCD(ICCD)照相机。在 ICCD 照相机中,图像在 3 个或 4 个平面中产生。在这些平面的每个上,具有一些量子效

率的损失。因此,图像放大器工作在高的增益下,以便克服在光路链内的信号损失。在极高的放大倍数下,噪声和通过 MCP 的离子反馈是如此严重,使得不可能进一步改进灵敏度。即使工作在最大的增益下,常规的图像放大的 CCD 照相机因灵敏度不足而不能使最暗的样品成像。

[0143] 对于一般极暗的样品,大多数 ICCD 照相机不能产生图像,或者只能产生极浅的图像,其中难于把靶和背景区别开来,并不能给出靶的强度的真正范围。在最坏的情况下,则根本不能把靶和背景区别开来。

[0144] 常规的图像放大的 CCD 照相机使用等于一个电视帧的积分时间。短的积分时间允许放大器用于标准的低成本的视频照相机,例如被用于电视工业中。换句话说,放大器用门进行控制,以便使用极短的积分时间(例如 1msec)。使用门进行控制使得放大器可以用于光子计数方式。

[0145] 本发明提供了两种可以使用放大的光的方法。一种优选的方法涉及在被冷却的 CCD 照相机上连续积分放大器的输出。这种方法是快速高效的,但具有有限的动态范围。可以使用放大器的冷却,或不同时间的多次曝光,以便改进动态范围。第二种方法涉及观察一个较短时间内的放大器输出和光子计数。这种方法慢得多,但是具有宽的动态范围。本发明可以根据样品的要求来选择两种方法之一。

[0146] 现有技术中存在存在在井板分析成像中使用放大的 CCD 照相机的技术。Martin 和 Bronstein(1994) 以及 Roda 等人(1996) 讨论过利用放大的 CCD 照相机进行化学光样品成像。只有亮的样品可以看到。没有提供对于深的井在没有视差误差的条件下,或者对样品施加单色激励进行成像。

[0147] Rushbrooke 等人的美国专利 4922092(1990) 披露了使用和特殊光纤透镜耦联的图像放大的 CCD 照相机。光纤透镜包括在井阵列和放大器的输入端之间传输光的光纤束。虽然由 Rushbrooke 披露的发明是无视差的,并且适用于标准的 96 或 384 井板,但是其不能对本发明所述的很高密度的井阵列成像。此外,由 Rushbrooke 披露的发明缺少照明能力。它也不能对自由格式的样品成像,因为在输入光束之间具有被寻址的空间。和光纤相反,本发明通过使用透镜输入,允许自由格式成像。

[0148] 总之,本发明的本实施例允许使用置于透镜后方的选择的放大器,用于检测最低光强的样品。当被放大时,该装置可以运行在连续积分或光子计数方式下。

[0149] 利用图 4 和图 5 所示的系统,只有 CCD 检测器被冷却。这对于大多数应用是足够的。不过,应当理解,放大器光阴极 72 也可以被冷却,借以改进放大器的信噪比。类似地,整个光敏装置(放大器+CCD)可以被冷却。不过,冷却整个光敏装置的缺点是会降低在光纤输出窗上的荧光的效率。

[0150] 虽然高质量的工业等级的 CCD 照相机可以检测大约 50 个入射到 CCD 的光电子(和设置的检测可靠性有关),但在成像照明下的样品时,这一表示性能的数据是不精确的。实际性能被整个光路链的发射与收集性能以及 CCD 照相机的性能复杂化了。因此,应该超出检测器的 QE,并检查整个系统的传输效率。

[0151] 有 3 个因素决定检测器系统的传输效率(产生的光电子/发射的光子)。它们是透镜的光汇集效率,CCD 检测器的量子效率和透镜的透射率。可以按下式计算产生的光电子数:

[0152] $N_{pe} = \tau * \phi_{\text{detector}} * c. e. * N_{\text{photons}}$

[0153] 其中：

[0154] τ 是透镜的透射率，对于本发明的透镜大约为 85-90%

[0155] ϕ 是 CCD 检测器的量子效率，一般为 35-40%，在本发明的情况下高达 80%，以及

[0156] c. e. 是透镜汇集效率，对于高速摄影透镜，其小于 .1%，在本发明的情况下大约为 1.2%。

[0157] 在一般的工业等级的 CCD 照相机系统中，使用可得到的最快的摄影透镜 (f1.2)，并利用高质量的冷却检测器，CCD 对于由试样中的点光源产生的大约 5000-10000 个光子将产生 1 个光电子。

[0158] 本发明的透镜提供大约 0.271% 的汇集效率。CCD 检测器的效率大约是其它 CCD 的两倍。其结果是本发明在理论上，对于由试样中的点光源产生的大约 500-1000 个光子将产生 1 个光电子。这一很高的传输效率使得能够进行利用现有技术的系统不能成像的样品的检验。

[0159] 在图 4 和图 5 所示的实施例的另一个实施例中，系统包括一个扩充的蓝色型 GEN3 图像放大器。其它类型的放大器虽然不如这种的好，但也可以使用。3 种主要类型的放大器 (GEN1, GEN2, GEN3) 的区别在于其元件的结构和构成元件的材料不同。在 GEN1 放大器中，入射到光阴极上的照明以正比于入射信号的强度的速率产生发射。然后，从光阴极发射的电子通过高压电场被加速，并使用静电聚焦或近聚焦在荧光屏上聚焦。荧光屏可以是视频照相机的输入窗（如同硅放大的靶照相机），或者可以直接观看。GEN1 具有一些几何失真，并且具有相当低的量子效率（大约 10%）。

[0160] GEN2 放大器类似于 GEN3，在成像管内在阴极和阳极之间具有 MCP。和 GEN1 放大器相比，GEN2 放大器较小，噪声较低，并具有较高的增益。不过其量子效率相当低（一般在 20% 以下），并且其易于具有差的对比度传输特性。与此相反，GEN3 放大器管具有大约 30% 的量子效率或更高（需要小的增益），并具有很高的固有对比度传输特性。关于最近型号的 GEN3，其增益值大约和 GEN2 的相等（可得到的极限增益值大约为 90000）。因此，GEN3 放大器比 GEN2 放大器易于产生较好的图像。当由于成本或特殊的设计特点而需要时，也可以使用其它形式的放大器。可以使用具有高的固有增益的类似装置（例如电子照射的后部照明的 CCD 检测器）代替图像放大器。

[0161] 本发明的 CCD 照相机 18 可以使用锁定于图像放大器中的门控电源的积分时间，其结果是照相机可以以非常短的时间间隔被读出。使用门控和快速读出的特点，并使放大器运行在最高的增益下，或者利用中间放大器，可以使本发明作为常规的光子计数照相机那样被操作。因而，本发明的系统可以有利地用于微弱样品的直接成像，或者通过使其操作方式从积分变为门控而作为光子计数照相机。

[0162] 图 8 示意地表示 CCD 照相机 18。照相机 18 包括位于照相机快门后面的 CCD 元件 84。为了减少由 CCD 内的电子产生的暗噪声 CCD 元件 84 被安装在散热器 88 上，散热器 88 又和 Peltier 冷却元件以及用于提供增强的热耗散的液体循环系统呈导热连接。使透镜位于快门上方，以便使图像聚焦在 CCD 元件 84 上。在除去摄影透镜装置之后，高速远心透镜 22（图 2 和图 3）直接利用螺丝固定在照相机本体上。类似地，图像放大器 70（当存在时）被直接固定在照相机本体上。

[0163] 面成像系统使用 CCD 阵列形成图像。影响 CCD 阵列检测少量的输入光子数的能力的因素包括量子效率、读出噪声和大多数成像阵列的小的尺寸（例如 2.25cm^2 ）。

[0164] 量子效率 (QE) 表示 CCD 中的光检测器把入射的光子转换成电子空穴对的能力。消费等级的 CCD 的 QE 一般大约为 12-15%。标准的工业等级的 CCD 照相机的 QE 大约为 40%。数量非常有限的薄的背后照明的 CCD 在峰值检测波长下的 QE 可以达到 80%。

[0165] 读出噪声来源于 CCD 的输出前置放大器，其测量每当一个或几个 CCD 元件的电荷被传递给它时所产生的电压中的小的改变。读出噪声：直接和读出速率有关，在使用慢的读出速率时被减少。

[0166] 暗噪声是由在 CCD 中由热而产生的电荷而产生的。通过增加背景电平，暗噪声减少动态范围。可以从图像中减去恒定的暗噪声值，但是暗噪声也具有不能被减去的随机噪声分量。这一分量加于检测器的噪声值上。通过冷却 CCD 而使暗噪声减少。

[0167] CCD 元件的尺寸和其存储光电子的能力（被称作井容量）有关，因而和其动态范围有关。在阵列中的每个 CCD 元件越大，元件的井容量和动态范围越大。宽的动态范围允许检测器用于较长的曝光时间而不饱和，因而增强了极小信号的检测。此外，较大元件的信噪性能本来就好于较小的元件。大多数面成像系统使用相当小的 CCD。这对于其中离散的 CCD 元件是大的装置产生有限的分辨率，并对于其中离散的 CCD 元件是小的装置产生有限的动态范围。具有有限的动态范围的装置不能达到 16 位的精度，因而必须用于相当亮的样品（例如荧光显微镜，UV 凝胶，很亮的化学光）。

[0168] 本发明包括被设计用于减少刚刚述及的所有问题的 CCD 系统。这种 CCD 阵列通常是大的 (6.25cm^2) 和效率高的（大约 80% 的量子效率）。其结果是获得了具有宽的动态范围的极高的检测器灵敏度 (16 位)。优选的支持电子部件包括高精度的数字化器，其具有最小的读出噪声。照相机最好被冷却，以便减少暗噪声。

[0169] 在照相机内附带地提供有机电快门，用于限制图像在 CCD 元件上曝光。照相机最好是薄的，背后照明的 1024×1024 个像素的黑白照相机，具有异步复位功能和高的量子效率。通过设置在照相机控制电路内的数字化电路和设置在计算机内的接口卡，照相机提供 16 位的数字信号输出。来自 CCD 的数据以 200000 个像素 / 秒的速率被照相机控制单元数字化，并被直接传递到计算机存储器。

[0170] 在积分间隔之后，CCD 照相机接收来自计算机的触发脉冲，以便启动机电快门的曝光。随着快门的闭合，图像被从 CCD 传递到计算机的内部帧缓冲器。

[0171] 虽然这种照相机可以在不冷却 CCD 元件的情况下使用，但是通过：使用具有整体冷却的元件的 CCD 照相机，可以实现扩展的积分间隔。积分的有效性受冷却程度的限制。利用无制冷的液体冷却装置，可以达到大约 -50°C （环境温度以下）的检测器温度。在这个温度下，暗噪声的累积速率大约为 7-10 个电子 / 秒。这种冷却具有成本低并且容易实现的优点。

[0172] 不过，应该理解，如果使用制冷的液体或深冷的冷却剂，可以实现更长的积分时间。

[0173] 控制系统 16 包括控制单元 26 和计算机 28。照相机控制单元是一个由照相机 18 的制造者提供的用于控制照相机的可由计算机控制的单元。计算机 28 最好是一种常规的运行在 Windows 环境下的计算机，并被编程用于实现按照本发明的图像获取和分析。

[0174] 基于照相机的成像系统缺少在一般的计数或扫描系统中使用的按钮操作。照相机聚焦、调整曝光时间等可能都不方便。

[0175] 实际上,成像本身比对井内的一种靶进行计数复杂得多。非成像计数系统具有相对简单的任务。它们只需要控制扫描过程,控制内部校准以及产生表示每个井的小的数据点阵列。其可以采用以下的操作步骤:

[0176] a 相对于内部标准校准检测器。

[0177] b 照明一个井。

[0178] c 在照明的井上放置 PMT。

[0179] d 读出井

[0180] e 把数据传递到分散板上。

[0181] f 照明下一个井并重复。

[0182] 面成像系统具有复杂得多的任务。对一个井板成像可以包括以下步骤:

[0183] a 在整个井板上提供足够的照明。

[0184] b 控制高性能的照相机。

[0185] c 存储几何和密度校正系数。

[0186] d 对样品成像。

[0187] e 校正几何和密度变量。

[0188] f 如果需要,按照样品内的标准校正图像。

[0189] g 定位每个井并对强度量化。

[0190] h 把数据传递到分散板上。

[0191] 如果成像系统配置有用于完成上述 b-h 功能的软件,则可以仅完成这些任务。本发明包括这种软件。

[0192] 具体地说,本发明的一个方面是一种软件,其通过使用两个图像对于非规范背景校正荧光。第一个图像由这样一个激励滤光器形成,其在激励非规范荧光的同时激励尽可能少量的规范荧光。第二个图像由这样一个激励滤光器形成,其尽可能多地激励规范荧光,而尽可能少地激励非规范荧光。借助于从规范的图像中减去非规范图像而形成最佳的规范荧光图像。

[0193] 图 9 是说明由用于控制系统 1 并从中获取数据的计算机 28 执行的主要处理的流程图。在处理开始之后,使用照相机 18 在块 200 获取样品的图像。用于获取样品的偏图像的处理是已知的。这种偏图像考虑在获取图像时由系统本身引入的所有的严重失真和误差。利用一种已知的方法,在步 202 获取样品的偏图像。

[0194] 在步 204,获取非规范图像。这种图像确定非规范元素例如基片对于图像的贡献。这一步被表示为选择的,因为只有当样品必须被照明以便获得样品图像的情况下才进行,在这种情况下,一些光也从非规范元素反射。在另一方面,如果样品是图像的光源(例如化学光),则不获取非规范图像。类似地,块 206 的步骤是选择的,因为它涉及获取非规范偏图像。

[0195] 在块 208,从样品图像中除去或减去样品偏图像。在块 210 从非规范图像中减去非规范偏图像。这得到两个图像,其中偏置的影响已得到补偿。在块 212,从补偿的样品图像中除去补偿的非规范图像,从而产生工作图像,其中样品的作用被分离。本领域的技术人员

应该理解,如果不进行步 204 和 206,则步 210 和 212 也不进行。

[0196] 在除去偏置之后,使用已知的方法提供各种其它的校正(例如起源于透镜的几何失真)。

[0197] 在步 214,操作者向计算机输入标准的“网格”间距和“测试模板”。网格间距是在基片上样品试样的标准的心对心间距。“测试模板”是相应于膜上的一个点、板上的一个井或类似的靶的单个靶的标准规定(例如根据形状和面积)。一般的测试模板是一个圆形的区域,并对于样品中的每个靶有一个测试模板。网格由一个矩阵构成,其中含有对于每个靶的一个测试模板。

[0198] 选择地,操作者也可以定义一个“锚点”(anchor point)的阵列。样品可以包括数千个可能样品的阵列。在一些情况下,这些阵列的大部分将被填充,在另一些情况下,则只有一小部分被填充。在相当少的试样点被填充的情况下,样品将包括预定的“锚点”,以便帮助系统确定测试模板的位置。在大部分可能的试样点被填充的情况下,试样本身提供足够的填充,以便定位测试模板,因而不需要锚点。

[0199] 在块 216,产生具有规定的网格间距的规定的测试模板并被叠加在工作样品图像上。此时,操作者可以对测试模板的叠加的网格选择地提供手动调节,以便使其和实际样品在总体上对齐。操作者应当这样作,例如,借助于利用鼠标移动整个阵列,然后“抓住”规范的测试模板并使其在样品上的合适的靶上对准中心。例如,操作者可以借助于使网格的 4 个角上的测试模板在样品的合适的靶上对准中心来进行整体对准。虽然不重要,但是这手动调整将加速并简化由计算机 28 进行的处理。

[0200] 在块 218 进行如下所述的处理,以便确定测试模板相对于可能的靶的实际位置的更精确的位置。在块 218 处理的开始,确定是否靶或锚点已被充分地识别或确定。如果靶已被很好地确定,则控制转移到块 222,在其中测试模板的阵列和确定的靶对齐,但是如果锚点已被很好地确定,则控制转移到块 220,在其中测试模板的阵列和锚点对齐;否则,控制则转移到块 224,在其中预定的网格间距和阵列的测试模板被利用。应该理解,在一些情况下,可能需要把阵列和锚点对齐然后和靶对齐。

[0201] 一旦测试模板和靶对齐之后,则在各个测试模板内的测量对于不同的条件被解码。例如,一个测试可能采取 n 个条件中的任何一些条件,因而块 226 的处理可以在每个测试时对于这些条件中的一个对试样进行解码。实际的处理根据统计进行,并且由一个关于判定二进制决定的一个简单例子可以得到最好的理解。不过,本领域的技术人员应当理解,所述的处理实际上可被用于解多个条件处理。在最简单的情况下,二进制决定是“yes”或“no”的决定,其可以和某个条件的有无相关。按照块 226 的处理,测量样品的每个测试的实际值,对于一组试样确定平均与标准偏差,这便得到工作统计分布。然后对于由操作者选择的任何置信度值进行“yes”或“no”的解码。操作者选择置信度值使得确定一个门限值(例如根据所述的值确定一个与分布曲线的平均值的标准偏差的计算数),并且在门限值以上的任何信号被认为是“yes”,而在门限值以下的任何信号则被认为是“no”。

[0202] 在块 228 进行处理以便根据在块 226 进行的处理产生阵列数据的报告。可以设想这可以是一个任何形式的写软件的报告,其向操作者提供在制备所需格式的报告时的基本的灵活性。一旦报告被产生,处理就告结束。

[0203] 作为附录 A 所附的资料更详细地说明了图 9 的处理。

[0204] 图 10 是说明图 9 的块 222 中进行的处理的流程图。

[0205] 在开始处理之后,在块 300 计算图像背景和噪声。在块 302,确定是否需要网格对于靶的阵列进行组对准。这可通过操作者观察或者通过系统进行。这一检验的目的在于确定网格是否和整个靶对齐。如果由系统完成,则利用常规的用于检验两个规则形状的图形是否对齐的程序完成。如果确定组已被充分地对齐,则控制转移到块 306。

[0206] 在块 304 进行组对齐。这个操作的目的在于使检测模板网格和各自的靶粗略地对齐。这可根据整个网格或由操作者选择的部分网格进行。除去使 ID 在整个网格上最大之外,这对齐可以通过下面讨论的关于块 306 用于使 ID 最大的处理完成。

[0207] 在块 306,在每个测试模板的区域内进行台阶状的处理,以便由式 (1) 确定在测试模板内产生最大集成密度 ID 的点:

$$[0208] \quad ID(x_0, y_0) = \int_{s(x_0, y_0)} D(x, y) w(x-x_0, y-y_0) dx dy \quad (1)$$

[0209] 其中: (x_0, y_0) 是测试模板的中心点;

[0210] $S(x_0, y_0)$ 是在 (x_0, y_0) 的测试模板面积;

[0211] $D(x, y)$ 是在 (x, y) 的密度值(例如增量剂);以及

[0212] $w(x, y)$ 是加权函数(例如在 $(0, 0)$ 具有其最大值的二维 Gaussian 函数)。这对每个测试模板产生一个“A 位置”,它是在式 (1) 中提供最大值的位置。在块 306 之前的测试模板的位置则称为“G 位置”。

[0213] 在块 308,在 A 位置和 G 位置之间进行置信度加权,以便达到每个测试模板的中心的最后位置。对于 A 位置的置信度加权系数是信噪比的形式。即,在每个点的 ID 值正比于在那一点的 ID 值和对那点在块 300 确定的值的比。实际上,加权系数被用于确定沿着位置 A 和位置 G 之间的直线的测试中心的位置,从而加权确定该点和位置 A 接近的程度。

[0214] 虽然详细说明了本发明的优选实施例,但本发明不限于此。本领域的技术人员可以作出各种改变和改型。本发明的范围由所附权利要求限定。

[0215] 附录 A

[0216] 1. 引言

[0217] 分子生物学、化学和自动化方面的快速进步正在从总体上对生物学,特别是对药物新发明方面发挥着深刻的影响。由于某些公司对新技术接受得非常快,加大了对所有的竞争者的压力。人人都想降低发现和评估潜在治疗指标所需的费用并加快其速度,结果导致了药物科学的一个新领域-生物分子筛选-的迅速成长。生物分子筛选可以被定义为对大量化合物的潜在药理学效应进行迅速而有效的实验室试验。

[0218] 生物分子筛选的成长是组合化学、生物学多重接受法、分子基因学和其它领域中的新事物和新理解的必然结果。例如,组合化学家可以从一个简单化合物开始,由它产生出成千上万种具有潜在重要性的化合物。必须对所有这些化合物,或它们的一个重要亚群,做生物活性试验。另一个例子是发现、检测和研究化合物和基因之间的相互作用的特征。

[0219] 组合化学、分子基因学和其它应用的要求已经导致了筛选技术的一个特殊领域-高工效筛选 (HTS)-的发展。HTS 与通常定义的生物分子筛选没有本质的区别。我们可以把它看成是从筛选法而来的“减重高速汽车”,其中相当多的开销和努力花费在提高测试化合物的速度上。检定化学、检测系统、自动化/机器人以及生物信息学中的最优秀的技术都在 HTS 中扮演了自己的角色。

[0220] 能够使检定化学最有效率的一种途径是使检定形式小型化。例如：将从 96 个井板改成 384 个就增加了单位面积里的检定位。可以断言将会很快出现更高密度的微井形式。微井检定将紧随着其它筛选方案的引导，利用显微加工装置或布点机器人在固体载体上提供非常密集 DNA 克隆阵列（例如 Beattie 等, 1995 ; Eggers 等, 1994 ; Khrapko 等, 1989, 1991 ; Lamture 等, 1994 ; Lipschutz 等, 1995 ; Maskos 和 Southern, 1992 ; Mason, Rampal 和 Coassin, 1994 ; Pearson 和 Tonucci, 1995 ; Pease 等 1994 ; Saiki, Walsh, Levenson 和 Erilich, 1989 ; Schena, Shal on, Davis 和 Brown, 1995 ; Southern, Maskos 和 Elder, 1992）。

[0221] 一个典型样品中的目的基因数目在迅速增加。今天的显微加工示范装置含有大约 1000-20000 个格网元素（简要评介见 Southern, 1996）。布点检定通常获得高得多的密集度。在我们的档案中有一些图片，是在一张约 20×20 厘米大的膜上容纳了多于 50000 个同位素标记的 cDNA 点状杂交斑。我们还看到过用非同位素方法获得的高得多的密集度，在这种方法中密集度的集中不受同位素辐射发散的限制。由于微板、膜或其它媒体上愈来愈密集地布满检定位，导致了等间隔格网模式检定位的高密集度。这就是通常所谓的“高密集度格网”。

[0222] 分析并采用的传统方法（一般是基于光电倍增管的计数器）常常不适于高密度格网。计数装置必须一个接一个地为各个格点编址，无法处理小检定位构成的大阵列。与此相对照，一个基于照相机的成象系统同时适于高密度格网和自由形式的样品（即那些不是等间隔模式的样品）。自由形式样品的例子包括在分析皿中的组合液滴检定、组织培养中的细胞级检定和克隆检定等等。

[0223] 图象和筛选技术之间的界面还处于形成阶段，其技术刚刚达到可以使用的程度。显微制造、非人造阵列（比如膜、微井）和检测技术方面的革新将与图象分析结合，成为新的筛选法在排序、诊断和接合方面的有力工具。

[0224] 图象与库筛选

[0225] 分子基因学，或 DNA 分子水平的基因研究涉及到特定基因编码的 DNA 的分离和特征化。最基本的目的基因是与疾病和病理学过程相关的基因组。例如大多数癌症都来自于非遗传性基因突变（体细胞突变），这种突变导致细胞功能失常。如果一个特定基因的改变常常与一种特殊的癌症相关，那么这种基因的变化或许就能够被用来检测这种癌症。基因工程技术也可以用来研究基因及其编码蛋白的功能、批量生产稀有蛋白和创造基因紊乱的动物模型。所有这些的出发点就是 cDNA 和基因组库的筛选。我们为简单识别出那些与我们的探针杂交的克隆而进行筛选，或为识别那些响应某些无关变量（比如两个细胞株）而改变了基因表达的克隆而进行筛选。

[0226] DNA 库筛选的最普通的应用就是识别和分离对应于一个感兴趣的特定基因的克隆。为了从一个特定的基因分离出克隆，必须有一个可用于这个基因的探针。然后对 DNA 库进行筛选以得到包含有与探针杂交序列的克隆。

[0227] 为感兴趣的基因而分离克隆的 DNA 的第一步是将一个库里的分立克隆涂抹到一个空模子里，在这个模子的各位置上放置一个分立克隆。位于各位置上的克隆可以是已知的克隆，正象当我们有一个科斯质粒，或 YAC，或 BAC 克隆的有序阵列时那样。这种方法有一个优点，即同时复制基因并标注它在染色体上的位置。由于这样的库常由基因谱图构成，基因位置的识别就可以给出与已被标注在染色体同一区域的遗传性疾病的可能的联系。另

外,克隆还可以构成一个特殊库的非有序取样(存在多余部分和重迭部分)。

[0228] 分立的克隆的库被复制在一个固态载体上,具有代表性的固态载体是滤膜。用精密的布点机器人能使整个库在很少的膜上按高密度格网涂抹开。因为库中的各个克隆可能只包含感兴趣的基因的一种蛋白或者一个特殊的基因可能在库中未被充分表达,为了有更多的机会找出正(互补)克隆,需要筛选出数万甚至数十万个分立的克隆。结果是针对一种特定基因的被标记的探针将只与数千个可能的目的基因中的少数几个克隆相互作用。

[0229] 为识别正克隆,我们将点状斑的高集中度格网与一个被标记的探针杂交。典型的探针是一个 DNA 的小片段或者合成的已知排序的低核苷酸。杂交阶段利用了强有力的排序特性和互补核酸单链之间的高亲和性。这一过程的目标是确定我们膜上的库是否包含了与我们探针的已知排序互补的排序。如果有,就能获得这个杂交的排序,并用它把我们的注意引向包着较小的杂交部位的基因组的未知部分。

[0230] 使克隆与探针的杂交度可视化是成象系统的职责之一。高密度格网可以用同位素或非同位素成象使其可视化。对于同位素标记的探针,磷成象板技术是最方便和精确的信号检测方法。非同位素的检测可以用一个灵敏的数字照相机和化学发光剂或荧光标记来实现。我们建议用我们的 Tundra 超低光成象系统来达到这一目的。无论我们的标记物是什么,结果都是一幅高集密度格网的图象。在典型的筛选研究中,这种图象包含了成千上万个未标记的点和几个标记过的点。分析这个图象来别识正的命中点是成象系统的主要功能之二。

[0231] 图象分析涉及点的定位、杂交强度的定量化和正负命中点的解析。最困难的方面是点的定位。因为筛选一个库通常只在图象上产生很少几个可见的点,根据强度对正的目的基因进行定位看起来很容易。在这种情况下,我们将“盯住”图象,并设置一个只选命中点的水平(阈值)。在库筛选中比在基因表达研究(见后)中更适合采用按照密度值选取命中点的方法,但它却不是一种选取命中点的好方法。这是由于以下原因:

[0232] 1. 本底和标记强度的变化常常在为命中点定义一个单一的密度值时导致某种不确定性。考虑与克隆杂交的探针的情况,如果这个克隆是具有弱的、但真正与探针同系的染色体的重要的克隆,它将呈现微弱斑点,其强度仅仅稍高于那些负点的强度。如果做正点选择时采用简单的密度截断,这个点就很可能被丢掉。

[0233] 2. 密度标准在进行定量和评估之前就消除了目的基因。因此我们是在主观判断(点看上去较暗或较亮)的基础上,而不是在定量数据的基础上检测命中点。

[0234] 作为对照,我们的软件利用格网的等距离间隔在识别命中点之前给所有的格网元素定位和定量。这种方法(固定采样探针的策略)在过滤器上使用特殊的“锚”点来提供特别的参考点。利用这些点,这个软件就能标识在各个和每个格网元素上的克隆。这个软件还能对局部本底变化、照明不均和其它误差源进行修正。

[0235] 有了这些已定位和进行过本底修正的格网元素,系统就从所有的元素读取数据。格网中的每个目的基因都被量化并被输入这个格网的数据库。利用这些数据,就可以使用客观的统计方法来识别正命中点。例如,我们能够比较所有格网元素的强度,并选取那些与全平均信号的差别大于 10 倍标准偏差单位的信号。统计方法的使用确保用客观标准将所有的正命中点,甚至那些不能被视觉分辨的正命中点识别出来。

[0236] 最后,这个软件提供方便的图形输出,以易于理解的方式显示结果,同时还提供全

部数字数据,可以将它们输出到你的数据处理软件去。

[0237] 基因表达研究

[0238] 基因表达研究的目的是找出那些在两种或两种以上条件下其表达有所差异的基因。例如,我们可以对比这样两种情况下的基因表达:一种是对照细胞中的基因,它们来自于有病的细胞系;另一种是暴露在药剂之下的同种细胞中的基因。传统的评估基因表达的方法是基于对分立的基因在 RNA 水平上按次序地分析或者一次进行少量的分析。与此相对照,使用高密度格网允许同时研究上千种基因的表达。基因表达研究与库筛选的主要区别在于我们不是寻找几个识别与特定的已知排序杂交的命中点,而是评估大量基因被表达的程度。

[0239] 基因表达是用复杂的探针混合体与 cDNA 库的杂交来研究的。库被复制布点,以产生两套或更多的同样的高密度格网。在研究中不同的探针由各种条件下分离出的 RNA 分别衍生出来。各 RNA 样本实际上都是许多 mRNA 分子的复杂混合体,这些分子对应于不同基因的产物。在这个复杂混合体中起作用的 mRNA 分子的数量反映了分立基因的表达水平。表达水平越高,混合体中的分子越多。

[0240] 放射性的或生物素基的核酸参与(利用用反转转录酶)产生复杂探针的过程。杂交后特殊基因的活性正比于在高密度格网的各斑点上检测到的信号。

[0241] 与只有少数斑点杂交的库筛选不同,在基因表达研究中大多数斑点都与 RNAs 的混合体杂交。所以识别所有格网斑点的位置并不困难。成象系统利用实际斑点矩阵的信息来排列取样格网。基因表达研究中的真正问题在于数据量之巨大。多个膜上的高密度格网可能包含几万个斑点,各斑点的表达值都必须被保留。图象分析软件要设计成能够处理如此大量的数据集,并且能够对不同条件下的各数据集进行比较,这一点非常重要。我们的软件就具备了这些能力。

[0242] 比较不同条件下的表达并非一个微不足道的问题。各个格网的信号的绝对强度都与众不同,所以我们不能简单地做跨样品的信号强度比较。我们的软件提供了很多使无关的跨膜变化最小化的方法。例如,我们可以在各格网内定义内部标准(一个特殊的基因,或者所有基因的平均表达水平)。在将强度值对内部标准归一化之后,就可以对强度值进行跨格网的比较了。另一个办法是比较两种条件下的差值,用差值的分布来确定命中点。差值的分布不受膜之间差异的影响,而且还有一些其它的有益的统计特性。利用这些方法以及包含在我们软件中的其它方法,我们就能执行不同类型的必然因果关系数据分析来得到比较基因表达的最佳方法。

[0243] 大型基因表达研究的结果构成一个巨大的数据集。因此排列并处理这个数据集的数据管理功能非常重要。我们的单元显示功能创建可以被直接输入你的公司数据结构的矩阵。

[0244] 2. 高密度格网软件的细节

[0245] 分段

[0246] 在分析高密度格网之前必须完成三个主要任务:

[0247] 1. 识别各格网元素(我们将称其为目的基因)以便了解它在矩阵中的位置。这种识别必须考虑到格网创建中的某些变易。

[0248] 2. 量化各目的基因的密度(反映杂交强度)。这可能需要做密度标准校正,和/

或某种形式的本底修正。

[0249] 3. 选取感兴趣的^{目的基因}。一旦量化了^{目的基因密度}，我们就能记录各个和每个^{目标}，从而分析不同样品的^{基因表达}。或者我们可以从这个大阵列中仅仅选取有限数量的感兴趣的^{目的基因}（常常叫做^{命中点}）。

[0250] 分析的第一步总是^{目的基因识别}。从本底中辨别^{目的基因}的过程被称为^{分段}。

[0251] 人工分段

[0252] 最简单的分段形式是圈定各个^{目的基因}，一次一个。方法是用鼠标将圆圈放到各个^{目的基因}上。击鼠标的键，就会显示出^{目的基因}的强度和位置。

[0253] 在典型的库筛选中，在大范围的清晰的衬底上有少量明显可见的点指明了^{命中点}。点击这些明显的点（以产生它们的位置码）好象是一种可接受的检测方法。可是，即使^{命中点}是清晰可见的，人工分段也是不可行的。问题在于将这些^{命中点}分配到格网中合适的位置的过程。将任何点分配到格网中合适的位置首先涉及到这些点的检测和排列。当然，你可以手工点击所有这些点，但这将非常费时间。想象一下尝试圈定 1000 个^{目的基因}，再考虑许多实验室希望在不远的将来达到 100,000 个^{目的基因}。

[0254] 自动分段

[0255] 自动分段无需人工指导来发现^{目的基因}。你的自动分段系统的质量决定了它的成功与否。如果正确地实施了自动分段，它就能提供一个识别和分析千万个^{目的基因}的迅速和方便的方式。如果实施得不正确，自动分段会产生许多^{伪正点}和^{伪负点}，这就需要再加上后扫描编辑。最坏的情况下，差的自动分段会产生错误的^{数据}。

[0256] 自动分段的标准方法是给^{目的基因}指定一个特定的^{密度范围}。这个过程叫做^{阈处理}。处于这个^{密度范围}内的^{像素}被归为^{目的基因}。处于这个范围之外的^{像素}被归为^{本底}。

[0257] 如果^{目的基因}是不同大小和不同形状的，并且 / 或在图象中不固定的位置，则一个简单的^{密度阈}是最好的选择。例如一个用同位素原位探针标记的涂有感光乳胶的组织切片所包含的^{目的基因}（暗的颗粒）就会出现在图象中的任何位置上。我们可以对这个图象进行处理使得这些颗粒^{可见度}最高，设置一个^{密度阈}（例如 50 灰度级），然后检测比这个^阈更暗的^{像素颗粒}。

[0258] 与此对照，用格网，^{目的基因}被固定大小并被规则排列（图 11）。我们能够利用这种规则排列的优点来使分段更加精确和有效。实际上，单一的^{密度阈}在格网图象中是不够的。变化的局部本底（如左上部和右下部的^{密度}不同）和规定辨别^{目的基因}的^{强度水平}方面的不确定性会使其失效。我们的经验是在大多数格网分析的形式下，^{密度阈处理}是高度主观和棘手的任务。

[0259] 图 11 为空间上可变的^{目的基因}和格网^{目的基因}。左图中的^{目的基因}具有不同的大小和间距。它们可用设定^{密度阈}来检测。右图中的^{目的基因}被编组成格网。它们要用在各^{目的基因}位置上放置固定的^{探针}来探测。

[0260] 用固定的取样探针分段

[0261] 所幸的是格网能被十分客观和比无规^{目的基因}更有效地分析。我们知道^{目的基因}的间距、数量和直径，因此不需要以^{密度}作为^{目的基因识别}的唯一工具。AIS/MCID 使用固定^{取样探针}的方法代之。

[0262] 使用固定^{取样探针}时，格网定义决定分段处理。固定的^{取样探针}被（自动）放置

在格网的各个位置上。这样做的困难在于实际的样品很少是完全等间距的。我们将发现布点机器人迷路、复制偏离或一些其它的因素导致格网的变化。因此用固定取样探针方法分段需要分为两步。首先,用格网定义的点的位置来复制格网。然后系统用一些相当复杂的算法对实际目的基因进行自动格网排列(图 12)。

[0263] 图 12 为一个包含 1536 个分立点状斑的格网。我们看到左边的图象是无取样探针的。右边的图象显示了位于各个点状斑上的取样探针。我们用这些点状斑来自动放置、排列探针。

[0264] 比起用扫描来找出超过密度阈值的目的基因的方法,使用固定取样探针方法有几个优点:

[0265] 1. 我们检测每个目的基因并将其定量化,包括所含数据在本底水平或近本底水平的那些基因。

[0266] 2. 对每个目的基因的检测允许我们使用客观的统计程序(代替主观的密度阈)来定义命中点。

[0267] 3. 我们能在任意数量的实验条件下跟踪给定的目的基因,包括那些没有明显活化目的基因的实验条件。这在基因表达研究中是十分重要的。

[0268] 构造和排列格网

[0269] 格网是用键盘上输入的间隔参数(点与点之间的距离和组与组之间的距离)来构造的。以规定的间隔定出格网的原形,并从这个原形出发形成整个格网。

[0270] 精细排列

[0271] 某些格网取样探针很可能没有准确地放在分配给它的位置上。要解决这个问题,可以实行自动排列。在这个过程中,模糊逻辑算法将各分立格网元素放置在最符合实际图象数据的位置上。如果需要进一步排列,可以用鼠标把任何格网元素或元素组拉到位。

[0272] 锚

[0273] 不是所有的样品都有可以用来做精细排列的可见的点。在库筛选中,一般是在相当大的格网上只有少数几个可见点。在这种情况下,精细排列算法缺乏足够的数据而无法工作,除非在格网上加上已知的参考点。这些被称为“锚”的参考点包括一个可见的目的基因,并被用来指导自动排列。例如,我们的布点机器人创建一个含 6144 个分立点的格网,我们可以在四个角和其它更有意义的位置的点上放进易于检测的数量的标记。当我们创建格网时,AIS/MCID 将用这些锚作为参考点来实施自动排列。

[0274] 详尽模式和筛选模式

[0275] 详尽模式 - 基因表达

[0276] 详尽模式获取格网中各个和每个目的基因的值。详尽模式给出目的基因的完全描述,并允许直接在多至四个格网之间做比较。可是,数据表里常包含成千上万个数字,这会降低你的系统的速度。一般地说,对于几个各有 5000 点的阵列还没有什么问题。但是管理非常多的点(例如 30,000 或更多)就会限制容许能力。扫描格网不是主要问题。而仅仅核算一个含有 50,000 个数字的数据表就要花费一些时间。如果数据管理证明速度太慢,考虑改用筛选模式。

[0277] 详尽模式在基因表达研究中和杂交筛选的某些情形中是最有用的。这两种应用都不仅仅涉及简单辨别明显的命中点和本底。因此,了解格网的每个点的反应如何是十分有

用的。

[0278] 库筛选模式

[0279] 库筛选模式一次分析一个格网,并只显示这个格网中的命中点。当只有小比例的格网元素包含标记时,采用用库筛选模式从大量库藏中筛选未知的基因。

[0280] 筛选使用与详尽模式类似的逻辑结构,即要在统计分段之前扫描并量化所有的数据。不同之处在于我们想要从相对干净的样品中辨别出少数几个标记过的命中点。不需要记录那些未标记的格网位置,因为它们只会减慢系统的响应。

[0281] 在筛选分段之后,未被选中的就被丢掉了,只有命中点被保留下来。由于数据表中只显示命中点,数据管理就快得多了。

[0282] 详尽模式和筛选模式小结

[0283] 详尽模式和筛选模式的不同在于格网被量化之后发生的事情。详尽模式记录每个目的基因的值,以便你能进行必然因果关系的数据分析。与此相对照,库筛选模式只记录有效命中点。它在目的基因的分布中设置一个截断点(比如高于平均值 5 倍的标准偏差)以选择有限数量的命中点供进一步注意。只有超过截断点的那些目的基因才显示在数据表中。

[0284] 选择感兴趣的的目的基因;统计分段

[0285] 在详尽模式和筛选模式中,初始的分段步骤都使用固定取样探针和自动排列以从格网中各个和每个目的基因产生数据。一旦目的基因被分了段,并对它们的密度或体积进行了量化,就会使用不同程序来选择感兴趣的的目的基因。

[0286] 我们用统计分段这个术语来描绘这个过程,在这个过程中,我们从全部点中选择有限数量的命中点(筛选模式),或从一个样品到另一个样品跟踪基因表达中最重要的差别(详尽模式)。我们可以将统计分段定义为统计推理在目的基因的自动界定上的应用。

[0287] 筛选

[0288] 考虑这样一个实验:我们用探针从三个细胞株中筛选一个 cDNA 库。这些库被点到三个识别膜上(20K 探针/膜),每个膜是一个细胞株。在杂交过程之后,我们检查三个膜上的射线自显影,并断定所有的细胞株都显示出与库中的两个克隆强的杂交。但是,第三个细胞株(C 株)还显示出与另外一个克隆的杂交(强度稍弱)(图 13)。这可能是 C 株与另两株不同,但我们如何得知呢?

[0289] 图 13 为用探针从三个细胞系中筛选 cDNA 库。所有三个细胞株都与两个克隆杂交。细胞株 C 出现了与另一个克隆的杂交。要判断这是否是一个真实效应,我们需要比较三个膜上第三个克隆的杂交强度。

[0290] 可能影响我们关于第三个克隆的判断的几个因素:

[0291] 1. 第三个克隆可能与 C 株剧烈地杂交,但与 A 株和 B 株较弱地杂交。

[0292] 2. 第三个克隆专门与 C 株杂交,但杂交信号弱。

[0293] 3. 制备中可能包含一些模糊点,它们使得对第三个克隆的翻译复杂化了。

[0294] 在上述情况下,我们可能没有一个非黑即白的判定,而是做出要对第三个克隆加以注意的决定。这个信号强度是否足以作为命中点?简单地设置一个“看起来不错”的密度阈是相当武断的。

[0295] 为了帮助你做出客观的决定,系统找出并计算出所有目的基因**的强度**,数据中包

括那些只有本底强度的目的基因、那些比本底稍高但仍很弱的目的基因以及那些具有足以被肉眼所见的更强烈的探针-克隆相互作用的目的基因。

[0296] 一旦我们有了完备的数据集,我们就能用基于方差统计的程序来判别各个观察到的强度是命中点的几率。基于方差的判别与简单的仅仅在密度的基础上检测命中点的阈值判别不同,它将各个目的基因的密度与所有目的基因的分布特性相比较。命中点是那些最与众不同的目的基因。这样做的逻辑是:与其它目的基因非常不同的目的基因可能是应该研究的。这种基于方差的阈值的方案是非常有效的(运用统计学)和易于实施的。

[0297] 详尽模式和基因表达

[0298] 统计分段在示踪基因表达时很有用。在这些研究中,我们通常跨多个格网比较给定克隆探针的反应强度。那些被实验操作(例如使用潜在的药品化合物)增强或抑制的反应是感兴趣的反应。用统计分段分析这种研究方案的步骤如下:

[0299] 1. 测量所有目的基因的密度,跨若干样品来量化基因的表达水平。各个样品对应不同的实验条件。

[0300] 2. 计算出每对目的基因的差值记录。现在我们有了在各种实验条件下各目标克隆的差值分布。

[0301] 3. 计算差值记录分布的平均值和 SD(标准偏差)。

[0302] 4. 统计分段阶段。选择差值记录高于或低于平均值几倍 SD 单位的目的基因,这些目的基因可以被归为命中点。作为基于方差的判别,这个命中点的选择过程在总体密度上是与格网之间的差异无关的。

[0303] 5. 以一种叫做元素显示(见下文)的形式显示目的基因。

[0304] 小结

[0305] 统计分段是统计推理在格网数据分析上的应用。它的优点在于为判别目的基因提供了客观的标准,并且它允许我们对数据进行跨样品的比较。之所以有后一个优点是因为基于方差的分析使无关因素(如影印效果、曝光时间)的影响减至最小。

[0306] 总的来说,统计分段是从大量数据中提取有效命中点的一种客观的程序。统计分段的中央优点是:

[0307] a) 我们能有据地提出用来分辨命中点的标准;

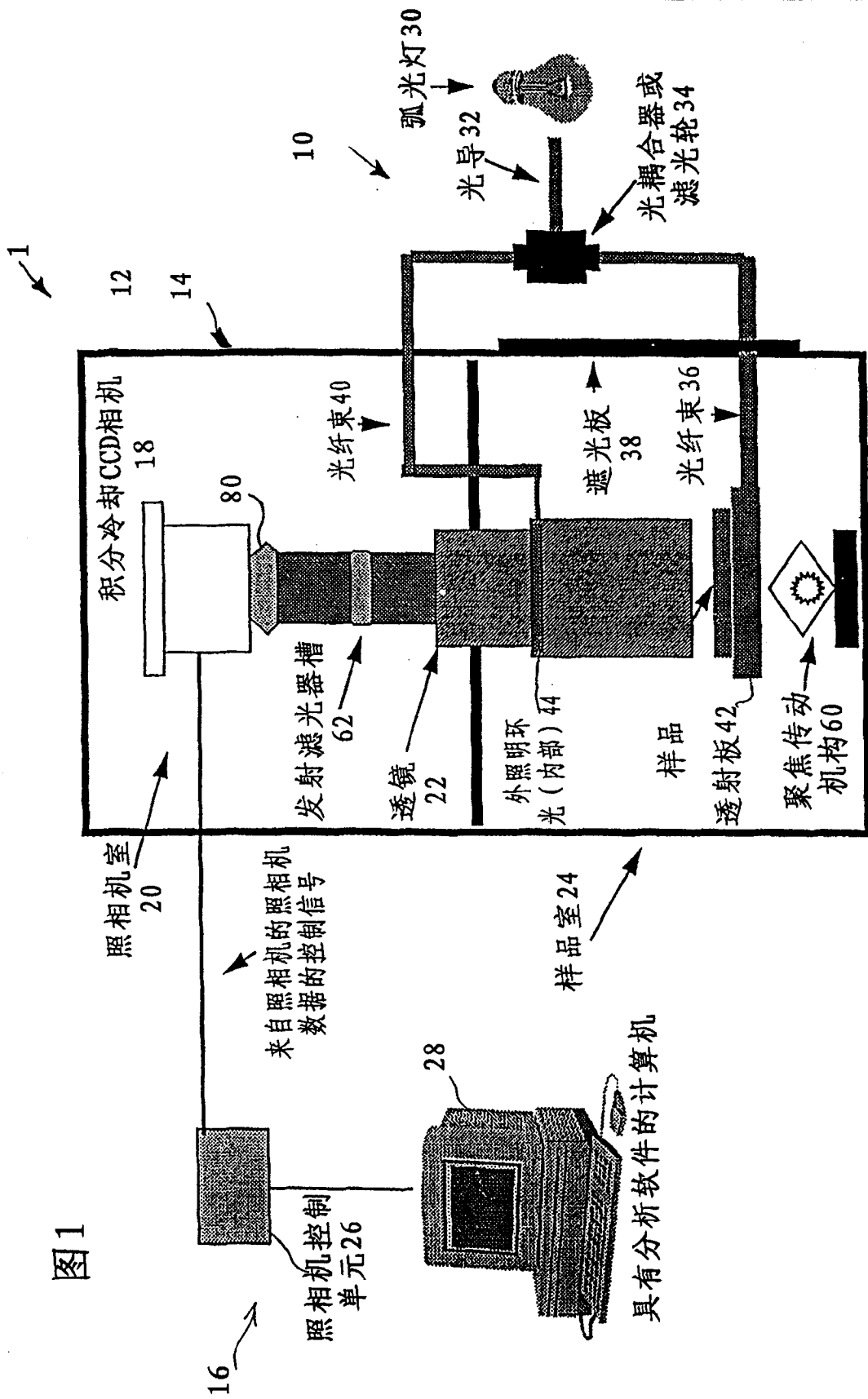
[0308] b) 我们能使外部处理变量的效应最小化,以简化跨格网的比较。

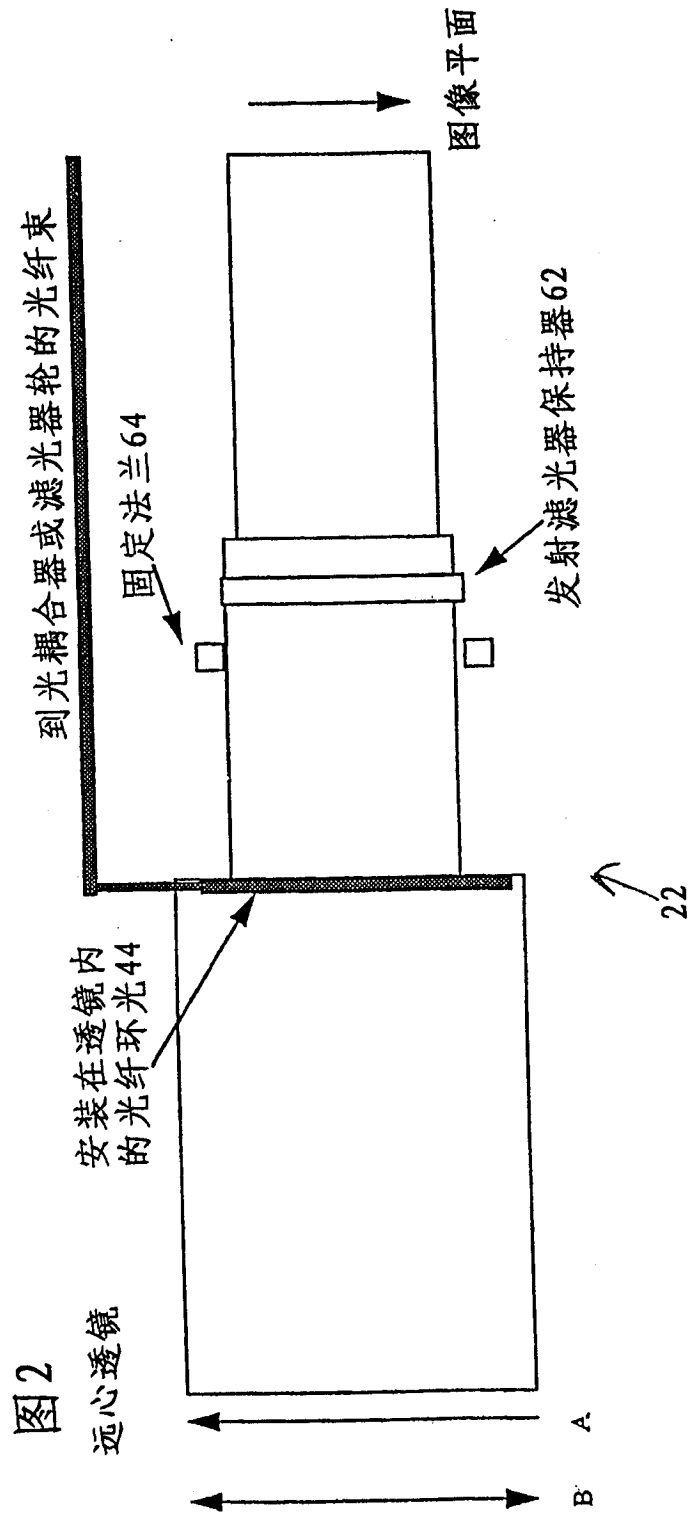
[0309] 快速数据通讯:元素显示

[0310] 格网分析会产生大量的数据点。这些数据可以用你认为合适的任何方式来描述。例如,向 Excel 输出数据矩阵,按照杂交强度排列,并用排列好的数据表来传达你的结果。

[0311] 另一个选择是创建元素显示。这是一种图形图象,它用不同方式标记有限数量的感兴趣的基因。例如,在筛选研究中,命令元素显示去标记密度高于点密度平均值六倍 SD 单位以上的点,元素显示将你的注意从常规过程的上千个点引向最相关的数据点(图 4)。

[0312] 当然,对一个干净的膜和一个二进制标记(通或断),可能不需要元素显示。我们可以只看原始图象来了解哪个点是命中点。可是当样品不干净,或存在标记强度梯度时,元素显示就变得非常有用了。在这些情况下,肉眼趋向于不确定,让计算机以颜色代码和易懂的方式来显示命中点就较容易。





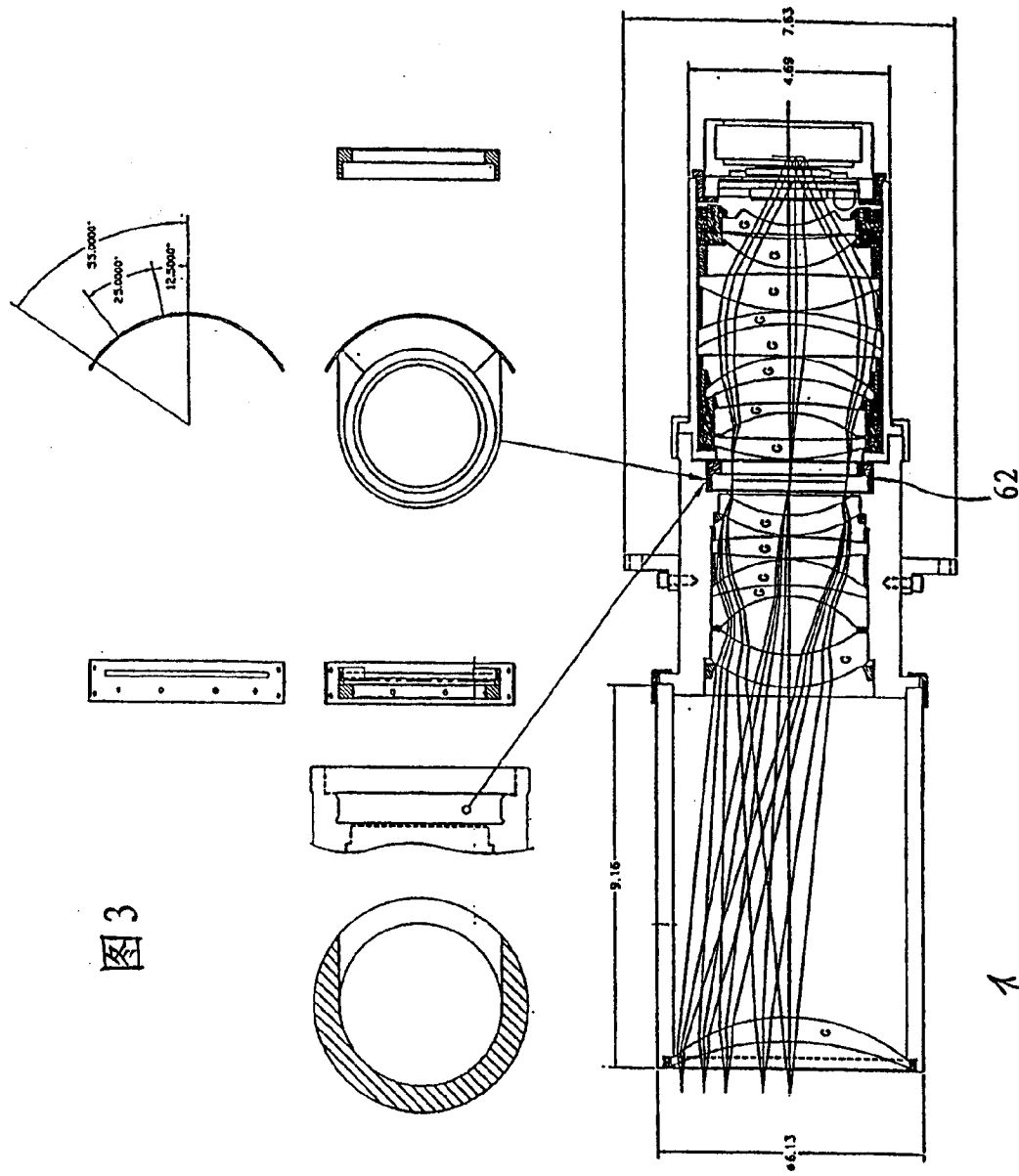
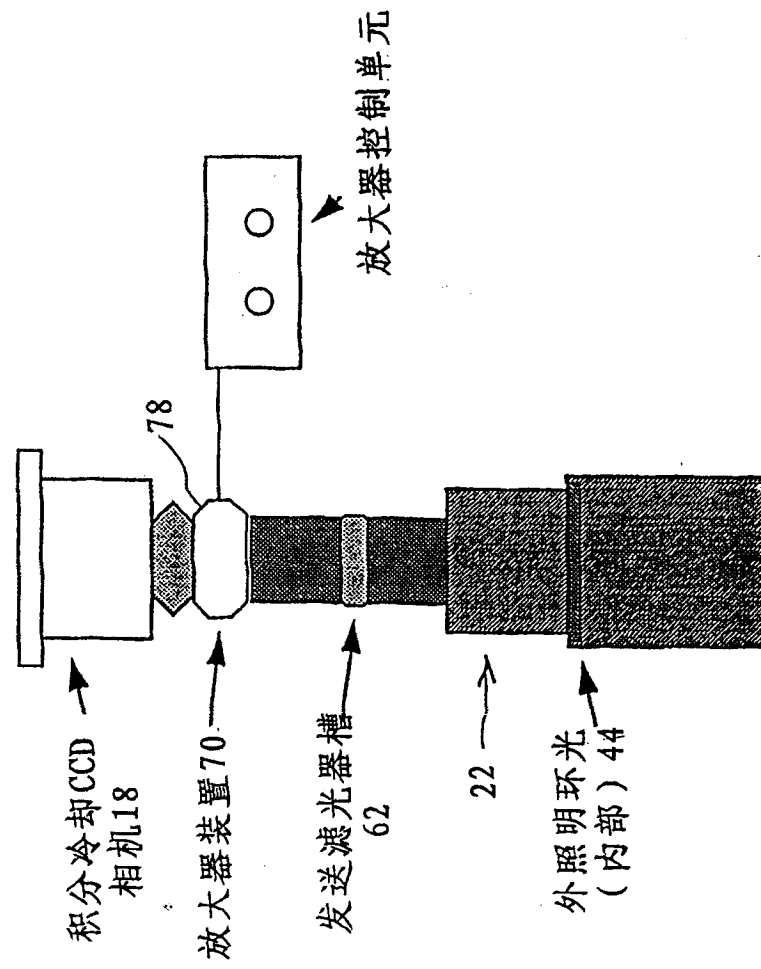


图 3

1. ALL METAL INTERNAL PARTS ARE TO BE CONSIDERED ± 0.001 IN LENGTH AND DIAMETER.
2. HOUSINGS (3) ARE ± 0.001 INTERNAL DIAMETER WITH ± 0.001 IN LENGTH TO SEATS AND CONTACT SURFACES.
3. ALL THREADS ARE 32 PITCH INCH.
4. ALL SURFACES ARE TO BE BLACK ANODIZED ON ALL PARTS.
5. MATERIALS ARE: 1. ALUMINUM; 2. ALUMINUM; 3. ALUMINUM; 4. ALUMINUM; 5. ALUMINUM; 6. ALUMINUM; 7. ALUMINUM; 8. ALUMINUM; 9. ALUMINUM; 10. ALUMINUM; 11. ALUMINUM; 12. ALUMINUM; 13. ALUMINUM; 14. ALUMINUM; 15. ALUMINUM; 16. ALUMINUM; 17. ALUMINUM; 18. ALUMINUM; 19. ALUMINUM; 20. ALUMINUM; 21. ALUMINUM; 22. ALUMINUM; 23. ALUMINUM; 24. ALUMINUM; 25. ALUMINUM; 26. ALUMINUM; 27. ALUMINUM; 28. ALUMINUM; 29. ALUMINUM; 30. ALUMINUM; 31. ALUMINUM; 32. ALUMINUM; 33. ALUMINUM; 34. ALUMINUM; 35. ALUMINUM; 36. ALUMINUM; 37. ALUMINUM; 38. ALUMINUM; 39. ALUMINUM; 40. ALUMINUM; 41. ALUMINUM; 42. ALUMINUM; 43. ALUMINUM; 44. ALUMINUM; 45. ALUMINUM; 46. ALUMINUM; 47. ALUMINUM; 48. ALUMINUM; 49. ALUMINUM; 50. ALUMINUM; 51. ALUMINUM; 52. ALUMINUM; 53. ALUMINUM; 54. ALUMINUM; 55. ALUMINUM; 56. ALUMINUM; 57. ALUMINUM; 58. ALUMINUM; 59. ALUMINUM; 60. ALUMINUM; 61. ALUMINUM; 62. ALUMINUM; 63. ALUMINUM; 64. ALUMINUM; 65. ALUMINUM; 66. ALUMINUM; 67. ALUMINUM; 68. ALUMINUM; 69. ALUMINUM; 70. ALUMINUM; 71. ALUMINUM; 72. ALUMINUM; 73. ALUMINUM; 74. ALUMINUM; 75. ALUMINUM; 76. ALUMINUM; 77. ALUMINUM; 78. ALUMINUM; 79. ALUMINUM; 80. ALUMINUM; 81. ALUMINUM; 82. ALUMINUM; 83. ALUMINUM; 84. ALUMINUM; 85. ALUMINUM; 86. ALUMINUM; 87. ALUMINUM; 88. ALUMINUM; 89. ALUMINUM; 90. ALUMINUM; 91. ALUMINUM; 92. ALUMINUM; 93. ALUMINUM; 94. ALUMINUM; 95. ALUMINUM; 96. ALUMINUM; 97. ALUMINUM; 98. ALUMINUM; 99. ALUMINUM; 100. ALUMINUM.
6. AREAS MARKED "C" ARE GLASS LENSES.

↑ 22

图4
设置在透镜和CCD相机之间的放大器装置



图像放大器

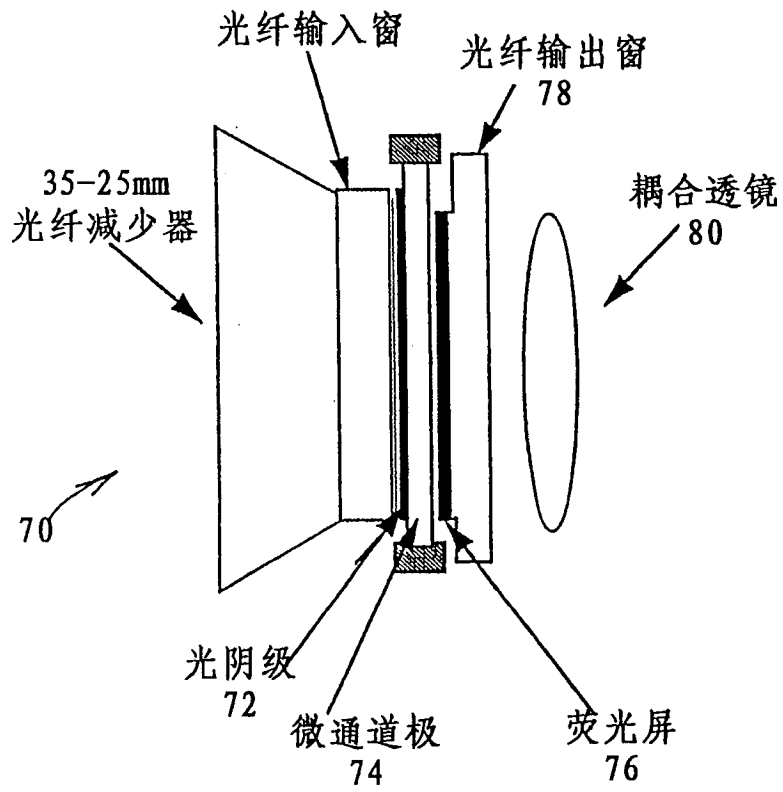


图 5

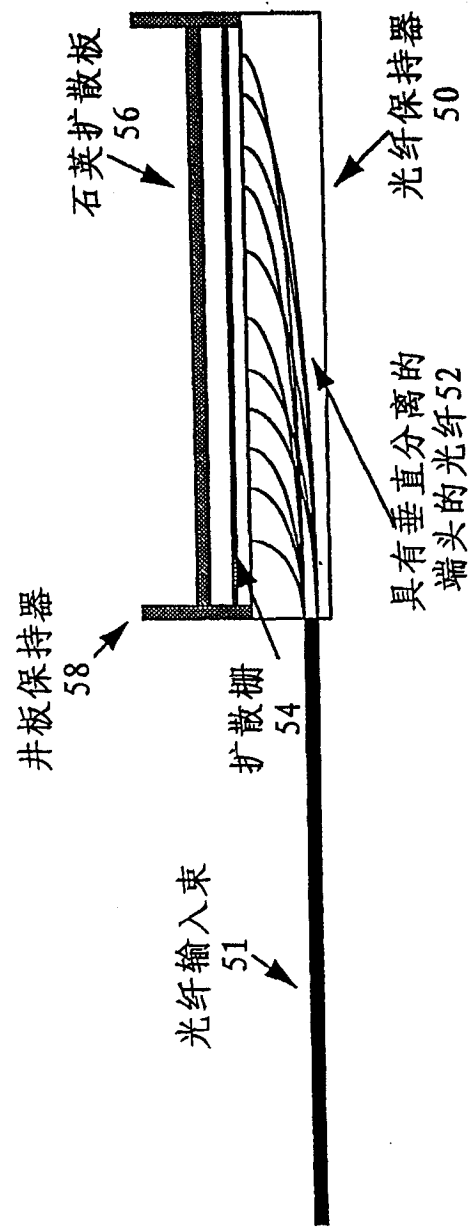


图6
扩散照明板，侧视图

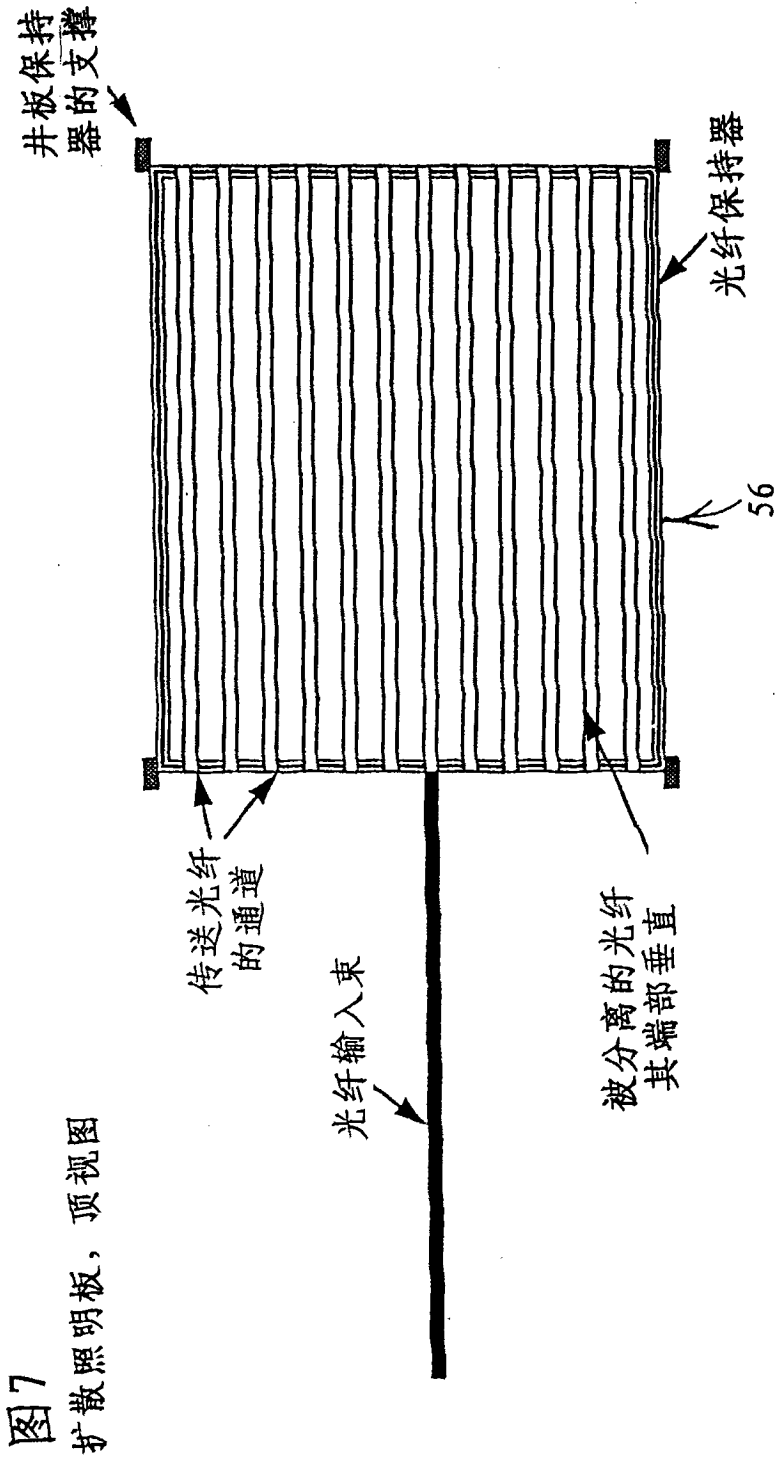
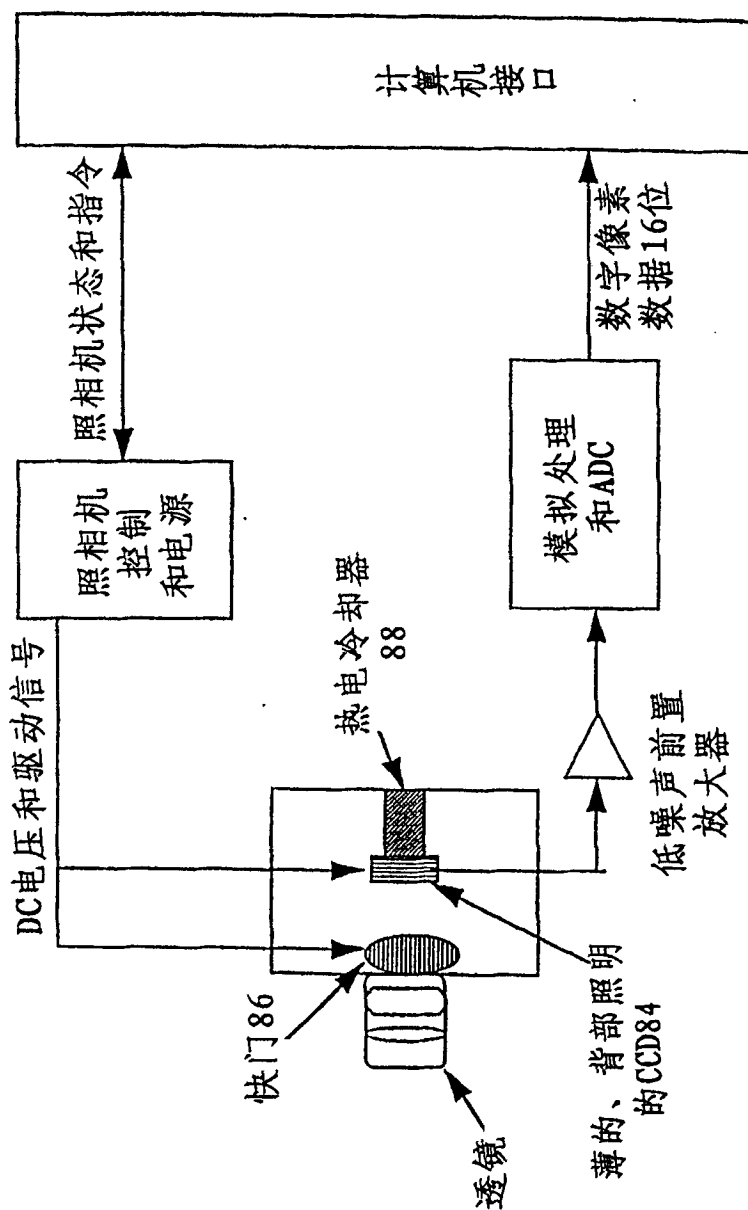
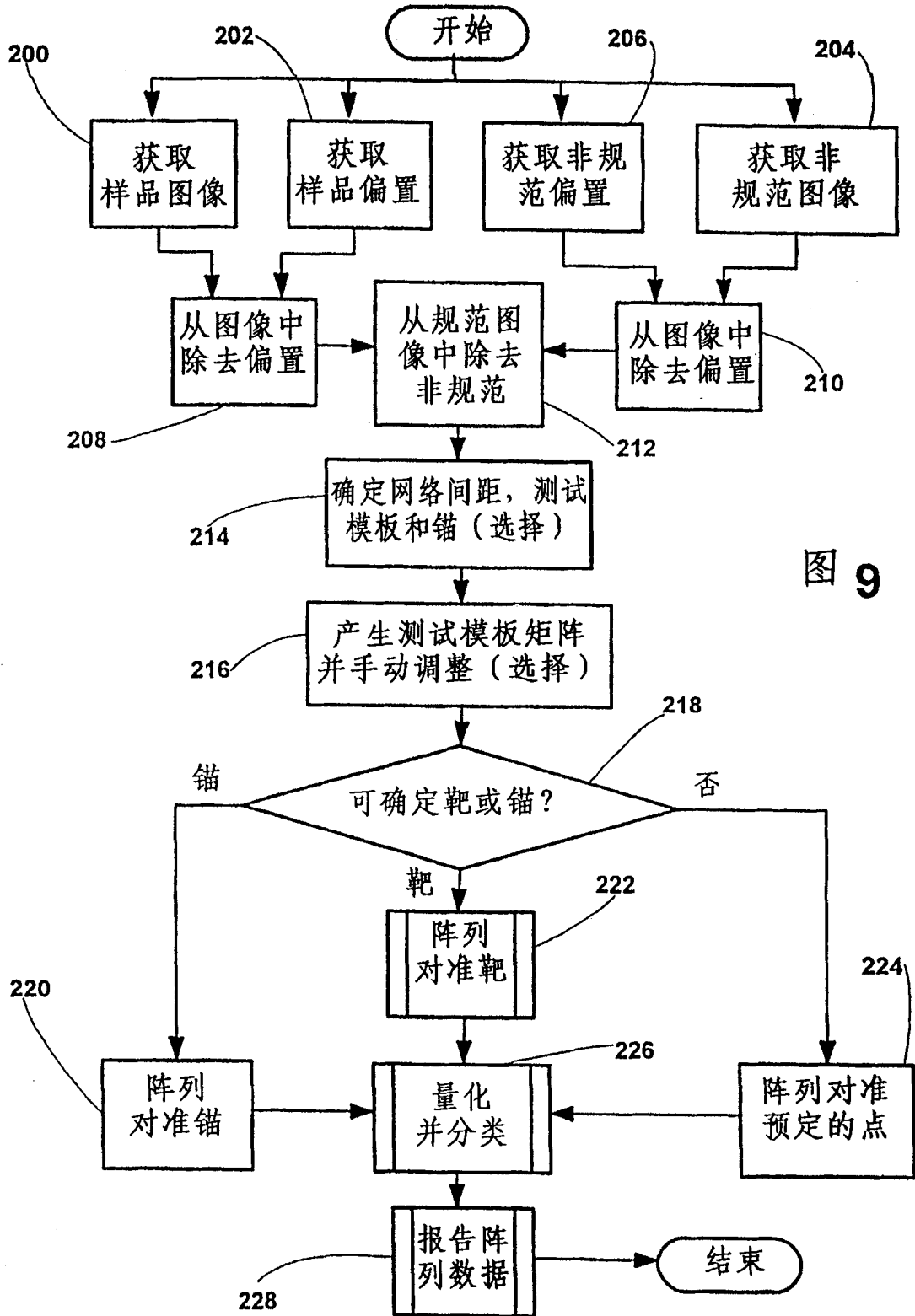


图8
CCD相机





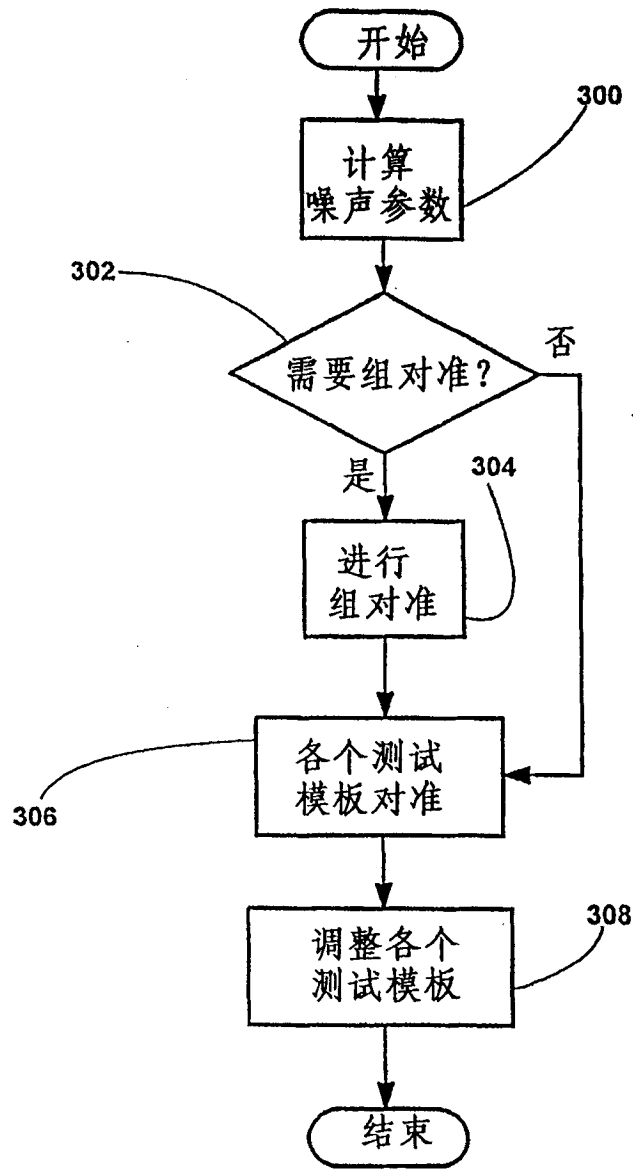


图 10

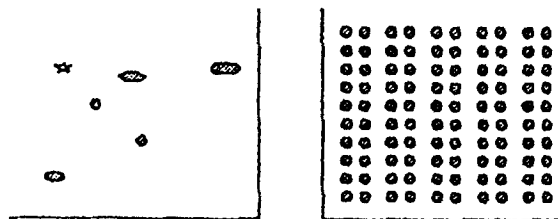


图 11

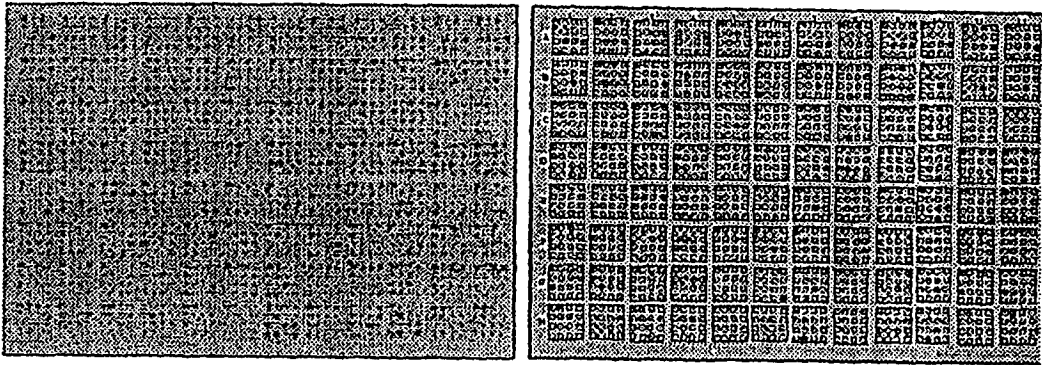


图 12

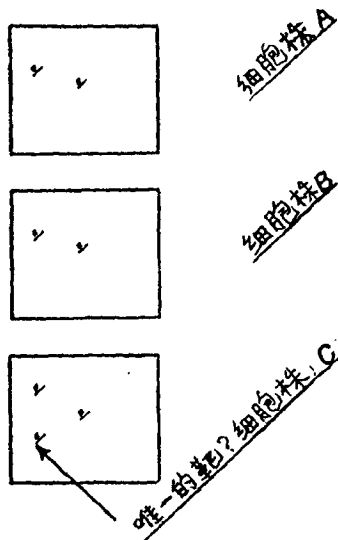


图 13