

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2020 年 8 月 6 日 (06.08.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/155324 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/47 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/078319

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 15 日 (15.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910106779.8 2019 年 2 月 2 日 (02.02.2019) CN

(71) 申请人: 东南大学 (SOUTHEAST UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国江苏省南京市江宁区东南大学路 2 号, Jiangsu 211189 (CN)。

(72) 发明人: 顾忠泽 (GU, Zhongze); 中国江苏省南京市江宁区东南大学路 2 号, Jiangsu 211189 (CN)。
李奇维 (LI, Qiwei); 中国江苏省南京市江宁区东南大学路 2 号, Jiangsu 211189 (CN)。

(74) 代理人: 南京瑞弘专利商标事务所 (普通合伙) (NANJING RUIHONG PATENT & TRADEMARK AGENCY (ORDINARY PARTNERSHIP)); 中国江苏省南京市玄武区龙蟠路 155 号 3 幢 411 室, Jiangsu 210000 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

(54) Title: MULTIMODAL BIOMECHANICAL MICROSCOPE AND MEASUREMENT METHOD

(54) 发明名称: 多模态生物力学显微镜及测量方法

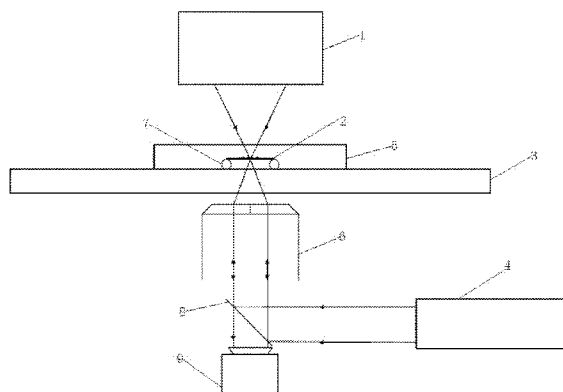


图 1

(57) Abstract: A multimodal biomechanical microscope and a measurement method. The multimodal biomechanical microscope comprises the following components sequentially arranged from top to bottom: a transmission light source (1), a photonic crystal hydrogel film (2), a stage (3), a reflection light source (4) and an imaging assembly. The photonic crystal hydrogel film (2) is suspended above the stage (3), such that transmission light can pass through the photonic crystal hydrogel film (2) and reach the imaging assembly, and reflection light is reflected to the imaging assembly by the photonic crystal hydrogel film (2). After a cell under test has been placed on the photonic crystal hydrogel film (2), the photonic crystal hydrogel film (2) supporting the cell deforms, such that a direction of reflection light reflected thereby changes. The imaging assembly collects the reflected light and the transmitted light to perform imaging, thereby obtaining a shadow image representing cell traction force. The invention enables measurement of cell traction force in real time, thereby realizing multimodal imaging combining conventional image information and mechanical information.



NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格(细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要: 一种多模态生物力学显微镜及测量方法, 包括从上至下依次设置的透射光源(1)、光子晶体水凝胶薄膜(2)、载物台(3)、反射光源(4)、成像组件; 光子晶体水凝胶薄膜(2)置于载物台(3)上并保持悬空状态, 使得透射光可以穿透光子晶体水凝胶薄膜(2)到达成像组件, 反射光经光子晶体水凝胶薄膜(2)反射后到达成像组件; 当待测细胞置于光子晶体水凝胶薄膜(2)上后, 支撑待测细胞的光子晶体水凝胶薄膜(2)发生形变, 使得光子晶体水凝胶薄膜(2)上的反射光方向发生改变, 成像组件收集反射光和透射光并进行成像, 得到表征细胞牵引力的阴影图像。能够对细胞牵引力进行实时测量, 实现传统图像信息与力学信息的多模态成像。

多模态生物力学显微镜及测量方法

技术领域

本发明涉及细胞牵引力显微镜及测量方法，特别是涉及一种多模态生物力学显微镜及测量方法。

背景技术

细胞力在许多基本的生物过程中起着至关重要的作用。各种生命活动，包括心跳和身体运动，都依赖于肌肉收缩，肌肉收缩最终由个体肌肉细胞的内在收缩决定。在肌细胞中，细胞收缩是由肌球蛋白在肌动蛋白丝上连续高速滑动产生的；在非肌肉细胞中，类似的机制被用于产生细胞内张力。当这种细胞内张力通过局部锚定点（FAs）传递到细胞外基质（ECM）时，在肌动蛋白细胞骨架和 ECM 之间建立物理联系，这种力被称为细胞牵引力（CTF）。CTF 在细胞活动的许多方面都很重要。细胞在其底层基质上应用 CTF 以使细胞迁移。细胞还使用 CTF 来感测其下面的基底的机械性质并调节它们的粘附性和形态。此外，CTF 用于控制细胞形状和维持细胞张力稳态。因此，CTF 是许多基本生物学过程所必需的，包括形态发生，转移，血管生成和伤口愈合。此外，CTF 也是机械信号传输和转导所必需的。由于 CTF 通过 FAs 传递给 ECM，FA 由多种蛋白质组成，包括信号蛋白（如整合素）和酶（如激酶和磷酸酶），任何通过 ECM 作用于细胞的生物、生物化学或生物力学刺激都可能导致 FA 蛋白、肌动蛋白细胞骨架和肌动蛋白相互作用的变化，这些变化反过来会影响 CTF 的“输出”。另一方面，CTF 可以使 ECM 网络变形，从而在基质网络中产生应激和应变，进而可以调节细胞功能，如 DNA 合成，ECM 蛋白分泌，甚至细胞分化。因此，CTF 还可以用作表征单个细胞的表型变化的有用的“生物物理标记”。总之，仔细研究 CTF 可以更好地理解许多重要生物过程的细胞和分子机制。

目前已有多种方法来进行 CTF 的测量，如细胞牵引力显微镜、微柱矩阵和荧光共振能量转移等，具有不同的功能和特点。

细胞牵引力显微镜技术是通过记录培养在掺有随机分布的荧光微颗粒的聚丙烯酰胺凝胶弹性基底上的细胞在收缩或迁移过程中引起的基底弹性变形而引起的荧光颗粒位移的显微图像，再使用基于快速递推关系的数字图像相关方法，跟踪这些荧光颗粒图案的变化，以此获得基底弹性变形场，进而反演求解相应的细胞牵引力场。尽管细胞牵引力显微镜是第一个也是最为广泛使用的单细胞牵引力测试方法，然而，由于反问题的病态特点，从基底位移场获得准确的细胞牵引力场通常极为困难且计算量巨大，很大程度上是由于荧光微珠初始状态的随机性所导致的。以往的方法主要采用复杂繁琐的正则化处理来提高力反演的可靠性和精度。正则化处理的关键在于合适正则化参数的选取，这需要运用尽可能多的先验知识并结合特定的算法来实现，一般来讲，正则化参数的选取或

多或少都带有一定的主观色彩，选取正则化参数最优值的过程相对困难。正则化处理的这一劣势使得以往计算方法的牵引力反演效率极低，不利于细胞实验中大量数据统计分析，同时反演精度也较低，即使通过最优的正则化参数值反演得到的结果有时也与真实情况差距较大。此外，如果微珠刚好位于牵引力平衡的位置，如两个个向 ECM 施加同样大小的力的细胞的中点，由于微珠没有位移，将得到该点没有牵引力的错误结果。还由于通常使用的显微成像系统在 Z 方向的分辨率远低于 XY 方向，使得最终的应力场缺乏 Z 方向的分辨率。

微柱阵列传感器是一种更简单的选择。微柱阵列通常是由柔性聚合物材料制成，其具有精心设计的微米级的柱高和柱间距。每根柱子就像一根迷你弹簧，通过测量其偏转，便可以识别并测量细胞在上面施加的力。微柱阵列数据比 TFM 实验的结果更容易解释，并且它们需要较少的计算分析。而且设备本身制造起来相当简单，且与荧光显微镜兼容。然而，这些阵列给细胞和基底之间强加了一种特定且非自然的模式，这很可能使得细胞的行为和在生物体内有较大的差异。

荧光共振能量转移技术在近年也被应用到了细胞牵引力的测量中。通过将荧光分子连接到一种具有优良弹性的蛛丝蛋白分子上，通过观察这两个荧光基团间的共振能量转移现象并结合蛛丝蛋白的力学信息，在光学分辨率足够高的情况下，理论上可以实现亚微米级别的力学测量。根据需要，也可以选择别的蛋白分子来获得不同的灵敏度。但是这种传感器的设计和验证需要耗费大量的精力，并且传感器可能因为力检测以外的原因而“变暗”，如降解等。FRET 信号也很难解释，需要仔细测量以消除误报。将荧光分子插入到功能强烈依赖于结构的蛋白质中还可能会对其功能产生影响，而通常来说，这种影响究竟有多大是很难预测的。

发明内容

发明目的：本发明的目的是提供一种多模态生物力学显微镜及测量方法，能够对细胞牵引力进行实时测量，解决细胞牵引力的快速与高通量测量的问题，能够实现传统图像信息与力学信息的多模态成像。

技术方案：本发明所述的多模态生物力学显微镜，包括从上至下依次设置的透射光源、光子晶体水凝胶薄膜、载物台、反射光源、成像组件；所述透射光源用于待测细胞形态成像；所述光子晶体水凝胶薄膜用作待测细胞培养的基底和测量细胞牵引力的传感器；所述反射光源用于测量待测细胞力学信息，并且反射光源的光谱包含光子晶体水凝胶薄膜的反射峰带宽范围；

所述光子晶体水凝胶薄膜置于载物台上并保持悬空状态，使得透射光可以穿透薄膜到达成像组件，使得反射光经所述薄膜反射后到达成像组件；当待测细胞置于光子晶体水凝胶薄膜上后，支撑所述待测细胞的光子晶体水凝胶薄膜发生形变，使得光子晶体水

凝胶薄膜上的反射光方向发生改变，所述成像组件收集反射光和透射光并进行成像，得到表征细胞牵引力的阴影图像。

优化地，所述光子晶体水凝胶薄膜在 450-800nm 波段内的最强反射波段反射率大于 35%，非禁带范围透光率大于 80%。以获得较高的信噪比。

为了更好地对待测细胞进行细胞牵引力的测量，使待测细胞能够产生足够的形变，所述光子晶体水凝胶薄膜的厚度为 5-200 微米。

所述光子晶体水凝胶材料杨氏模量为 1-100kPa。

所述光子晶体水凝胶材料的最强反射波长为 450-800 纳米。

所述显微镜还包括物镜，所述物镜的数值孔径为 0.1-0.9，放大倍率为 2-60 倍。

本发明还提供了一种多模态生物力学测量方法，包括以下步骤：

(1) 将本发明中的多模态生物力学显微镜中的光子晶体水凝胶薄膜进行前处理，后将待测细胞置于光子晶体水凝胶薄膜上进行培养；

(2) 将步骤(1)得到的样品置于显微镜的载物台上，光子晶体水凝胶薄膜在待测细胞作用下发生形变而使入射的反射光方向变化，进而获得表征细胞牵引力的阴影图像；

(3) 根据阴影图像通过算法得到待测细胞的牵引力分布。

发明原理：本发明提供的多模态生物力学显微镜，可进行力学模态、形态模态，如相差、DIC、明场等的信息获取。将待测细胞置于本发明中多模态生物力学显微镜的光子晶体材料上进行培养后，作为待测细胞生长基底的光子晶体薄膜受到细胞施加的细胞牵引力而弯曲，改变了光子晶体薄膜表面的法向量方向，使得反射光源投射在光子晶体材料上的光的被散射部分的方向发生偏转，使得在显微镜相机中获得的图像在这些区域变暗，且符合偏转越多图像越暗的规律，即图像特定像素的明暗是光子晶体相应点法向量和主光轴夹角的函数。从而可直观的从图像的明暗来判断局部细胞牵引力的大小。进一步，通过计算机视觉中从阴影还原形态的算法可以得到光子晶体薄膜的形态变化，从而更准确的得到细胞牵引力的分布。本发明中细胞牵引力的测量根据光子晶体材料反射物镜光源形成的阴影图像，实时获取表征细胞牵引力引起的光子晶体材料形变，准确度高。

本发明提供的多模态生物力学显微镜及测量方法不仅可以针对细胞牵引力进行测量，还可以基于上述原理对细胞的其他生物力学进行测量。

现有细胞牵引力显微镜常用使用模式有两种，目的都是为了解决测量点状态和原始无应力状态间微珠的对应关系。第一种模式：在细胞贴壁前便开始对感兴趣的区域反复成像，直到实验结束，以确定反应局部应力变化的微珠的移动轨迹。如果移开后再回到该视野，可能出现无法推断当前视野微珠和原始状态微珠的对应关系而无法得到应力分布；第二种模式：对感兴趣的样本进行荧光成像确定当前时刻微珠位置后，加入胰酶使得细胞和基底之间分离。在这个过程中持续成像，获得基底从应力分布不均匀状态到无

应力状态过程中微珠的移动轨迹从而得到两个状态间微珠的对应关系。显然，在第一种模式中，难以使用同一光学系统对大量的样本进行成像；在第二种模式中，由于胰酶消化会损坏样本，导致无法对同一感兴趣的样本进行前后多次测量。而本发明提供的多模态生物力学显微镜进行测试，没有这样的限制，因为作为传感单元的光子晶体水凝胶薄膜的初始状态是已知的，不需要进行对应关系的构建。

细胞牵引力显微镜面对高速变化的样本，如跳动的心肌，由于荧光微珠的荧光较弱，为了获得足够高的时间分辨率需要使用高能量的激发光和高灵敏的显微镜相机，对样本可能造成损伤的同时也对实验的硬件有较高的要求。而本发明提供的多模态生物力学显微镜中的力学信息是蕴含在反射光中，其亮度通常远高于荧光，因此不需要额外增加光源的光强和使用高灵敏显微镜相机，更好地维持了样本的原始状态，同时大幅降低了对显微镜相机的要求。

有益效果：（1）本发明提出了使用光子晶体薄膜对细胞的生物力学进行空间定量测量的方法，对光子晶体薄膜成像获得阴影或颜色信息，根据模型和算法获得曲面局部法向量信息进而重建出整个曲面；能够对细胞牵引力进行实时测量，实现传统图像信息与力学信息的多模态成像。（2）与目前最常用的细胞牵引力显微镜技术相比，和随机分布的荧光微珠不同，光子晶体的光学特点使得测量过程中初始状态稳定已知，大大简化了算法的复杂度、噪声的敏感度与实验的复杂度；相较于微柱阵列技术，光子晶体基底的均匀性对细胞本身的生理活动的干扰远小于离散的微柱阵列，能实现更准确的生理环境的还原以得到更准确的结果。（3）本发明中作为传感单元的光子晶体水凝胶薄膜的初始状态是已知的，不需要进行对应关系的构建。（4）本发明提供的显微镜在测量生物力学的过程中，力学信息蕴含在反射光中，其亮度通常远高于荧光，因此不需要额外增加光源的光强和使用高灵敏显微镜相机，更好地维持了样本的原始状态，同时大幅降低了对显微镜中相机的要求。

附图说明

图 1 是多模态生物力学显微镜的结构示意图；

图 2 是不受细胞牵引力作用下的光子晶体水凝胶薄膜的反射光作用示意图；

图 3 是受细胞牵引力作用下的光子晶体水凝胶薄膜的反射光作用示意图；

图 4-1 是胰酶加入 30s 时的力学模态成像图片；

图 4-2 是胰酶加入 30s 时的力学模态和相差模态共成像图片；

图 4-3 是胰酶加入 30s 时的力学模态信息重建出的薄膜表面形貌图；

图 5-1 是胰酶加入 60s 时的力学模态成像图片；

图 5-2 是胰酶加入 60s 时的力学模态和相差模态共成像图片；

图 5-3 是胰酶加入 60s 时的力学模态信息重建出的薄膜表面形貌图；

图 6-1 是胰酶加入 90s 时的力学模态成像图片；

图 6-2 是胰酶加入 90s 时的力学模态和相差模态共成像图片；

图 6-3 是胰酶加入 90s 时的力学模态信息重建出的薄膜表面形貌图。

具体实施方式

下面结合附图对本发明作更进一步的说明。

实施例 1：

如图 1 所示，本发明的多模态生物力学显微镜包括从上至下依次设置的透射光源 1、光子晶体水凝胶薄膜 2、载物台 3、反射光源 4、成像组件，成像组件包括物镜 6、分束镜 8、CCD 相机 9。透射光源 1 用于待测细胞形态成像；光子晶体水凝胶薄膜 2 用作待测细胞培养的基底和测量细胞牵引力的传感器；反射光源 4 用于测量待测细胞力学信息，并且反射光源 4 的光谱包括光子晶体水凝胶薄膜 2 的最强反射波段。其中光子晶体水凝胶薄膜 2 置于载物台 3 上并保持悬空状态，使得透射光可以穿透薄膜到达成像组件，使得反射光经所述薄膜反射后到达成像组件。

当待测细胞置于光子晶体水凝胶薄膜 2 上后，支撑待测细胞的光子晶体水凝胶薄膜 2 发生形变，使得光子晶体水凝胶薄膜 2 上的反射光方向发生改变，所述成像组件收集反射光和透射光并进行成像，得到表征细胞牵引力的阴影图像。

如图 2 所示为不受细胞牵引力作用下的光子晶体水凝胶薄膜 2 的反射光作用示意图，可以看到，从反射光源发出的光和光子晶体水凝胶薄膜 2 作用后，主要分为透射和反射两部分，光子晶体水凝胶薄膜 2 在不受细胞牵引力的情况下，在支架上呈水平状态，表面每个点的法线方向基本和物镜主光轴方向平行，因而此时显微镜的视野内光子晶体薄膜每个点的反射光光强几乎一样，没有阴影。

将直径为 1 厘米，厚度为 20 微米的圆形聚丙烯酰胺光子晶体水凝胶薄膜 2 固定在支架 7 上，使得薄膜处于悬空状态，并将聚丙烯酰胺光子晶体水凝胶薄膜 2 连同支架 7 一起放在容器中。其中聚丙烯酰胺光子晶体水凝胶薄膜 2 的杨氏模量为 20kPa，适合来自心脏的原代成纤维细胞生长；光子晶体薄膜的中心反射波长位于 600nm，便于使用较长波长的光源进行光照，减小对细胞的光毒性；反射峰半峰宽为 20nm，最强反射波段反射率 40%，非禁带范围透光率大于 85%，以获得较高的信噪比。使用 Sulfo-SANPAH 活化光子晶体水凝胶表面的氨基后，使用 HEPES 缓冲液清洗三次，随后浸泡在 HEPES 缓冲的 0.01mg/mL 的一型胶原蛋白溶液中，4 摄氏度过夜。将前述光子晶体水凝胶薄膜浸泡在 DMEM 培养基中过夜后移到细胞培养皿中，再快速加入 5%胎牛血清的 DMEM 培养基浸没光子晶体水凝胶。加入新生 SD 大鼠心脏原代成纤维细胞在 5%胎牛血清的 DMEM 培养基中的分散液，置于二氧化碳培养箱中进行培养。8 小时后，将样品取出进行多模态成像。

将经过培养样品连同培养皿一起置于载物台 3 中央，载物台 3 中央有一圆孔，且

由于培养皿是透明的，因此透射光、反射光均可直接照射至光子晶体水凝胶薄膜上。如图 3 所示为受细胞牵引力作用下的光子晶体水凝胶薄膜 2 的反射光作用示意图，光子晶体水凝胶薄膜 2 在待测细胞作用下发生形变而使入射的反射光方向变化，进而成像组件获得表征细胞牵引力的阴影图像。成纤维细胞在光子晶体薄膜上生长会对光子晶体薄膜施加牵引力，使得光子晶体膜弯曲形成褶皱或突起。光子晶体对光线的反射除了具有波长选择性，还有镜面的特性，即入射光与反射光与该点的法线呈对称分布。因此，细胞施加给光子晶体水凝胶薄膜 2 的牵引力越大，薄膜与初始平行位置形成的倾角越大，便会有更多的光线反射到物镜以外的方向，在相机拍摄的图案中也就越暗。

将上述细胞培养皿取出置于载物台 3 上后，并使光子晶体水凝胶薄膜 2 垂直于主光轴放置在载物台 3 上。这样可以使透射光和反射光很好地在光子晶体水凝胶薄膜上进行透射、反射，使得到的图像质量更优。将分束镜配置为可见光半透半反。开卤钨灯荧光激发光源作为反射光源，打开荧光光闸。打开相差光源作为透射光源，调整相差光源和荧光激发光源的亮度。使用 10x 物镜，数值孔径为 0.45，对 Z 轴进行调节，聚焦到聚丙烯酰胺光子晶体水凝胶薄膜上。关闭透射光源，使用显微镜的相机以 800*600 分辨率对需要研究的区域进行拍照，得到力学模态信息。关闭荧光光闸，即关闭反射光源。打开透射光源，使用显微镜的相机以 800*600 分辨率对需要研究的区域进行拍照，得到普通相差模态信息。

使用中值滤波对力学模态照片进行预处理，中值滤波模板大小为 10*10。由于光线明暗变化的规律与 Lambert 模型类似，因此可使用 Emmanuel Prados 在 DOI: 10.1007/s10851-006-6899-x 论文中提到的图像处理方法，对图像进行处理，得到光子晶体薄膜表面的三维形貌信息，反映了细胞对基底作用的力的大小。这样，结合前面拍得的相差图像，便得到了该区域的细胞形态和力学的多模态信息，进而得到待测细胞的牵引力分布。

将新生小鼠心肌原代成纤维细胞在聚丙烯酰胺光子晶体水凝胶薄膜上培养后使用胰酶消化，如图 4-1、4-2、4-3 分别是胰酶加入 30s 时的力学模态成像图片、力学模态和相差模态共成像图片以及根据力学模态信息重建出的薄膜表面形貌图；如图 5-1、5-2、5-3 分别是胰酶加入 60s 时的力学模态成像图片、力学模态和相差模态共成像图片以及根据力学模态信息重建出的薄膜表面形貌图；如图 6-1、6-2、6-3 分别是胰酶加入 90s 时的力学模态成像图片、力学模态和相差模态共成像图片以及根据力学模态信息重建出的薄膜表面形貌图。

实施例 2:

本实施例中显微镜的结构与实施例 1 相同，其中光子晶体水凝胶薄膜选用杨氏模量为 30kPa，中心反射波长位于 600nm，反射峰半峰宽为 20nm，最强反射波段反射率 40%，

非禁带范围透光率大于 85%，厚度为 20 微米，直径为 1 厘米的聚丙烯酰胺光子晶体水凝胶薄膜固定在支架上，并将聚丙烯酰胺光子晶体水凝胶薄膜连同支架一起放在容器中。

使用 Sulfo-SANPAH 活化光子晶体水凝胶表面的氨基后使用 HEPES 缓冲液清洗三次后浸泡在 HEPES 缓冲的 0.01mg/mL 的购置于东南大学苏州医疗器械研究院的心肌外基质提取物蛋白溶液中，4 摄氏度过夜。将前述光子晶体水凝胶薄膜浸泡在 α -MEM 培养基中过夜后移到细胞培养皿中，再快速加入 10%胎牛血清的 α -MEM 培养基浸没光子晶体水凝胶。加入新生 SD 大鼠心脏原代心肌细胞在 10%胎牛血清的 α -MEM 培养基中的分散液，置于二氧化碳培养箱中进行培养。48 小时后，将样品取出进行多模态成像。

将培养后的细胞培养皿取出后置于显微镜的载物台 3 上，分束镜配置为可见光半透半反。打开倒置显微镜卤钨灯荧光激发光源作为反射光源，打开荧光光闸。打开相差光源作为透射光源，调整相差光源和荧光激发光源的亮度。使用 20x 的物镜，数值孔径为 0.45，对 Z 轴进行调节，聚焦到光子晶体薄膜上。关闭透射光源，使用显微镜的相机以 800*600 分辨率对需要研究的区域以 30 帧的帧率进行录像，得到力学模态信息。关闭荧光光闸，即关闭反射光源。打开透射光源，使用显微镜的相机以 800*600 分辨率对需要研究的区域以 30 帧的帧率进行录像，得到普通相差模态信息。

将得到的力学模态录像逐帧提取得到力学模态图像。使用中值滤波对力学模态照片进行预处理，中值滤波模板大小为 10*10。使用 Emmanuel Prados 在 DOI: 10.1007/s10851-006-6899-x 论文中提到的处理方法，对图像进行处理，得到光子晶体薄膜表面的三维形貌信息，反映了细胞对基底作用的力的大小。由于反射光的强度由光子晶体水凝胶薄膜的反射率和反射光源的光强决定，又由于我们所使用的光子晶体水凝胶在最强反射峰位置的反射率高达 60%，因此可以使用传统的 CMOS 或 CCD 相机连续的力学模态信息。

权 利 要 求 书

1、一种多模态生物力学显微镜,其特征在于:包括从上至下依次设置的透射光源(1)、光子晶体水凝胶薄膜(2)、载物台(3)、反射光源(4)、成像组件;所述透射光源(1)用于待测细胞形态成像;所述光子晶体水凝胶薄膜(2)用作待测细胞培养的基底和测量细胞牵引力的传感器;所述反射光源(4)用于测量待测细胞力学信息,并且反射光源(4)的光谱包含光子晶体水凝胶薄膜(2)的反射峰带宽范围;

所述光子晶体水凝胶薄膜(2)置于载物台(3)上并保持悬空状态,使得透射光可以穿透薄膜到达成像组件,反射光经所述薄膜反射后到达成像组件;当待测细胞置于光子晶体水凝胶薄膜(2)上后,支撑所述待测细胞的光子晶体水凝胶薄膜(2)发生形变,使得光子晶体水凝胶薄膜(2)上的反射光方向发生改变,所述成像组件收集反射光和透射光并进行成像,得到表征细胞牵引力的阴影图像。

2、根据权利要求1所述的多模态生物力学显微镜,其特征在于:所述光子晶体水凝胶薄膜(2)在450-800nm波段内的最强反射波段反射率大于35%,非禁带范围透光率大于80%。

3、根据权利要求1所述的多模态生物力学显微镜,其特征在于:所述光子晶体水凝胶薄膜(2)的厚度为5-200微米。

4、根据权利要求1所述的多模态生物力学显微镜,其特征在于:所述光子晶体水凝胶薄膜(2)的杨氏模量为1-100kPa。

5、根据权利要求1所述的多模态生物力学显微镜,其特征在于:所述光子晶体水凝胶薄膜(2)的最强反射波长为450-800纳米。

6、根据权利要求1所述的多模态生物力学显微镜,其特征在于:所述显微镜还包括物镜(6),所述物镜(6)的数值孔径为0.1-0.9,放大倍率为2-60倍。

7、一种基于权利要求1所述的显微镜的多模态生物力学测量方法,其特征在于:包括以下步骤:

(1)将光子晶体水凝胶薄膜(2)进行前处理,后将待测细胞置于光子晶体水凝胶薄膜(2)上进行培养;

(2)将步骤(1)得到的样品置于载物台(3)上,光子晶体水凝胶薄膜(2)在待测细胞作用下发生形变而使入射的反射光方向变化,进而获得表征细胞牵引力的阴影图像;

(3)根据阴影图像通过算法得到待测细胞的牵引力分布。

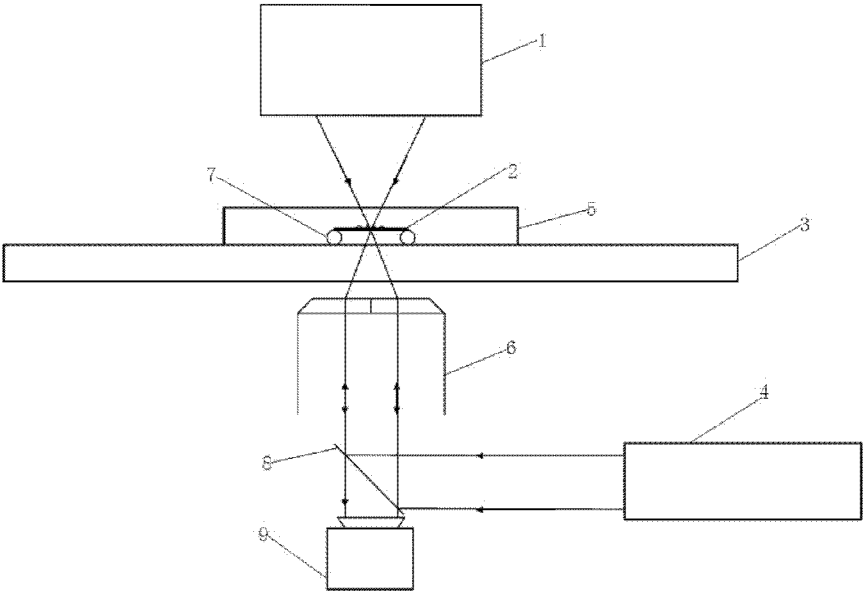


图 1

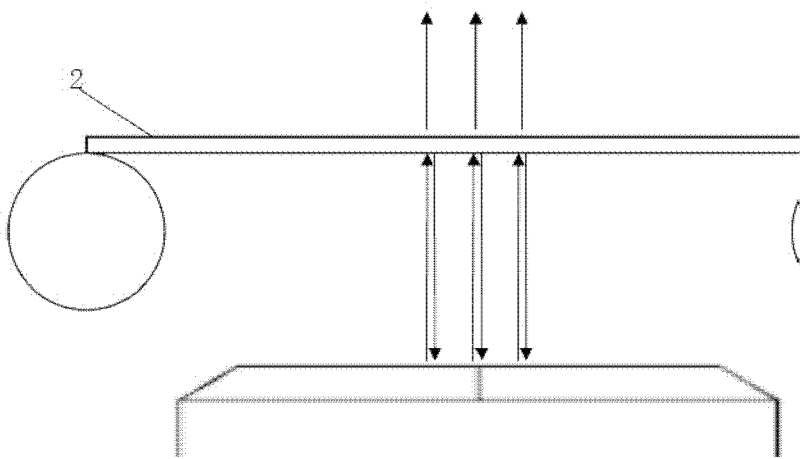


图 2

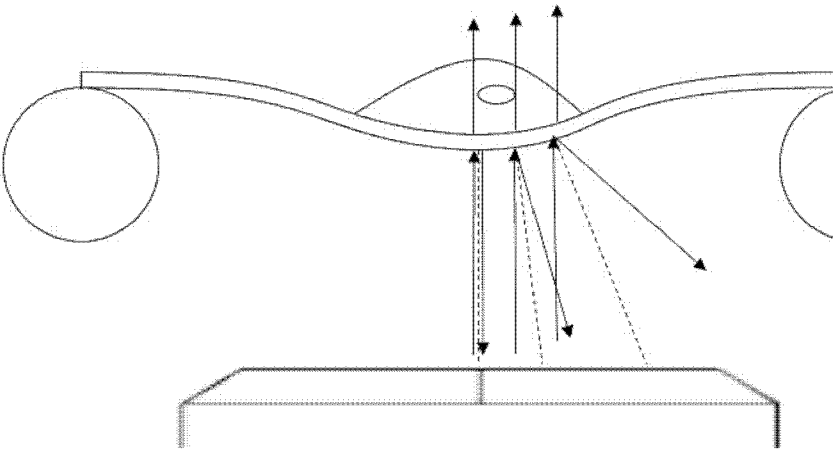


图 3

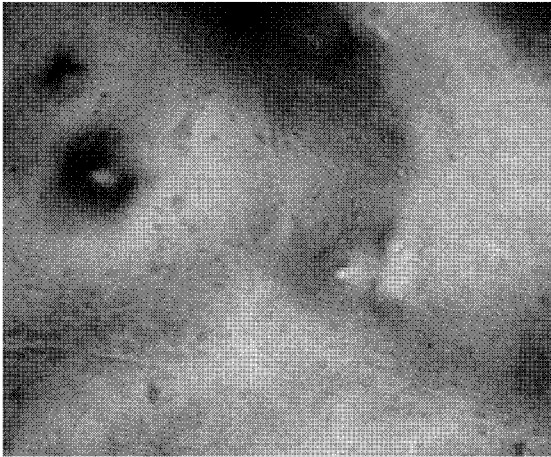


图 4-1

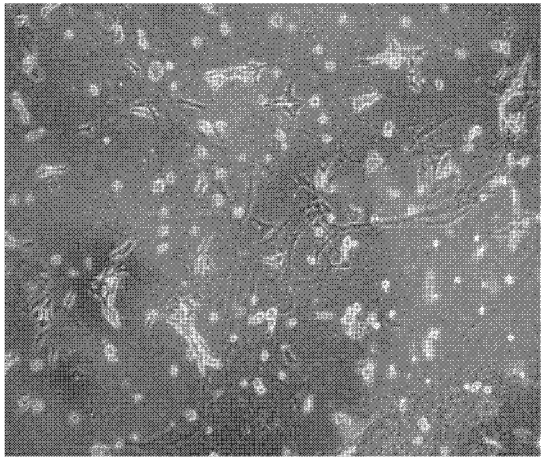


图 4-2

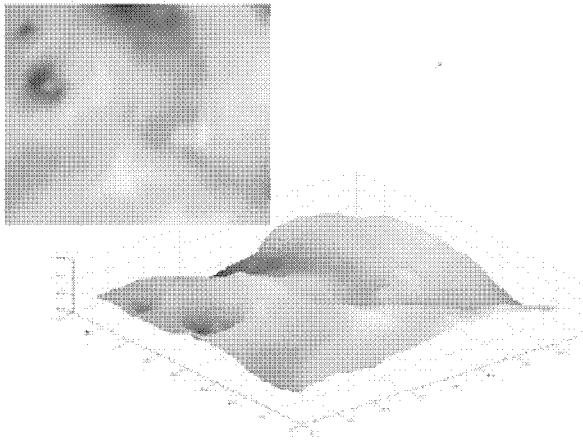


图 4-3



图 5-1

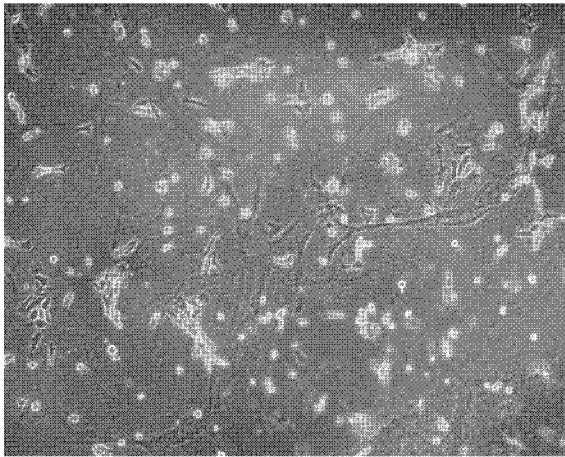


图 5-2

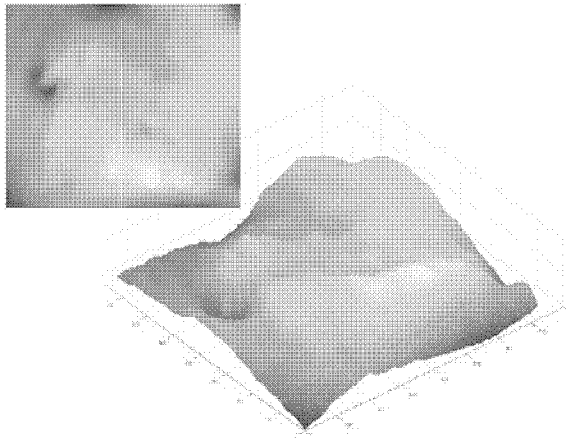


图 5-3

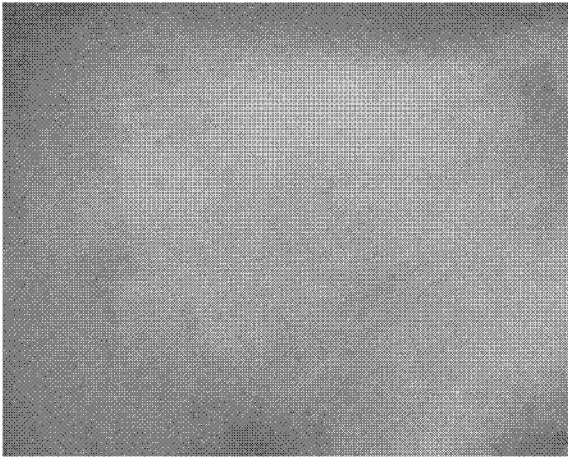


图 6-1

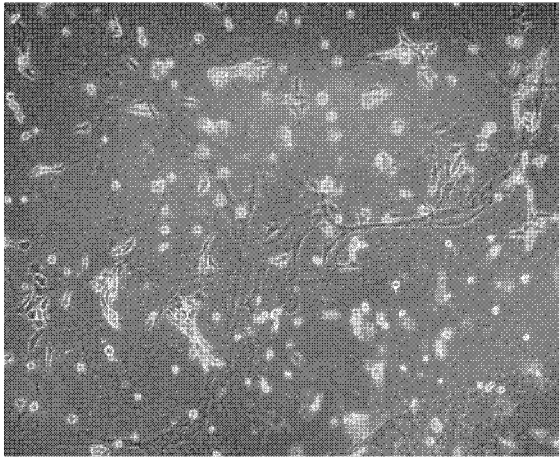


图 6-2

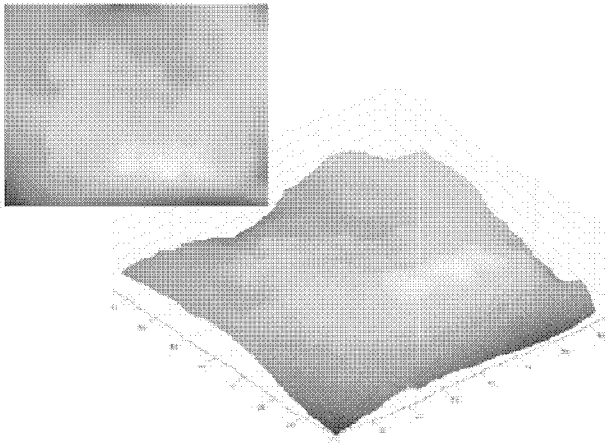


图 6-3

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/078319

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/47(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 21/-; G01N 13/-; G01N 33/-; G06T 7/-

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNKI, CNPAT, WPI, EPODOC: 东南大学, 顾忠泽, 李奇维, 生物力, 细胞力, 细胞 2w 牵引力, 透射, 反射, 形态, 形貌, 凝胶, 聚丙烯酰胺, 形变, 变形, 阴影, 成像, 图像, gu z, li q, cell+, traction w force, tractive w force, transmit+, transmission, reflect+, morpholog+, gel, polyacrylamide, transform+, deform+, shadow, shade, imag+, photo?, picture

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 105738254 A (SOOCHOW UNIVERSITY) 06 July 2016 (2016-07-06) description, paragraphs [0017]-[0052], and figures 1 and 2	1-7
A	CN 103255053 A (INSTITUTE OF MECHANICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES) 21 August 2013 (2013-08-21) entire document	1-7
A	CN 107270828 A (ZHEJIANG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) 20 October 2017 (2017-10-20) entire document	1-7
A	CN 101813693 A (PEKING UNIVERSITY) 25 August 2010 (2010-08-25) entire document	1-7
A	WO 2012142366 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE et al.) 18 October 2012 (2012-10-18) entire document	1-7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 October 2019

Date of mailing of the international search report

29 October 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration
No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing
100088
China

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2019/078319

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	刘永嫻 等(LIU, Yongman et al.). "基于单层荧光颗粒的三维细胞牵引力的研究 (Study on Three Dimensional Cell Traction Force Based on Monolayer Fluorescent Beads)" 实验力学 (<i>Journal of Experimental Mechanics</i>), Vol. 33, No. (6), 31 December 2018 (2018-12-31), pages 831-840	1-7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2019/078319

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	105738254	A	06 July 2016	CN	105738254	B	12 July 2019
CN	103255053	A	21 August 2013	CN	103255053	B	20 May 2015
CN	107270828	A	20 October 2017	CN	107270828	B	11 June 2019
CN	101813693	A	25 August 2010	None			
WO	2012142366	A1	18 October 2012	US	2014212909	A1	31 July 2014
				US	9714932	B2	25 July 2017

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2019/078319

A. 主题的分类

G01N 21/47(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N 21/-; G01N 13/-; G01N 33/-; G06T 7/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

CNKI, CNPAT, WPI, EPDOC: 东南大学, 顾忠泽, 李奇维, 生物力, 细胞力, 细胞 2w 牵引力, 透射, 反射, 形态, 形貌, 凝胶, 聚丙烯酰胺, 形变, 变形, 阴影, 成像, 图像, gu z, li q, cell+, traction w force, tractive w force, transmit+, transmission, reflect+, morpholog+, gel, polyacrylamide, transform+, deform+, shadow, shade, imag+, photo?, picture

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 105738254 A (苏州大学) 2016年 7月 6日 (2016 - 07 - 06) 说明书第[0017]-[0052]段、附图1, 2	1-7
A	CN 103255053 A (中国科学院力学研究所) 2013年 8月 21日 (2013 - 08 - 21) 全文	1-7
A	CN 107270828 A (浙江科技学院) 2017年 10月 20日 (2017 - 10 - 20) 全文	1-7
A	CN 101813693 A (北京大学) 2010年 8月 25日 (2010 - 08 - 25) 全文	1-7
A	W0 2012142366 A1 (PRESIDENT AND FELLOWS OF HARVARD COLLEGE 等) 2012年 10月 18日 (2012 - 10 - 18) 全文	1-7
A	刘永嫚 等. “基于单层荧光颗粒的三维细胞牵引力的研究” 《实验力学》, 第33卷, 第6期, 2018年 12月 31日 (2018 - 12 - 31), 第831-840页	1-7

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2019年 10月 10日

国际检索报告邮寄日期

2019年 10月 29日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中国国家知识产权局(ISA/CN)

中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

受权官员

孙雪婷

电话号码 86-(10)-53962648

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2019/078319

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN	105738254	A	2016年 7月 6日	CN 105738254 B	2019年 7月 12日
CN	103255053	A	2013年 8月 21日	CN 103255053 B	2015年 5月 20日
CN	107270828	A	2017年 10月 20日	CN 107270828 B	2019年 6月 11日
CN	101813693	A	2010年 8月 25日	无	
WO	2012142366	A1	2012年 10月 18日	US 2014212909 A1	2014年 7月 31日
				US 9714932 B2	2017年 7月 25日