



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104704348 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201380053476. 5

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2013. 08. 21

G01N 21/64(2006. 01)

(30) 优先权数据

G01J 3/44(2006. 01)

61/691, 752 2012. 08. 21 US

G02B 21/16(2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

G06T 5/50(2006. 01)

2015. 04. 13

G01N 33/53(2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

G01T 7/00(2006. 01)

PCT/US2013/055969 2013. 08. 21

G01N 1/30(2006. 01)

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/031735 EN 2014. 02. 27

(71) 申请人 剑桥研究和仪器设备股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 C. C. 霍伊特

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 姚冠扬

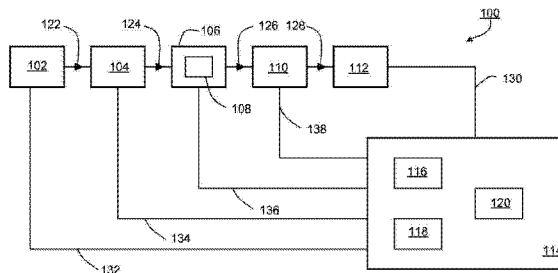
权利要求书3页 说明书14页 附图6页

(54) 发明名称

细胞的可视化和测量

(57) 摘要

本发明的特征方法和系统 (100) 包括探测器 (112), 所述探测器被构造成获得用第一染剂和第二染剂, 优选地是 CellMask™ Blue 和 Hoeschst/DAPI, 染色的样本 (108) 的多个图像, 其中, 所述第一和第二染剂具有类似的光谱吸收和发射轮廓; 以及电子处理器 (116), 所述电子处理器被构造成将所述多个图像分解成分离图像组, 其中, 所述分离图像组包括对应于第一染剂的第一分离图像和对应于第二染剂的第二分离图像, 并且基于第一分离图像识别样本 (108) 内的细胞核区域并基于第二分离图像识别样本 (108) 内的细胞质区域。



1. 一种系统,包括:

探测器,所述探测器被构造成获得用第一和第二染剂染色(stained)的样本的多个图像,其中,所述第一和第二染剂具有类似的光谱吸收和发射轮廓;以及

电子处理器,所述电子处理器被构造成:

将所述多个图像分解成分离图像组,其中,所述分离图像组包括对应于第一染剂的第一分离图像和对应于第二染剂的第二分离图像;以及

基于第一分离图像识别样本中的细胞核区域并基于第二分离图像识别样本中的细胞质区域。

2. 如权利要求 1 所述的系统,其中,所述电子处理器被进一步构造成产生样本的图像,并且其中图像中的细胞核和细胞质区域以如同该样本用苏木精和伊红染色相同的方式被着色。

3. 如权利要求 1 所述的系统,其中,所述样本包括一个或多个荧光探针,且其中所述分离图像组包括分离图像,每个所述分离图像对应于仅来自其中一个免疫荧光探针的贡献。

4. 如权利要求 3 所述的系统,其中,所述电子处理器被进一步构造成确定样本中的细胞核和细胞质区域内的至少一些免疫荧光探针的量。

5. 如权利要求 3 所述的系统,其中,所述样本包括至少三个免疫荧光探针。

6. 如权利要求 3 所述的系统,其中,所述样本包括至少五个免疫荧光探针。

7. 如权利要求 1 所述的系统,其中,所述多个图像包括荧光图像。

8. 如权利要求 1 所述的系统,其中,所述第二染剂是 CellMask Blue。

9. 如权利要求 8 所述的系统,其中,所述第一染剂是 DAPI。

10. 如权利要求 8 所述的系统,其中,所述第一染剂是 Hoechst33258。

11. 如权利要求 1 所述的系统,其中,所述多个图像限定了图像立方体。

12. 如权利要求 1 所述的系统,其中,所述多个图像中的每一个对应于针对荧光波长的不同对应范围的样本的荧光图像。

13. 如权利要求 1 所述的系统,还包括与所述探测器耦接的多光谱成像系统,其中,所述多光谱成像系统被构造成照亮样本以获得所述多个图像。

14. 一种方法,包括:

向样本施加至少两种染剂,其中,所述至少两种染剂具有类似的光谱吸收和发射轮廓;以及

基于所述至少两种染剂的光的吸收或发射,识别样本中的细胞核和细胞质区域。

15. 如权利要求 14 所述的方法,还包括:

获得样本的多个图像;

将所述多个图像分解成分离图像组,其中,所述分离图像组包括对应于第一种染剂的第一分离图像,和对应于第二种染剂的第二分离图像;以及

基于第一分离图像识别细胞核区域且基于第二分离图像识别细胞质区域。

16. 如权利要求 15 的方法,还包括产生样本的图像,其中,所述样本中的细胞核和细胞质区域以如同样本用苏木精和伊红染色相同的方式着色。

17. 如权利要求 15 所述的方法,其中,所述样本包括一个或多个免疫荧光探针,且其中,所述分离图像组包括分离图像,所述分离图像中的每一个对应于仅来自一个免疫荧光

探针的贡献。

18. 如权利要求 17 所述的方法,还包括确定样本的细胞核和细胞质区域内至少一些免疫荧光探针的量。

19. 如权利要求 17 所述的方法,其中,所述样本包括至少三个免疫荧光探针。

20. 如权利要求 17 所述的方法,其中,所述样本包括至少五个免疫荧光探针。

21. 如权利要求 15 所述的方法,其中,所述多个图像包括荧光图像。

22. 如权利要求 14 所述的方法,其中,所述至少两种染剂包括 CellMask Blue 和 DAPI。

23. 如权利要求 14 所述的方法,其中,所述至少两种染剂包括 CellMask Blue 和 Hoechst 33258。

24. 如权利要求 14 所述的方法,其中,所述多个图像限定了图像立方体。

25. 如权利要求 14 所述的方法,其中,所述多个图像的每一个对应于针对荧光波长的不同对应范围的样本的荧光图像。

26. 一种系统,包括:

探测器,所述探测器被构造成获得用第一和第二染剂染色的样本的多个图像,其中,所述第一染剂包括 DAPI 或 Hoeschst 33258,而所述第二染剂包括 CellMask Blue ;以及

电子处理器,所述电子处理器被构造成:

将所述多个图像分解成分离图像组,其中,所述分离图像组包括对应于第一染剂的第一分离图像和对应于第二染剂的第二分离图像 ;以及

基于第一分离图像识别样本中的细胞核区域以及基于第二分离图像识别样本中的细胞质区域。

27. 如权利要求 26 所述的系统,其中,所述电子处理器被进一步构造成产生样本的图像,并且其中,所述样本中的细胞核和细胞质区域以如同该样本用苏木精和伊红染色相同的方式着色。

28. 如权利要求 26 所述的系统,其中,所述样本包括一个或多个免疫荧光探针,且其中所述分离图像组包括分离图像,每个所述分离图像对应于来自仅一个免疫荧光探针的贡献。

29. 如权利要求 28 所述的系统,其中,所述电子处理器被进一步构造成确定所述样本中细胞核和细胞质区域内的至少一些免疫荧光探针的量。

30. 一种方法,包括:

施加至少两种染剂到样本,其中第一染剂包括 DAPI 或 Hoeschst33258,而第二染剂包括 CellMask Blue ;以及

基于所述至少两种染剂的光的吸收或发射来识别所述样本中的细胞核和细胞质区域。

31. 如权利要求 30 所述的方法,还包括:

获得样本的多个图像;

将所述多个图像分解成分离图像组,其中所述分离图像组包括对应于第一种染剂的第一分离图像和对应于第二种染剂的第二分离图像 ;以及

基于第一分离图像识别细胞核区域以及基于第二分离图像识别细胞质区域。

32. 如权利要求 31 所述的方法,还包括产生样本的图像,其中所述图像中的细胞核和细胞质区域以如同所述样本用苏木精和伊红染色那样相同的方式着色。

33. 如权利要求 31 所述的方法, 其中, 所述样本包括一个或多个免疫荧光探针, 且其中所述分离图像组包括分离图像, 每个所述分离图像对应于来自仅一个免疫荧光探针的贡献。

34. 如权利要求 33 所述的方法, 还包括确定所述样本中细胞核和细胞质区域内的至少一些免疫荧光探针的量。

细胞的可视化和测量

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 8 月 21 日提交的美国临时专利申请第 61/691,752 号的优先权,该美国临时申请的全部内容通过引用结合于此。

技术领域

[0003] 本发明涉及包括细胞和组织样本的生物样本的成像。

背景技术

[0004] 染色剂和荧光剂广泛用于可视化细胞和组织内的结构。例如,在病理中,通常使用苏木精和伊红染料制剂 (H&E) 来可视化细胞和组织内的结构。从以这种方式染色的细胞中获得的信息能够用于识别细胞类型或组织结构,或用于诊断疾病。为了同样广泛的目的,也可以使用其他制剂,如巴氏染剂。这些染剂用于亮视野显微镜中,在该显微镜中,被染色的样本通过观察通过样本透射的光线予以观看。通过染剂吸收或散射在样本的图像中产生颜色或对比度。

[0005] DAPI (4',6-二脒基-2-苯基吲哚) 是荧光复染剂,它结合细胞核和组织中的 DNA 分子。它被广泛用于荧光显微镜中,以确定样本中的细胞核的位置或存在。在这项技术中,样本利用一个波长的光线(典型地是在 350nm 到 370nm 紫外范围)激励,并且样本发出在光谱的紫光区域中的光线。Hoechst 33258 染剂用于类似的目的,并且具有与 DAPI 类似的激励和发射特性。

[0006] 免疫荧光 (IF) 探针可用于对细胞和组织中的蛋白质的存在、位置和量进行成像。这种探针的使用能够针对各种研究和临床任务进行高特异性测量。已经研发了用于将多个免疫荧光探针施加到单个样本的技术。光学串扰以及诸如抗体相互作用和非特异性结合的其他因素会限制能够使用的探针的数量,并且会降低精度或者减少可用的蛋白质表达范围。

发明内容

[0007] 本文公开的系统和方法使用复染剂,该复染剂具有与标志物类似的吸收和发射轮廓 (profile),用于样本内的不同亚细胞区域。由于这些复染剂具有类似的发射轮廓,通常在样本的荧光图像中,它们不能被彼此视觉区分。光谱分离技术能够用于将这些复染剂中每一个的贡献分离到多光谱图像中。分离的图像可以用于识别样本内的亚细胞区域,如样本内的一个或多个细胞中的细胞核和细胞质。一个或多个 IF 探针可以施加到样本上,以定位和量化特定细胞实体,如在样本不同区域之内的蛋白质。在一些实施方式中,如果是利用 H&E 染剂制备并且在亮视野显微镜中观察,则从模拟样本将如何呈现的复染剂的分离图像中产生视图。这提供了关于样本的有价值的背景信息 (context information),否则它将遗失在荧光图像中。

[0008] 通常,在第一方面中,本发明的特征系统包括:探测器,该探测器被构造成获得用

第一和第二染剂染色的样本的多个图像,其中第一和第二染剂具有类似的光谱吸收和发射轮廓;以及电子处理器,该电子处理器被构造成将所述多个图像分解成分离的图像组,其中,被分离的图像组包括对应于第一染剂的第一分离图像和对应于第二染剂的第二分离图像,并且基于第一分离图像识别样本中的细胞核区域以及基于第二分离图像识别样本中的细胞质区域。

[0009] 该系统的实施方式可包括如下特征中的一个或多个。

[0010] 所述电子处理器能够被构造成产生所述样本的图像,其中,样本中的细胞核和细胞质区域以相同的方式着色,如同样本用苏木精和伊红染色一样。

[0011] 样本可以包括一个或多个免疫荧光探针,并且被分离的图像组可以包括各自与来自仅仅一个免疫荧光探针的贡献相对应的分离图像。所述电子处理器能够被构造成确定样本的细胞核和细胞质区域中至少一些免疫荧光探针的量。所述样本可以包括至少三个免疫荧光探针(例如,至少五个免疫荧光探针)。

[0012] 所述多个图像可以包括荧光图像。所述第二染剂可以是 CellMask Blue。所述第一染剂可以是 DAPI。所述第一染剂可以是 Hoechst 33258。所述多个图像可以限定图像立方体。多个图像中的每一个可以对应于针对荧光波长的不同对应范围的样本的荧光图像。

[0013] 所述系统可以包括多光谱成像系统,该多光谱成像系统耦接到所述探测器,其中,所述多光谱成像系统被构造成照亮所述样本以获得所述多个图像。

[0014] 所述系统的实施方式也可以按需要以任何组合形式包括本文公开的任何其他特征。

[0015] 在另一方面,本发明的特征方法包括向样本施加至少两种染剂,其中,所述至少两种染剂具有类似地的光谱吸收和发射轮廓;以及基于所述至少两种染剂的光的吸收或发射来识别样本中的细胞核和细胞质区域。

[0016] 所述方法的实施方式可以包括如下特征中的任一个或多个。

[0017] 所述方法可以包括获得样本的多个图像;将所述多个图像分解成分离图像组,其中所述分离图像组包括对应于第一种染剂的第一分离图像和对应于第二种染剂的第二分离图像;以及基于第一分离图像识别细胞核区域并基于第二分离图像识别细胞质区域。

[0018] 所述方法可以包括产生样本的图像,其中,所述图像中的细胞核和细胞质区域以与样本利用苏木精和伊红染色的方式相同的方式来着色。

[0019] 所述样本可以包括一个或多个免疫荧光探针,并且所述分离图像组可以包括分离图像,每个分离图像对应于来自仅仅一个免疫荧光探针的贡献。所述方法可以包括确定在样本中的细胞核区域和细胞质区域中至少一些免疫荧光探针的量。

[0020] 所述样本可以包括至少三个免疫荧光探针(例如,至少五个免疫荧光探针)。所述多个图像可以包括荧光图像。所述至少两种染剂可以包括 CellMask Blue 和 DAPI。所述至少两种染剂可以包括 CellMask Blue 和 Hoechst 33258。所述多个图像可以限定图像立方体。所述多个图像的每一个可以对应于样本的荧光图像,用于荧光波长的不同对应范围。

[0021] 所述方法的实施方式还可以包括按需要任意组合的任何本文公开的其他特征或步骤。

[0022] 在进一步的方面,本发明的特征系统包括:探测器,所述探测器被构造成获得用第一和第二染剂染色的样本的多个图像,其中,所述第一染剂包括 DAPI 或 Hoeschst 33258,

而第二染剂包括 CellMask Blue ;以及电子处理器,所述电子处理器被构造成将多个图像分解成分离的图像组,其中,所述分离的图像组包括对应于第一染剂的第一分离图像和对应于第二染剂的第二分离图像 ;并且基于所述第一分离图像识别样本中的细胞核区域并基于所述第二分离图像识别样本中的细胞质区域。

[0023] 所述系统的实施方式可以包括如下特征中的任一个或多个。所述电子处理器可以被构造成产生样本的图像,其中,所述图像中的细胞核和细胞质区域以如同样本用苏木精和伊红染色一样的方式被着色。

[0024] 所述样本可以包括一个或多个免疫荧光探针,其中,所述分离图像组包括分离图像,每个所述分离图像对应于来自仅仅一个免疫探针的贡献。所述电子处理器可以被构造成确定所述样本内的细胞核和细胞质区域中的至少一些免疫荧光探针的量。

[0025] 所述系统的实施方式还可以按需要以任何组合方式包括本文公开的任意其他特征。

[0026] 在另一方面,本发明的特征方法包括将至少两种染剂施加于所述样本,其中,所述第一染剂包括 DAPI 或 Hoeschst 33258,而第二染剂包括 CellMask Blue,并且基于至少两种染剂的光线的吸收或发射来识别样本中的细胞核和细胞质区域。

[0027] 所述方法的实施方式可以包括如下特征中的任一个或多个。

[0028] 所述方法可以包括获得样本的多个图像,将所述多个图像分解成分离图像组,其中,所述分离图像组包括对应于所述染剂中的第一种的第一分离图像和对应于所述染剂中的第二种的第二分离图像 ;以及基于所述第一分离图像识别细胞核区域并且基于所述第二分离图像识别细胞质区域。

[0029] 所述方法可以包括产生样本的图像,其中所述样本中的细胞核区域和细胞质区域以如同样本用苏木精和伊红染色那样相同的方式被着色。

[0030] 所述样本可以包括一个或多个免疫荧光探针,并且所述分离图像组可以包括分离图像,每个所述分离图像对应于来自仅仅一个免疫荧光探针的贡献。所述方法可以包括确定所述样本内的细胞核区域和细胞质区域中的至少一些免疫荧光探针的量。

[0031] 所述方法的实施方式也可以按需要以任何组合方式包括本文中公开的任何其他特征或步骤。

[0032] 除非另有限定,本文中使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。虽然与本文描述的那些类似的或等价的方法和材料可以在本文的主题的实践和测试中使用,但是在下面描述适当的方法和材料。在此提到的所有出版物、专利申请、专利和其他参考文件通过引用整体结合于此。在冲突的情况下,本说明书,包括定义在内,将起主导作用。另外,材料、方法和示例仅仅是说明性的,而非意在限制。

[0033] 在下面的附图和描述中陈述了一个或多个实施方式的细节。其他特征和优点将从该描述、附图和权利要求中显而易见。

附图说明

[0034] 图 1 是示出针对 CellMask Blue 和 DAPI 染剂的发射光谱的曲线,该发射光谱是从用这些染剂制备的样本中测量的 ;

- [0035] 图 2 是用 CellMask Blue 和 DAPI 制备的样本的图像；
- [0036] 图 3 是图 2 的样本的图像，示出细胞核和细胞质组分；暗灰色区域对应于细胞质，而淡灰色区域对应于细胞核组分；
- [0037] 图 4 是图 2 的样本的图像，该图像被遮挡 (shade) 以显示如果样本用 H&E 染色，它是如何显现的；
- [0038] 图 5 是图 2 的样本的图像，其中每个细胞的细胞质和细胞核组分被分段并且渲染为图像上的覆盖层；
- [0039] 图 6 是用于获取样本的多个光谱解析图的系统的示意图。
- [0040] 各个附图中相同的附图标记表示相同的元件。

具体实施方式

[0041] 识别阻止和细胞内的不同亚细胞区域的传统方法（尤其是，识别与细胞核对应的区域以及与细胞质对应的区域的传统方法）涉及到向样本施加多种复染剂，其中，所施加的复染剂中的一种被用于识别细胞核区域，而其他的用于识别细胞质。这些染剂通常被选择成使得它们的吸收或发射轮廓在光谱上良好地分离。通过改变用于照亮样本的光线的波长，每种染剂能够各自选择性相互作用 (interrogated)，并且对应于细胞核和细胞质的样本的区域可以彼此区分开。在样本的图像中，每个像素可以被指派给细胞核区域或细胞质区域。

[0042] 可替代的，可以使用多频带激励滤波器，并且两种复染剂可以被同时激励；假设所述复染剂具有良好分离的发射轮廓，其典型地对应于不同的颜色，基于所导致的发射中的颜色差异，彩色摄像机或人类观察者能够将细胞核区域从细胞质区域区分开。

[0043] 但是，使用具有显著不同吸收轮廓的两种复染剂会使得电磁波谱的相当大量的可视部分不可用于其他成像目的。具体地说，可以用于识别蛋白质和其他实体的特定类型的 IF 探针的数量和类型被减少，这是因为复染剂所使用的光谱的部分不可以被 IF 探针使用。

[0044] 与用于识别细胞核和细胞质区域的传统染色协议相反，本文公开的系统和方法使用具有类似光谱吸收轮廓的复染剂来识别细胞核和细胞质区域。以这种方式，光谱的大部分可视部分仍可与 IF 探针一起使用。

[0045] 相对于传统染色协议，更大数量的 IF 探针能够与单个样本一起使用，提供了多种优点，其中，可以从样本获取更多信息。另外，通过从单个样本获取信息，可以消除测量结果中的变动，否则，该测量结果的变动会由于样本与样本的差异而产生。例如，可以获知单个细胞内的多种蛋白质的相对值和比率，这对于细胞而言是高度信息性的，给出细胞行为的信号。

[0046] 此外，部分由于它们类似的光谱吸收轮廓，在本发明中用于识别样本内的细胞核区域和细胞质区域的复染剂也具有类似的光谱发射轮廓。结果，在两种复染剂已经施加其上的样本的图像中，通常肉眼不可识别复染剂。但是，在下面进一步详细描述的光谱分离方法能够用于将这些复染剂中每一种对光谱图像的贡献分离开，使得能够识别不同的样本区域。满足这些标准的一对复染剂的一个示例是 DAPI（用于识别细胞核区域）和 CellMask Blue（用于识别细胞质）。满足这些标准的一对复染剂的另一个示例是 Hoechst 33258（用于识别细胞核区域）和 CellMask Blue。

[0047] 通过适当选择用于识别样本区域（例如，细胞核区域和细胞质区域）的复染剂，复染剂和 IF 探针之间的光谱串扰可以被降低或消除。这提高了量化信息的可靠性，该量化信息提取自 IF 探针的荧光测量结果。例如，在一些实施方式中，样本用 DAPI 染色，以识别细胞核区域，并用 CellMask Blue 染色以识别细胞质。在电磁波谱的可视部分内，这些复染剂都不会强烈吸收光线。这意味着来自很多 IF 探针的荧光不会被复染剂明显吸收。并且，复染剂不会被用于激励普通 IF 探针的可见光激励。结果，更多的这种 IF 探针可以施加到相同样本以瞄准 (target) 特定细胞结构，而不会受到复染剂干涉或与复染剂光谱串扰。这增加了能够被测量的蛋白质或其他感兴趣化合物的数量。当具有适当光谱属性的其他复染剂被用于识别细胞核和细胞质区域时，也可以实现类似的优点。

[0048] 当用于识别样本区域的染剂不是本身基于抗体的时，在实施方式中实现了另外的优点。例如，CellMask Blue 是一种非基于抗体的样本复染剂，并且它不与 IF 探针标记中使用的其他抗体干涉。DAPI 和 Hoechst 染剂也是如此。由此，从抗体相互作用以及光学干涉的观点，它们不限制能够施加到样本上的 IF 探针的数量，降低从 IF 探针获得的量化结果的精度或者减小能够被探测的有用的蛋白质表达范围。

[0049] 本发明的再另一个优点在于：由于细胞质信息是在很小的额外复杂度情况下得出，并且不会减少能够使用的 IF 探针的数量，细胞质信息能够在实验中获得，否则在试验中细胞质信息根本不可得，或者将以有价值的 IF 信息为代价来获得。总之，在很多情况下，该效果是使得获得细胞质信息可行，否则该信息将是缺失的。

[0050] 本文中公开的系统和方法也实现基于获得的测量数据对图像进行合成和显示。例如，在一些实施方式中，提供了所述系统和方法，该系统和方法用于利用荧光剂（例如，IF 探针）处理生物样本，在多光谱成像系统对样本成像，以及产生数字合成图像，所述数字合成图像在外观上与在样本用 H&E 制备并且在亮视野显微镜下观察的情况下所具有的外观在视觉上类似。这种视图被称为数字 H&E 视图。

[0051] 通过获得关于样本之内的各区域（例如细胞核区域和细胞质区域）的信息以及关于样本内的各种 IF 探针的位置的信息，来自每个 IF 探针的棉衣荧光信号能够被量化并且与样本内的各区域相关联。例如，与样本的细胞核区域以及与细胞质区域相关联的特定免疫荧光信号的量可以被确定。此外，对于在一个或多个细胞内的不同类型区域（例如，细胞核和细胞质）中的每一个而言，可以量化多个免疫荧光信号。数字图像可以显示细胞核区域、细胞质区域或二者的位置。这种图像也可以显示这些区域内一个或多个 IF 探针的位置。

[0052] 如在此使用的，“染剂”是指为被染色的所关注组分提供光谱签名的化合物或结构（例如，染料）。例如，光谱签名对应于从染剂吸收或发射的光谱分布。术语“复染剂”具体是指不提供高程度分子特异性，但代之通常在施加到样本上时结合特定生理结构的染剂。例如，DAPI 是公知的荧光染料，其能够施加到生物样本上，以提供空间情景和地标。具体地说，DAPI 优先结合到细胞核，并由此在细胞的细胞核与非细胞核组分之间提供对比。但是它不具有与 IF 探针相关联的高程度的分子特异性。可以与本文公开的方法和系统一起使用的复染剂的其他示例包括 CellMask Blue, Hoechst 33258 和 Hoechst 33342。

[0053] IF 探针可以结合荧光部分，如荧光素、若单明、荧石的 Alexa 系列（可自 Invitrogen, Carlsbad, CA 购得）、四乙基若丹明异硫氰酸盐 (TRITC)、荧石的 Cy 系列（可自

GE Healthcare Biosciences, Pittsburgh, PA 购得)、或其他荧光,这取决于诸如成本或个人喜好、成像设备的能力、可用的材料之类的因素和可能产生的其他因素,只要激励或发射特性与复染剂的激励或发射特性区分开即可。可替代的是,IF 探针可以使用量子点,而非荧光分子来产生发射光。

[0054] 多光谱成像系统

[0055] 在已经利用具有类似吸收和发射轮廓的复染剂(单独用于识别不同的样本区域(例如,细胞核区域和细胞质区域))染色样本,并且可选的,一个或多个 IF 探针已经施加到样本之后,样本在多光谱成像系统中成像以获得样本的一个或多个图像。图 6 是示出用于获取样本的多光谱解析图像的系统 100 的示意图。光源 102 将光线 122 提供到光调节光学器件 104。光线 122 可以是非相干光,如从例如灯丝光源产生的光线,或者光线 122 可以是相干光,如激光器产生的光线。光线 122 可以或是连续波(CW)的或时间门控的(即,脉冲的)光线。此外,光线 122 可以在电磁波谱的选择部分内提供。例如,光线 122 可以具有落入光谱的紫外线、可见光、红外线或其他区域内的中间波长和/或波长分布。

[0056] 光调节光学器件 104 可以被构造成以多种方式转变光线 122。例如,光调节光学器件 104 能够在光谱上过滤光线 122,以提供在光谱的选定波长区域内的输出光。可替代地或另外地,光调节光学器件可以调节光线 122 的空间分布和光线 122 的时间属性。入射光线 122 是通过光调节光学器件 104 的元件的作用而由光线 122 产生。

[0057] 入射光线 122 被引导以入射到照明台 106 上安装的样本 108 上。台 106 提供了固定样本 108 的装置,如安装夹或其他紧固装置。可替代的,台 106 可以包括可移动的轨道或带,其上固定多个样本 108。驱动器机构可以被构造成移动轨道,以便将多个样本一次一个地依次平移通过台 106 上的照明区域,在该区域,入射光线 122 投射到其上。样本 108 可以进一步保持在载体或匣中,以利于操纵。台 106 可以进一步包括用于相对于照明台 106 的固定位置平移样本 108 的平移轴和机构。平移机构可以手动操作(例如丝杠)或者可以通过电致动(例如,机动驱动器、压电致动器等)而自动移动。

[0058] 响应于入射光线 124,发射光线 126 从样本 108 中浮现。典型地,入射光线 124 被样本 108 吸收,并且发射光线 126 对应于响应入射光线 124 而来自样本 108 的荧光发射。

[0059] 在一些实施方式中,样本 108 是来自人或动物的病理样本。它可以是组织切片或细针吸引物。在特定实施方式中,样本是通过擦拭或刮拭肺、子宫颈、胃肠道、或其他器官而获得的细胞的集合。在一些实施方式中,样本可以包括从血液、痰液或其他生物流体获得的细胞。尤其是,在一些实施方式中,样本可以包括血液样本,其被检验以用于循环肿瘤细胞或其他罕见细胞。在一些实施方式中,样本 108 可以包括单个细菌或其他微生物,或者来自细胞培养的细胞。样本 108 中的细胞或组织可以是活的、固定的或者更宽泛地说按需要处于任何状态。

[0060] 光收集光学器件 110 定位成接收来自样本 108 的发射光线 126。光收集光学器件 110 可以被构造成例如在光线 126 是发散的时准直该发射光线 126。光收集光学器件 110 也可以被构造成光谱上过滤发射光线 126。过滤操作会是有用的,例如,以便将通过上面讨论的机构中的一个产生的发射光线 126 的一部分与通过其他过程产生的光线隔离开。进一步地,光收集光学器件 110 可以被构造成改进发射光线 126 的空间和/或时间属性,以用于实施方式中的特定目的。光收集光学器件 100 将发射光线 126 转变成入射到探测器 112 上

的输出光线 128。

[0061] 探测器 112 包括一个或多个元件,如 CCD 传感器或科学 CMOS 成像传感器,它们构成探测输出光线 128。在一些实施方式中,探测器 112 可以被构造成测量光线 128 的空间和 / 或时间和 / 或光谱属性。探测器 112 产生与输出光线 128 相对应的电信号,并且通过电通信线路 130 与电子控制系统 114 连通。

[0062] 电子控制系统 114 包括处理器 116、显示装置 118 和用户界面 120。除了接收与探测器 112 所探测的输出光线 128 相对应的信号,控制系统 114 将电信号发送到探测器 112,以调节探测器 112 的各种属性。例如,如果探测器 112 包括 CCD 传感器,控制系统 114 可以将电信号发送到探测器 112,以控制曝光时间、有缘区域、增益设定和 CCD 传感器的其他属性。

[0063] 电子控制系统 114 还通过电通信线路 132、134、146 和 138 分别与光源 102、光调节光学器件 104、照明台 106 和光收集光学器件 110 连通。控制系统 114 向系统 100 的这些元件中的每一个提供电信号,以调节这些元件的各种属性。例如,提供给光源 102 的电信号可以用于调节光线 122 的强度、波长、重复率或其他属性。例如,提供给光调节光学器件 104 和光收集光学器件 110 的信号可以包括用于构造调节光线的空间属性(例如,空间光调制器)的装置的属性和用于构造空间过滤装置的信号。例如,提供给照明台 106 的信号可以实现 (provide for) 将样本 108 相对于台 106 定位和 / 或用于将样本移动到台 106 上以供照明的位置。

[0064] 控制系统 114 包括用于显示系统属性和参数并用于显示样本 108 的被捕捉的图像的用户界面 120。提供用户界面 120 以便于操作者与系统 100 相互作用并控制系统 100。处理器 116 包括用于存储利用探测器 112 捕捉的图像数据的存储装置,并且也包括计算机软件,该计算机软件向处理器 116 实施指令,导致处理器 116 执行控制功能,如,例如上面描述的那些功能。

[0065] 通常,系统 100 被构造成获取样本 108 的多个光谱图像。多个光谱图像可以对应于在各种选择波长的光线下对样本 108 照明并且探测样本 108 发射的光线的强度。多个光谱图像中的一些对应于用具有类似光谱属性的光线照明样本 108 并且收集样本 108 的多个图像,每个图像对应于发射光线 126 的不同波长。在光调节光学器件 104 和光收集光学器件 110 中的光谱过滤元件通常用于获得光谱解析数据。

[0066] 在一些实施方式中,样本 108 的图像可以按顺序收集,并且在依次捕捉的图像之间,调节光学部件(例如,光学过滤器)的配置。在其他实施方式中,多个图像可以利用探测系统同时捕捉,该探测系统被构造成探测多个样本视图。例如,探测系统可以被构造成将对应于不同发射波长的样本的不同视图投影到诸如 CCD 摄像机的探测器上,或者投影到多个这种探测器上,并且多个视图可以被同时捕捉。

[0067] 在一些实施方式中,光调节光学器件 104 包括可调节光谱过滤器元件,如滤光轮或液晶光谱过滤器。过滤器元件可以被构造成利用不同的光波长段照明样本 108。光源 102 可以提供具有光谱波长分量的宽分布的光线 122。这个宽的波长分布的选定区域被光调节光学器件 104 内的过滤器元件允许穿过作为入射光线 124,并被引导而入射到样本 108 上。被样本 108 发射的光线 126 的图像被探测器 112 记录。随后,光调节光学器件 104 中的滤波通带的波长被改变,以提供具有不同波长的入射光线 124,并且通过样本 108 发射的(并

且对应于入射光线 124 的新波长的) 光线 126 的图像被记录。通过采用具有产生不同波长的光线的多个光源元件的光源 102, 并且交替开关不同的光源元件以提供不同波长的入射光线 124, 也可以记录类似组的光谱解析图像。

[0068] 来自样本 108 的发射光线 126 典型地包括与来自样本 108 之内的荧光化学结构的荧光发射对应的光。在一些实施方式中, 发射光线 126 也可以包括一个或多个额外的贡献, 例如被样本 108 反射、被样本 108 散射或者透射过样本 108 的入射光线 124 的部分。在发射光线 126 包括一个或多个额外贡献的情况下, 在光调节光学器件 110 内的光谱过滤元件可以被用于将这些贡献与荧光发射分离。

[0069] 通常, 光调节光学器件 104 和光收集光学器件 110 二者可以包括可配置光谱过滤器元件。因此, 光谱解析可以在样本 108 的激励侧上设置 (例如, 通过光调节光学器件 104) 或者在样本 108 的发射侧上设置 (例如, 通过光收集光学器件 110), 而在二者上设置。在任何情况下, 对样本 108 的多个光谱解析的图像的收集的结果是图像堆栈, 该堆栈中的每个图像是对应于激励和发射波长的特定组合的样本的二维图像。概念上讲, 该组图像可以被可视化而形成三维矩阵, 其中, 两个矩阵维度是每个图像的空间长度和宽度, 而第三个矩阵维度是光谱构造, 即, 该图像所对应的发射和激励波长的组合。为此原因, 该组光谱解析图像可以被称为图像的光谱立方体。如在本文中所使用的, 在这样的一组图像 (或图像堆栈或光谱立方体) 中的像素是指每个图像的共同空间位置。于是, 一组图像中的像素包括在对应于像素的空间位置处与每个图像相关联的数值。

[0070] 尽管上面描述的每个光谱图像典型地称为激励和发射波长或波长范围 (如, 光谱带) 的特定组合, 更一般地说, 每个光谱图像可以对应于包括一个或多个波长带的光谱指数, 或者一些更复杂的光谱分布。例如, 这种图像可以通过利用光谱梳状滤波器产生。

[0071] 通常, 图像立方体包括多于三个光谱图像, 例如, 4 个或更多个图像 (例如, 5 或更多个光谱图像、6 个或更多个光谱图像、7 个或更多个光谱图像、8 个或更多个光谱图像)。但是, 在一些实施方式中, 图像立方体可以包括较少的图像, 例如, 仅两个或三个光谱图像。一个这样的示例是包含两个光谱图像的图像立方体, 其中一个光谱图像对应于 450nm 至 470nm 范围内的发射, 而另一个光谱图像对应于 490 至 510nm 范围内的发射, 在两种情况下, 样本用在 350 至 380nm 的紫外线范围内的光线激励。可选择的, 存在第三图像平面, 该第三图像平面对应于可见光发射, 而样本在可见光波长带内激励。虽然这种图像立方体可以显示为单个彩色图像, 但这样的彩色图像不对应于样本的视觉表现; 在刚刚给出的示例中, 它对应于分别包括两个或三个光谱图像的图像立方体。于是, 术语“图像立方体”同样用于描述与此类似的情况。

[0072] 多光谱图像的分析

[0073] 一旦已经获取了图像的光谱立方体, 图像组可以被分离成来自每种复染剂和 IF 探针 (如果存在的话) 的单独贡献。

[0074] 如上面讨论的, 在传统染色协议中, 具有良好分离的光谱吸收和发射轮廓的复染剂被用于识别不同区域 (例如, 细胞核区域和细胞质区域), 但是这种方法消耗了电磁光谱中很多可视区域, 留下相对少的光谱空间用于利用 IF 探针探测样本中的特定蛋白质。

[0075] 相反, 在本文中公开的方法和系统中, 具有类似吸收和发射轮廓的复染剂用于识别样本内的不同区域。但是, 由于它们类似的光谱轮廓, 这些染剂具有非常类似的颜色外

表,并具有宽的光谱重叠。

[0076] 它的细节在图 1 中表明,图 1 示出两种染剂的发射轮廓。在 460nm 处,CellMarker Blue 具有其峰值发射,DAPI 呈现其峰值发射的 60%,而在 500nm 处,情形几乎相反。在 540nm 处,DAPI 落入半峰值,而 CellMarker Blue 仍在其峰值的大约 20%。由此,不存在一种颜色或一个单独的波长,在该波长处仅细胞核复染剂强烈发射,而没有来自细胞质复染剂的发射,或反之亦然。于是,不能通过审慎地选择波长而将两种信号简单地隔离。

[0077] 更一般地说,如在本发明中使用的,两种染剂具有类似的吸收轮廓,如果在第一染剂的峰值吸收波长处,第二染剂的吸收值至少为第二染剂的峰值吸收值的 30%或更大。此外,两种染剂具有类似的发射轮廓,如果在第一染剂的峰值发射波长处,第二染剂的发射值至少为第二染剂的峰值发射值得 30%或更大。

[0078] 在本文中公开的系统和方法中使用的复染剂可以具有在甚至更大程度上重叠的吸收和/或发射轮廓,在一些实施方式中,如上面针对 CellMarker Blue 和 DAPI 所讨论的。通常,在第一染剂的峰值吸收波长处,第二染剂的吸收值可以在第二染剂的峰值吸收值的至少 40%或更大(例如,至少 50%或更大、至少 60%或更大、至少 70%或更大、至少 80%或更大)。类似地,在第一染剂的峰值发射波长处,第二染剂的发射值可以是第二染剂的峰值发射值的至少 40%或更大(例如,至少 50%或更大、至少 60%或更大、至少 70%或更大、至少 80%或更大)。

[0079] 为了将样本图像中这些染剂的每一种的光谱贡献分离开,图像立方体可以被光谱分离,这产生一组分离图像。其中一个分离图像大致对应于仅来自细胞核复染剂的贡献,并且它可以用来识别样本中的细胞核区域。另一个分离图像大致对应于只来自细胞质复染剂的贡献,并且可以用于识别样本中的细胞质区域。其他分离图像大致对应于来自每个所使用的 IF 探针(若存在的话)的贡献。

[0080] 光谱分离程序基本上由将在每个像素处的总体信号分解成一组光谱本征态。物理上,本征态对应于样本中的组分的光谱,如呈献给探测器的。在很多实施方式中,光谱是事先已知的,已经或是从单个染色的控制样本测量,或是从参考信息中获得。在其他实施方式中,光谱可以利用如独立组分分析的技术来确定。在任何情况下,一旦已经识别了光谱,则可以通过在每个像素处计算将来自每个光谱的贡献与总体信号相对应的一组值,并对所有像素重复这样做,而将图像立方体分解成其分量。以这种方式,图像立方体被分离成其光谱分量,以产生分离图像组。

[0081] 作为示例,利用激励波长和发射波长的若干不同组合,可以针对样本测量具有 x 和 y 坐标的一组二维图像。如上所述,该二维图像可以被组合,以形成三维图像立方体 $I(x, y, k)$,其中,图像立方体的前两个索引表示坐标方向,而第三个索引是对应于用来获取该图像的激励和发射波长的组合的光谱指数。

[0082] 为了简单的缘故,假设样本的每个图像包含来自两个不同光谱源 $F(k)$ 和 $G(k)$ 的光谱贡献,那么三维图像立方体 $I(x, y, k)$ 中的值可以如下给出:

$$[0083] \quad s(x, y, k) = a(x, y) \cdot F(k) + b(x, y) \cdot G(k) \quad (1)$$

[0084] 其中,k用于表示激励和发射波长(或波长带)的给定组合。函数 $a(x, y)$ 和 $b(x, y)$ 描述来自样本中两个不同光谱源的光谱贡献的空间丰度。

[0085] 根据公式(1),三维图像立方体(即,两位像素坐标和激励和发射波长的特定组

合) 中的任何位置的净信号是两个贡献的和, 所述两个贡献由每个贡献的相对丰度来加权。这可以表示为:

$$[0086] \quad I(k) = aF(k) + bG(k) \quad (2)$$

[0087] 函数 F 和 G 可以称为用于系统的光谱本征态, 这是因为它们对应于样本中的光谱元的纯光谱, 它们以变化的比例组合以产生样本的测量光谱图像。从而, 样本光谱是对应于来自两个光谱源的单独贡献的加权叠加。

[0088] 如果光谱 F(k) 和 G(k) 是已知的 (或者可以导出), 那么方程 (2) 可以被倒置, 以求解 a 和 b, 假设光谱 I 包括至少两个元素 (即, 假设一个具有用于至少两个光谱构造 k 的数据)。方程 (2) 可以被重写为矩阵形式为 $I = EA$, 使得

$$[0089] \quad A = E^{-1}I \quad (3)$$

[0090] 其中 A 是具有分量 a 和 b 的列向量, 而 E 是矩阵, 该矩阵的列是光谱本征态, 即: [F G]。

[0091] 利用方程 (3), 样本的被测量光谱图像可以用于计算在特定像素位置处单纯由源 F 和单纯由源 G 对图像的贡献。对于选定图像上的每个像素位置 (即, 遍及 I 中的值 x 和 y 的范围) 重复该过程, 以产生包括仅来自源 F 的贡献的样本的图像和包括仅来自源 G 的贡献的样本的另一图像。

[0092] 在上述讨论中, 光谱源的数量是二 (即, F 和 G)。但是, 通常, 分离技术不局限于任何特性数量的源。例如, 样本可以通常包含 m 个不同光谱源。如果数据被收集的波长的数量是 n, 即, $k = 1 \cdots n$, 那么矩阵 E 是 $n \times m$ 矩阵, 而非 $n \times 2$ 矩阵, 如上面所讨论的。分离算法可以按照与上面描述相同的方式被采用, 以隔离在图像中每个像素位置处来自 m 个光谱本征态中每一个的贡献。

[0093] 会限制算法在来自不同光谱本征态的贡献之间做出区分的能力的一个因素是本征态之间的光谱区分程度。两个光谱之间的相关性, 如两个光谱本征态 I_1 和 I_2 可以通过光谱角 θ 来描述, 其中:

$$[0094] \quad \theta = \cos^{-1} \left[\frac{I_1 \cdot I_2}{\|I_1\| \|I_2\|} \right] \quad (4)$$

[0095] 对于两个元件而言, θ 小的光谱组不容易分离成它们的分量。物理上, 此原因容易理解: 如果两个光谱仅仅稍有不同, 则难于确定每个的相对丰度。

[0096] 多种技术可以被用来测量或估算光谱元 F 和 G (以及在样本包括多于两个光谱源的情况下的其他光谱源) 的纯光谱。通常, 可以使用能够产生足够准群的光谱本征态的任何方法。一个优选实施方式是准备一组控制样本, 每个样本包含仅单独一个复染剂或 IF 标签, 并且通过测量所述组中每个样本对所使用的激励和发射波长的每个组合的响应来获得本征态。有时, 样本利用多个复染剂来制备, 但是有可能识别与仅单独一种类型的细胞区域 (并由此与特定染剂) 相对应的样本图像中的特定像素或像素组。例如, 在用 DAPI 和 CellMarker Blue 复染的样本的图像中, 可以通过选择图像中与细胞核邻近的点来测量 CellMarker Blue 光谱, 该点处仅包含或主要包含来自细胞质细胞区域的贡献。在一个这样点处的光谱, 或优选地很多这样点处的光谱可以用于估计细胞质复染剂的光谱。

[0097] 在一些情况下, 样本可以包含光谱源, 如染料、量子点或其他部分, 对于它们而言,

具有在公开参考文件中可以获知的光谱。

[0098] 也可以使用各种数据分析技术,用于确定光谱分离的组分光谱,如独立组分分析(ICA)、多变量分析和主成分分析(PCA)。在很多情况下,在生命科学中,图像立方体中存在的信号光谱是组分的混合物。如果关注的组分不是以单纯形式处于原始图像立方体的某个位置,这些技术不能对于样本中所有染剂产生光谱估计的精确的组。

[0099] 存在一些技术,有时称为凸包(convex-hull)算法,该算法估计真是的端元是什么,即使它们在图像中并非以纯粹形式存在,但是,有效性取决于图像立方体中的信号光谱与端元如何接近。

[0100] 可以用于提取光谱本征态(或其估计值)而不必先前已知所有本征态的一种技术涉及到考虑对于给定像素的信号光谱 $I(k)$,并且从其减去第一光谱源 $F(k)$ 的最大量,同时留下剩余信号,该剩余信号在所有光谱通道中是正定的。即,针对每个像素的所谓的剩余光谱为:

$$[0101] \quad U_a(k) = I(k) - aF(k) \quad (5)$$

[0102] 并然后选择参数 a 的最大值与 $U_a(k)$ 一致,且 $U_a(k)$ 在每个光谱通道中具有非负值。所形成的光谱 $U_a(k)$ 然后用作信号光谱,抹去由于第一光谱源 F 的贡献。也可以不基于上面列出的严格非负标准来对参数 a 进行确定,而是基于一些相关标准,该相关标准包括小的负值分布,以将测量系统中的诸如短噪声或探测器噪声之类的因素考虑在内。用于去除光谱源 F 的最大的优化标准的其他示例包括利用不同的误差函数。

[0103] 可替代的是,可以试图从测量的光谱中提取第二光谱源 G 所导致的贡献。与方程(5)类似,剩余光谱可以针对每个像素计算为:

$$[0104] \quad U_b(k) = I(k) - bG(k) \quad (6)$$

[0105] 其中,选择参数 b 的最大值与 $U_b(k)$ 一致,且 $U_b(k)$ 在每个光谱通道中具有非负值。

[0106] 余值技术可以拓展到对于样本的一个或多个额外组分的光谱是已知的情况,并且希望从信号中去除它们的贡献。在这种情况下,基于额外光谱并且与每个光谱通道中的正余值一致,剩余光谱可以被写成从观测到的信号中减去每个这种组分的贡献。

[0107] 额外光谱分离技术在Richard Levenson等人提交的名称为“生物样本的光谱成像(SPECTRAL IMAGING OF BIOLOGICAL SAMPLES)”的PCT专利申请第W02005/040769中描述。

[0108] 为了本文公开的光谱分离技术将样本图像中的由于不同光谱本征态导致的贡献分离开,方程(1)应该至少近似正确。即,测量的光谱数据应该近似描述为加权本征态的线性重叠。这种近似保持用现代CCD或CMOS探测器做出的大部分荧光或发光测量结果,只要图像被正确曝光(即,探测器未饱和),并且施加于图像的任何增益、亮度和对比度相对于信号电平呈线性。

[0109] 例如,光谱分离操作(例如矩阵逆变技术和余值技术)可以通过电子控制系统114经处理器116执行。这些操作可以包括系统操作者执行的手动介入和配置步骤,或者系统100可以被构造成以自动方式执行这些操作。

[0110] 图像显示和量化

[0111] 如上面讨论的,样本的多光谱图像(例如荧光图像)典型地被获取并且分离成分图像,以识别样本内的不同区域并且将IF探针定位在样本的不同区域内。关于样本区域以及IF探针的位置的信息然后能够被用于向系统操作者显示各种不同的图像。

[0112] 例如, 在一些实施方式中, 产生数字 H&E 视图。在这些视图中, 样本被渲染成如同它已经用 H&E 染色并在亮视野成像情况下观察那样。这个数字 H&E 视图可以通过如下步骤合成, 即: 获取光谱图像立方体并且将其分离成一组组分图像, 所述一组组分图像包括对应于细胞核复染剂和细胞质复染剂的图像, 并可选地包括对应于样本中可能存在的其他染剂或 IF 探针的图像。然后, 通过以白色背景为开始渲染图像, 该白色背景被蓝色层相乘, 并进一步被粉色层相乘, 所述蓝色层在每个像素处的透明度对应于细胞核复染剂组分图像值, 而所述粉色层在每个像素处的透明度对应于细胞质复染剂组分图像值。

[0113] 病理学家和其他人发现这种视图对于解释样本的内容来说是非常有价值的。本文公开的系统和方法除了荧光探针所提供的细胞信息之外还提供这个信息, 二者是互补的。

[0114] 执行这种渲染的一个方式是使用以下方程:

$$[0115] \quad RPV = WP \cdot HC^{NCC} \cdot EC^{NCC} \quad (7)$$

[0116] 其中 RPV 是在给定位置的渲染 {R,G,B} 像素值, WP 是白色点, 通常为 {255, 255, 255}, HC 是被选择代表苏木精的颜色, 如 {0, 0, 255}, EC 是被选择代表伊红的颜色, 如 {255, 0, 192}, NNC 是在该像素处的归一化细胞核组分值, 而 NCC 是在该像素处的归一化细胞质组分值。在上下文中, 归一化意思为分离的组分图像从它们的原始范围 (例如, 对于 8 位图像可以是 0-255, 对于 12 位图像可以是 0-4095) 缩放到如下范围, 即: 在该范围中, 0 对应于没有染剂, 而 1 对应于存在中度或强染剂。

[0117] 精确的蓝色和粉色染料被选择以分别匹配苏木精和伊红的视觉外观, 并且 HC 和 EC 可以被调节到操作者的喜好 (如果期望这样的话)。类似地, 组分图像的缩放可以被调节, 以产生每个组分或二者的或多或少的生动外观。如果需要的话, 亮度、对比度和伽玛校正也可以施加到所形成的图像上。这些和其他的修正对于计算机图形领域的技术人员来说是已知的, 并且可以被采取以产生 H&E 视图的更加好看的图像或更加忠实的模拟。

[0118] 在一些实施方式中, 图像立方体中的单个像素被指派为属于细胞核区域、细胞质区域 (或其他类型的区域) 或指派为非细胞区域。这可以通过多种方式来实现。在一些实施方式中, 这种指派是通过将分离组分图像中的像素值相对阈值进行比较, 并且使用如下规则组来执行, 该规则组诸如为: 它的细胞核组分信号超过第一阈值的像素被宣称为细胞核; 否则, 如果像素的细胞质组分信号超过第二阈值, 则该像素被宣称为细胞质; 否则, 该像素不被指派给任何细胞区域。

[0119] 也可以采用更复杂的划分策略。例如, 可以基于细胞核复染剂分离图像, 利用诸如信号强度、纹理、平滑度等的特征来划分细胞核区域。接近细胞核的像素可以被划分为细胞质区域, 假设它们的细胞质组分图像信号在目标范围之内。

[0120] 本文公开的系统和方法除了 IF 探针提供的分子信息之外还提供了源自复染剂的信息; 经常而言, 这两种类型的信息是互补的。

[0121] 在一些实施方式中, 数字 H&E 视图被提供给病理学家和其他人, 使得与通过使用传统渲染的荧光图像或者通过使用实际显微镜图像相比能够更方便地识别样本中的地标和感兴趣区域 (或者感兴趣的细胞)。从数字 H&E 视图获得的关于样本或感兴趣细胞的洞察力使得这些人能够选择在什么情况下测量 IF 信号且 / 或可以基于细胞结果或形态来改变信号电平的解释。病理学家或其他人也能够将 IF 信息与从数字 H&E 视图获得的总体视觉评价相结合, 以形成总体临床判断。

[0122] 在特定实施方式中,显示样本中不同细胞区域的图像可以与对应于 IF 探针的一个或多个分离图像相重叠。以这种方式,在样本中的每个不同细胞区域中由 IF 探针所标记的实体的量和位置能够被可视化和量化。来自每个 IF 探针的贡献可以被颜色编码,例如,辅助在各探针之间视觉认识和区分。在被 IF 探针作为目标的一个或多个分子中高效表达的细胞可以被评分为正并高亮,或者用假彩色覆层来显示。可以对样本之内的一些或全部细胞执行 IF 探针信号的显示和量化。以这种方式获得并显示的信息对于研究细胞信号转导、异质性是有价值的,并且在希望获知细胞群体之内的多个标记的统计数据的其他情况下是有价值的。

[0123] 硬件和软件

[0124] 结合从样本收集、处理、分析、解释和显示信息的各种方法的上述步骤可以利用标准编程技术以计算机程序实现,所述步骤包括与分离光谱图像以获得对应于 IF 探针和/或复染剂的组分图像相关联的步骤、与结合/重叠这种图像以用于显示相关联的步骤以及与给这种图像着色以提供样本的视觉表现(例如,提供数字 H&E 图像)的步骤。这种程序被设计为在可编程计算机上或者在专门设计的集成电路上执行,每个包括电子处理器(例如,处理器 116)、数据存储系统(包括存储器和/或存储元件)、至少一个输入装置和至少一个输出装置,如显示器或打印机。程序编码被施加到输入数据(例如,来自探测器的图像),以执行本文描述的功能,并且产生输出信息(例如,显示样本组分的贡献的图像、多个组分图像的重叠图),该输出信息被应用于一个或多个输出装置,如包括显示装置的用户界面。每个这种计算机程序可以高级过程式或面向对象的编程语言、或汇编语言或机器语言来实现。此外,该语言可以是编译或解释的语言。每个这种计算机程序可以存储在计算机可读存储介质(例如,CD-ROM 或磁盘),该计算机可读存储介质在被计算机读取时能够使得计算机中的处理器执行本文描述的分析和控制功能。

[0125] 示例

[0126] 在下面的示例中,进一步描述本文公开的主题,这些示例并非意在限制权利要求的范围。

[0127] 示例 1

[0128] 根据以下协议制备 WM164 细胞。准备具有八个腔的载玻片,并且在每个腔中放置大约 15,000 个细胞。利用 167 微升的 16% 甲醛溶液固定细胞持续 20 分钟。然后,它们在 PBS 中清洗三次,此后,施加封闭液持续 1 小时。此后,细胞在 PBS 中被清洗另外三次,每次清洗持续 5 分钟。在此之后,CellMask Blue(从 InVitrogen, Carlsbad, CA 获取)以 1:200 稀释被加入到抗体稀释剂中,并且这被施加 1 小时。在这个试验中不包括初次抗体。接着,样本在 PBS 中在搅拌的同时清洗一次,持续 5 分钟。然后,DAPI 以 1:50,000 稀释被施加。随后,样本在 PBS 中并然后在去离子水中清洗 1 次。然后干燥细胞并安装在载玻片上。

[0129] 利用 LF405/LP-B-000 落射荧光滤波器,载玻片在 Olympus BX51 显微镜中以 40X 观察。在视觉上,细胞核区域和细胞质区域是紫色的,并且不容易彼此区分开。然后,利用 Vectra® 多光谱成像系统(可从 PerkinElmer, Waltham, MA 购得),利用工厂定义的 DAPI 荧光滤波带来对载玻片成像。这产生了多光谱图像立方体,该图像立方体利用 Nuance® 软件(也可从 PerkinElmer 购得)分离和分析。用于细胞核区域和细胞质区域的分离光谱在图 1 中示出。

[0130] 然后利用 **inForm**[®] (也可从 PerkinElmer 购得) 分析图像立方体。该样本的视觉外观由图 2 中的图像表示。这个图像是多光谱图像立方体的视觉渲染,利用人眼渲染算法由 **inForm**[®] 产生。如图 2 中所示,细胞核和细胞质区域并非明显可区分。

[0131] 图像立方体然后利用图 1 中所示的光谱来分离,并且利用 **inForm**[®] 复合工具产生荧光复合图像,如图 3 中所示。CellMask Blue 组分信号渲染成红色(图 3 中的暗灰色)并且 DAPI 组分信号渲染成粉色(图 3 中的淡灰色)。在二者都存在的情况下,像素被渲染成白色。

[0132] 利用 **inForm**[®], 利用亮视野渲染类型产生另一图像。在这种情况下, CellMask Blue 组分利用粉色渲染,而整个结果具有 H&E 制备的外观。渲染图像的灰度版本在图 4 中使出。

[0133] 然后,利用 **inForm**[®], 利用基于 DAPI 信号的细胞核片段,将图像分段,以定位细胞核。细胞质片段包括基于 CellMask Blue 的信号认可范围,使得仅组分强度在最小阈值之上的像素被包括在细胞质隔间中。分段的图像在图 5 中示出。

[0134] 示例 2

[0135] 用于 ki67、pERK、pAKT、S6 和 SI 00 的初次抗体被施加到样本,并且与 AlexaFluor 488、AlexaFluor 532、AlexaFluor 555、AlexaFluor 594、AlexaFluor 647 共轭。利用它们的 DAPI、FITC、Cy3、Wide Green 和 Cy5 滤波段,用 **Vectra**[®] 对它们成像。

[0136] 其他实施方式

[0137] 已经描述了多个实施方式。尽管如此,将理解到在不背离本发明的精髓和范围的前提下可以做出各种修改。

[0138] 例如,虽然 DAPI 在示例中被使用以识别样本中的细胞核区域,但是其他染剂,如 Hoechst 33258 也可以用于这个目的。

[0139] 另外,可以使用各种不同的 IF 探针(例如,初次抗体)来标记样本中的蛋白质。例如,两个或多个 IF 探针(例如,三个或多个、四个或多个、五个或多个、六个或多个、七个或多个、八个或多个)IF 探针可以施加到样本。

[0140] 每一个如下美国专利申请的整个公开内容通过引用结合于此:2008 年 10 月 15 日提交的系列号 12/251,632;2009 年 9 月 22 日提交的系列号:12/564,857;以及 2011 年 8 月 5 日提交的系列号:13/204,173。

[0141] 其他实施方式在权利要求中。

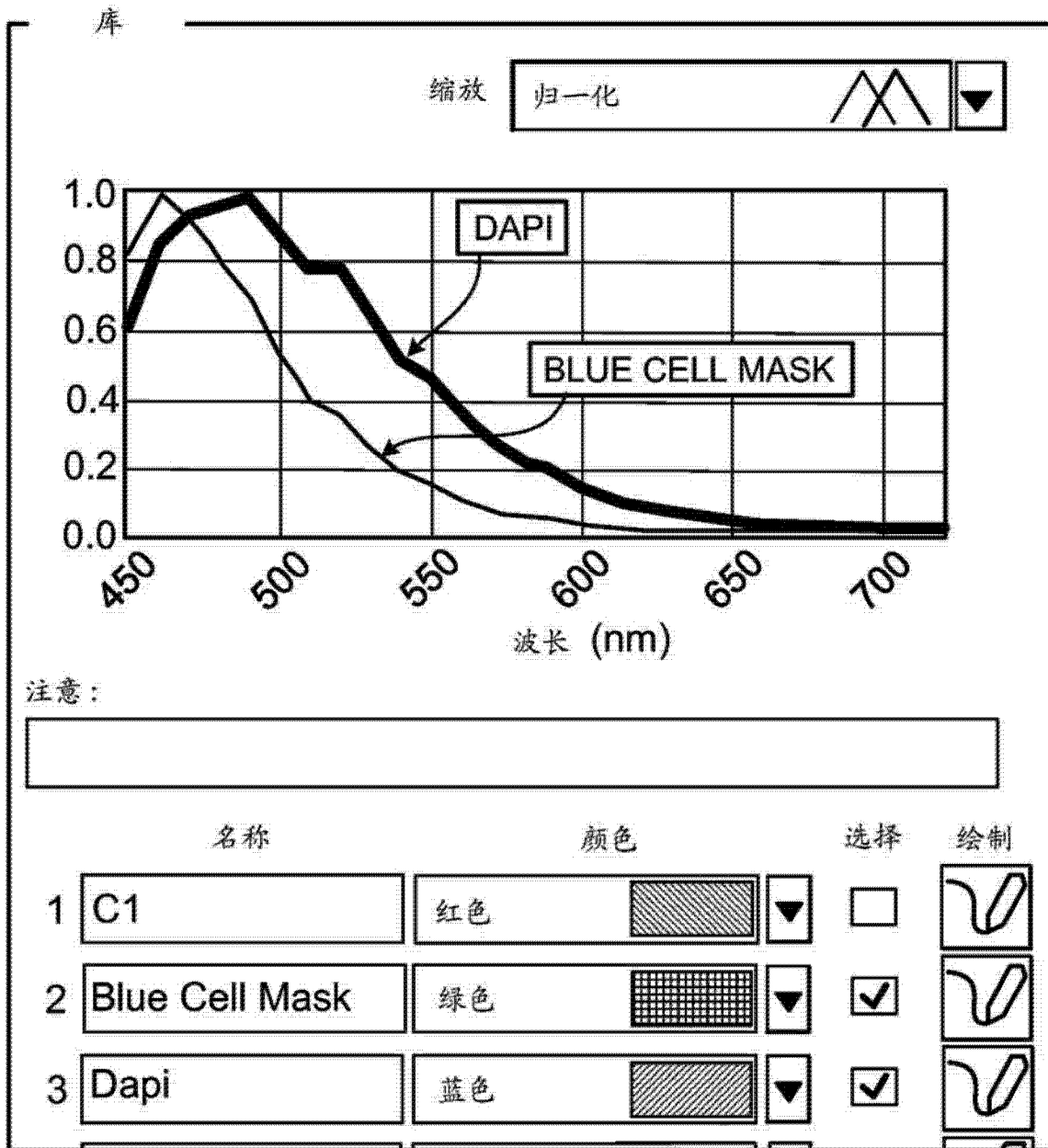


图 1

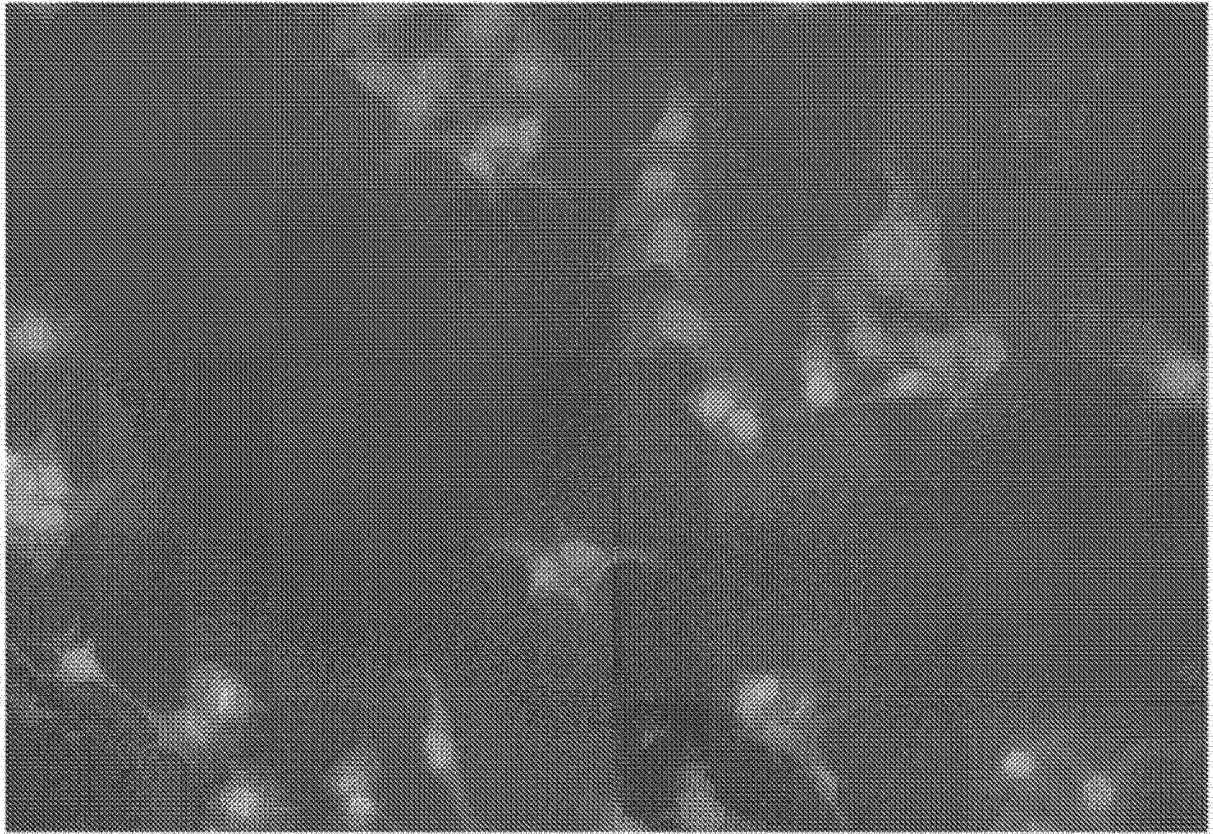


图 2

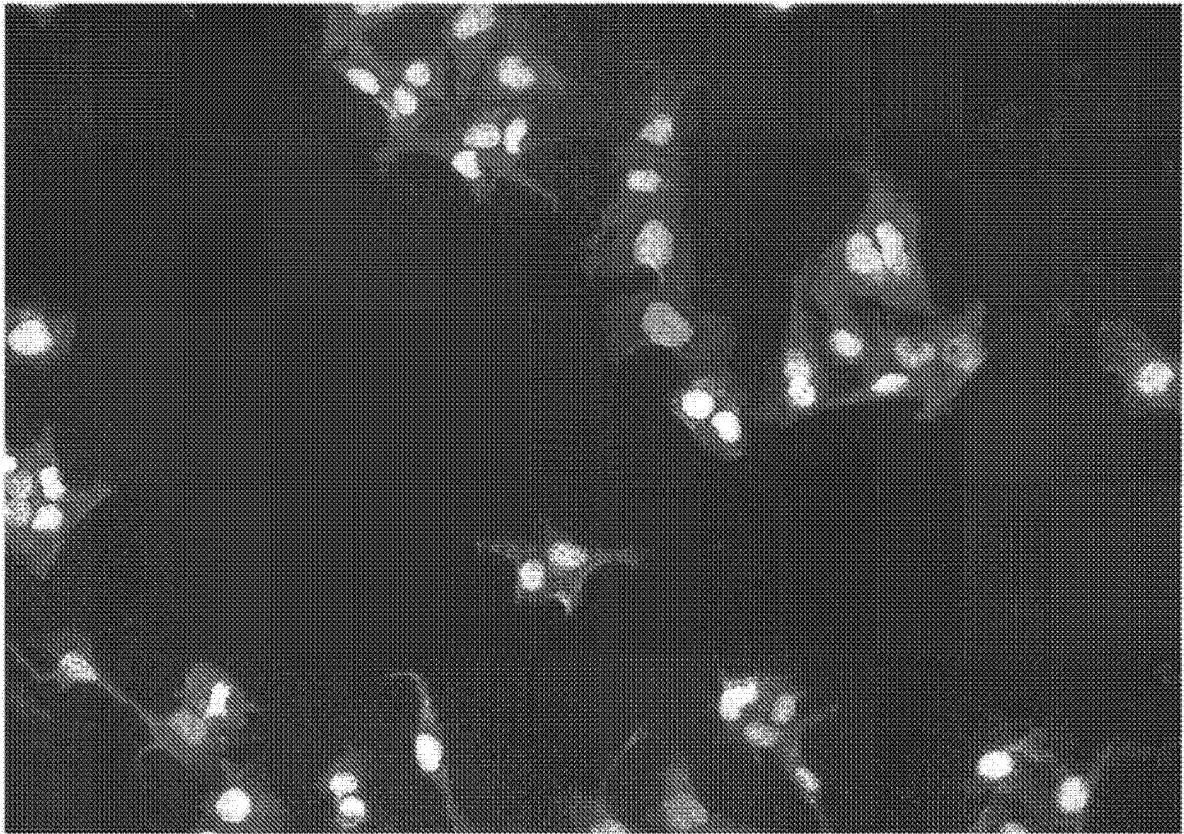


图 3

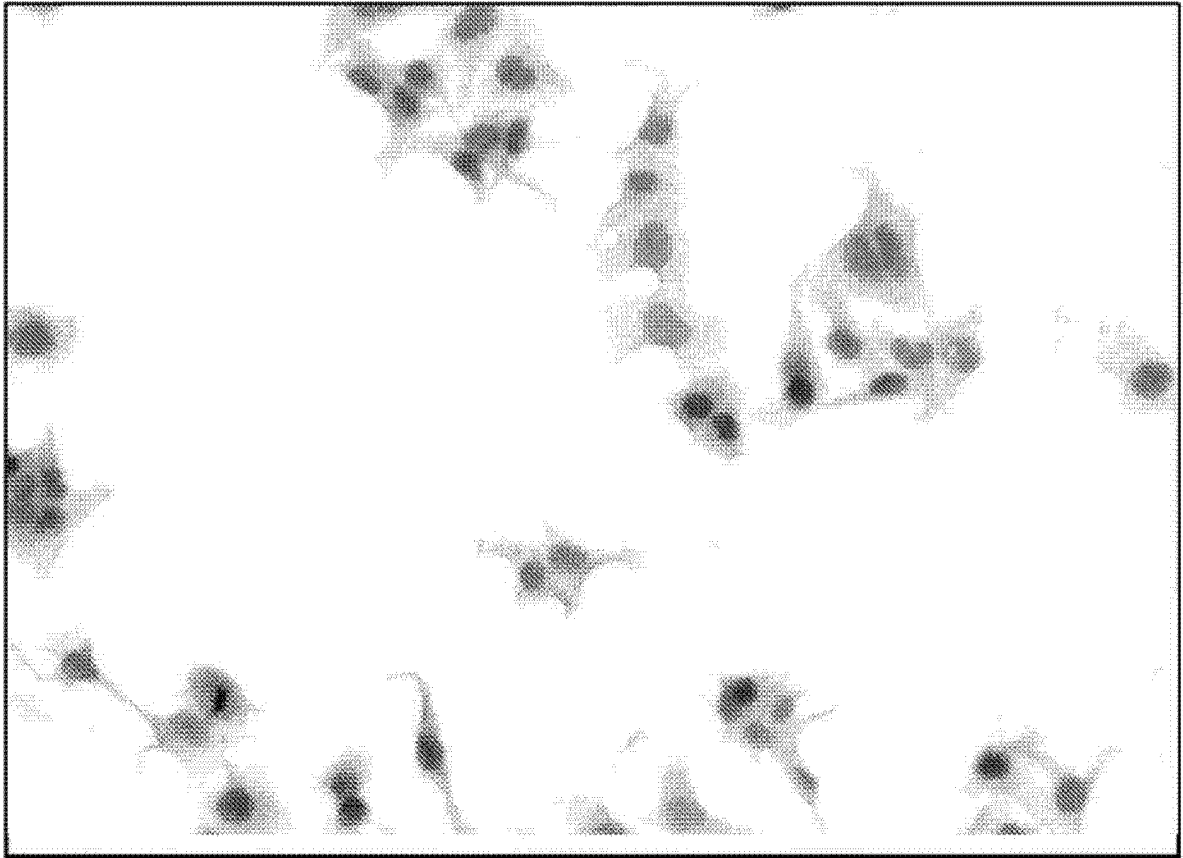


图 4



图 5

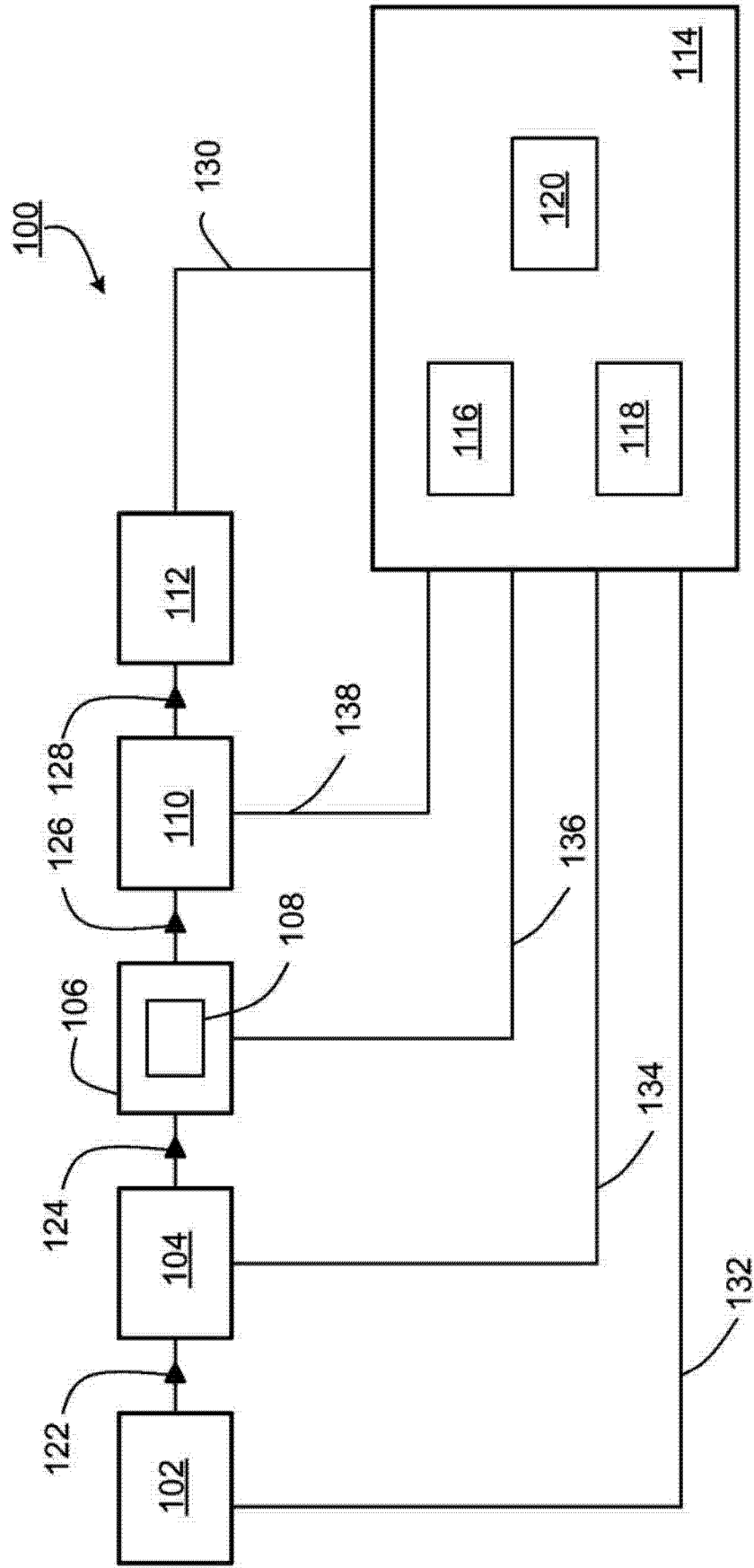


图 6

专利名称(译)	细胞的可视化和测量		
公开(公告)号	CN104704348A	公开(公告)日	2015-06-10
申请号	CN201380053476.5	申请日	2013-08-21
[标]发明人	C C 霍伊特		
发明人	C.C.霍伊特		
IPC分类号	G01N21/64 G01J3/44 G02B21/16 G06T5/50 G01N33/53 G01T7/00 G01N1/30		
CPC分类号	G06K9/00127 G01N1/30 G01N21/6428 G01N21/6456 G01N21/6458 G01N2021/6417 G01N2021/6441 G01N2021/6471 G02B21/365 G06T7/90 G06T2207/10016 G06T2207/10024 G06T2207/10056 G06T2207/10064 G06T2207/10152 G06T2207/30024		
优先权	61/691752 2012-08-21 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明的特征方法和系统(100)包括探测器(112)，所述探测器被构造成获得用第一染剂和第二染剂，优选地是CellMask™ Blue和Hoeschst /DAPI，染色的样本(108)的多个图像，其中，所述第一和第二染剂具有类似的光谱吸收和发射轮廓；以及电子处理器(116)，所述电子处理器被构造成将所述多个图像分解成分离图像组，其中，所述分离图像组包括对应于第一染剂的第一分离图像和对应于第二染剂的第二分离图像，并且基于第一分离图像识别样本(108)内的细胞核区域并基于第二分离图像识别样本(108)内的细胞质区域。

