

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl⁷



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 02810742. X

G06K 9/00

H01J 37/20

G01N 21/64

G01N 23/00

G03B 21/26

G06M 11/02

[45] 授权公告日 2005 年 10 月 26 日

[11] 授权公告号 CN 1224936C

[22] 申请日 2002.3.27 [21] 申请号 02810742. X

[30] 优先权

[32] 2001. 3.28 [33] US [31] 60/279,244

[32] 2001. 8.10 [33] US [31] 09/927,151

[86] 国际申请 PCT/US2002/009344 2002.3.27

[87] 国际公布 WO2002/080090 英 2002.10.10

[85] 进入国家阶段日期 2003.11.27

[71] 专利权人 维森盖茨有限公司

地址 美国华盛顿州

[72] 发明人 A·C·尼尔森

审查员 王京霞

[74] 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

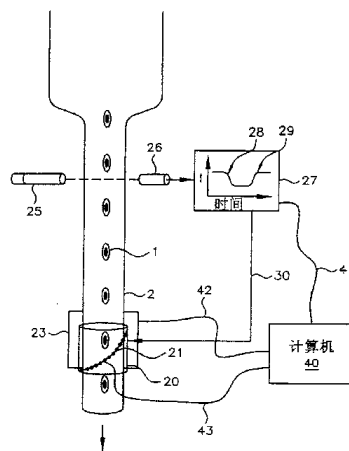
代理人 程伟 王初

权利要求书 9 页 说明书 16 页 附图 8 页

[54] 发明名称 用光学断层成像技术对流体中微小物体成像的仪器和方法

[57] 摘要

一种流式细胞仪和至少一个重建柱环绕毛细管(2)设置。光子源(25)、光子感应器(26)和脉冲高度分析仪(27)一起工作,提供一个物体或细胞(1)开始的第一个触发点(28)和细胞(1)结束的第二个触发点(29)。重建柱(20)接收触发信号(28, 29)。重建柱(20)包含可选发射光波长的点光源(21),点光源以几何图形沿着与毛细管轴(9)垂直并且同心的柱分布,使获取流动细胞(1)传输的、衰减的投射图像更为容易。感应器(23)还收集与细胞核和/或细胞浆结构或细胞膜相关的标记分子探针发射的荧光投射。这些投射通过算法处理,提供有关细胞(1)及其疾病状态的三维信息。



1. 一种用于显微镜下物体成像和分析的流式光学断层成像方法，该方法包括以下几个步骤：

- 5 (a) 将至少一个物体注射至一只注射管(3)内；
 (b) 控制至少一个物体使之流过毛细管(2)，由此该至少一个物体沿着液流的轴向延伸并紧邻毛细管(2) 的中心轴(9)移动；
 (c) 以排列在毛细管(2)周围的至少一个点光源(21)取样，并与排列在至少一个点光源(21)对侧离毛细管(2)有一段距离的至少一个对应的
10 光学感应器(23)相连，因此在至少一个物体内部没有焦平面，当至少一个物体流经至少一个点光源(21)及其至少一个对应的光学传感器(23)时采集通过此至少一个物体的多投射角；以及
 (d) 生成一系列的计时信号(28,29)，每一计时信号(28,29)都与沿着至少一个物体的 Z-向轴(9)的特定位置相对应，从而产生穿过至少一个
15 物体的一系列时控的光学投射。

2. 根据权利要求 1 中所述的方法进一步包括重建一系列时控的光学投射来形成二维(2D)切面的步骤。

- 20 3. 根据权利要求 1 中所述的方法进一步包括重建一系列时控的光学投射来形成三维(3D)空间的步骤。

4. 根据权利要求 2 中所述的方法进一步包括将至少一个物体的连续的 2D 切面组合起来制成三维(3D)图像的步骤。

- 25 5. 根据权利要求 1 中所述的方法，其中所述的光学投射包括二维(2D)光学投射，进一步包括根据至少一个物体的二维(2D)光学投射生成三维(3D)图像的步骤。

- 30 6. 权利要求 1 中所述的方法进一步包括在毛细管(2)内产生层流，从而使至少一个物体能够以恒定的速度移动。

7. 根据权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一个物体是一个细胞(1)。

5 8. 权利要求 5 中所述的方法进一步包括用 3D 图像来定量测定显微镜下结构的步骤。

9. 根据权利要求 8 中所述的方法, 其中所述的显微镜下结构包括亚细胞结构。

10

10. 根据权利要求 5 中所述的方法, 其中所述的至少一个物体包括含有至少一种标记的分子探针的细胞(1), 进一步包括用 3D 图像来测定至少一种标记的分子探针的位置和数量的步骤。

15

11. 根据权利要求 2 中所述的方法, 其中所述的至少一个物体包括含有至少一种分子探针的细胞(1), 这种分子探针提供分子探针信息, 该方法进一步包括将 2D 切面和分子探针信息组合起来用来确定特定的亚细胞结构与至少一种分子探针之间的联系。

20

12. 根据权利要求 1 中所述的方法, 其中所述的至少一个物体包括一个细胞(1), 该方法进一步包括用于细胞成像和分析的重建环中的操作步骤, 从而使通过投射进行采样的空间含至少下述三个腔室:

(a)细胞(1)外的液体,

(b)细胞浆(18), 以及

25

(c)细胞核(19)。

13. 根据权利要求 12 中所述的方法进一步包含下述步骤:

(a)如果至少一个分子探针中的特定探针仅与细胞壁(12)和核壁(13)的表面结合, 那么计算包括细胞壁(12)和核壁(13)的界面; 以及

30

(b)否则将三个不同腔室间的转移界面确定为细胞壁(12)和核壁(13)的表面。

14. 根据权利要求 12 中所述的方法进一步包含下述步骤：

(a)测定某一基因产物在相对于细胞核(18)的细胞浆(19)中表达相对上调或下调情况；

(b)以背景悬液中的非结合探针进行标化。

5

15. 根据权利要求 14 中所述的方法进一步包含下述步骤：如果基因产物是一种蛋白，用一种标记的抗体探针评价细胞(1)的至少一种疾病状态和转化状态。

10 16. 根据权利要求 14 中所述的方法进一步包含下述步骤：如果基因产物是一种蛋白，用一种核酸探针评价细胞(1)的至少一种疾病状态和转化状态。

15 17. 根据权利要求 1 中所述方法进一步包含采用高强度白光源照射至少一个物体、同时收集多个滤过波长。

18. 根据权利要求 1 中所述方法进一步包含下述步骤：

(a) 以一个报道者来标记分子探针，该报道者在原发光子源激发后发射不同波长的光；

20 (b)滤过来自报道者的继发发射光，从而将原发光子和继发发射光子区分开来。

25 19. 根据权利要求 3 中所述的方法，其中所述的细胞(1)包含至少一种分子探针，这里的分子探针提供分子探针信息，该方法进一步包含将 3D 和分子探针信息结合起来的步骤，从而明确特定的亚细胞结构与至少一种分子探针间的联系。

30 20. 根据权利要求 4 中所述的方法，其中所述的细胞(1)包含至少一种分子探针，这里的分子探针提供分子探针信息，该方法进一步包含将 3D 和分子探针信息结合起来的步骤，从而明确特定的亚细胞结构与至少一种分子探针间的联系。

21. 根据权利要求 5 中所述的方法, 其中所述的细胞(1)包含至少一种分子探针, 这里的分子探针提供分子探针信息, 该方法进一步包含将 3D 和分子探针信息结合起来的步骤, 从而明确特定的亚细胞结构与至少一种分子探针间的联系。

5

22. 根据权利要求 7 中所述的方法进一步包含对投射图像进行处理和分析以直接评价细胞(1)的疾病状态或转化状态的步骤。

23. 用于显微镜下物体成像和分析的流式光学断层成像系统包括:
(a)含毛细管(2)的流式细胞仪;

10

(b)环绕毛细管(2)设置的至少一个重建柱(20), 其中所述至少一个重建柱包括多个沿着在毛细管(2)上的几何图形布置的点光源(21), 从而至少一个物体穿过点光源阵列(21)时其中的每一个点通过多个角度被取样;

(c)一个触发装置(25, 26, 27), 定位以观测至少一个物体, 产生触发信号(28, 29), 该触发信号(28, 29)被至少一个重建柱(20)接收, 至少一个重建柱(20)响应触发信号(28, 29), 并产生代表至少一个物体投射图像的信号, 这些信号被处理以提供至少一个物体的三维信息。

15

24. 根据权利要求 23 中所述的流式光学断层成像系统, 至少一个物体以某一速度(V)流经毛细管(2), 其中至少一个物体包括一个细胞(1), 该细胞有细胞浆壁和细胞核壁(13), 细胞(1)在流经毛细管(2)的过程中穿过多个重建平面, 一个穿过细胞核壁(13)的平面切面位于每个重建平面内, 典型情况下重建平面之间的距离(d)小于 10 微米, 每个细胞(1)的一个点与时间间隔(t)中的每个重建平面相一致, 时间间隔根据下述关系进行描述:

20

25

$$t=d \div V \quad .$$

25. 根据权利要求 24 中所述的流式光学断层成像系统, 其中细胞(1)以至少一种用于疾病诊断的标记分子探针进行标记。

30

26. 根据权利要求 23 中的流式光学断层成像系统, 进一步包括:
- (a) 用以控制至少一个物体接近沿某一轴流动的速度(V)的装置;
 - (b) 沿至少一个物体的轴(9)定位二维(2D)重建平面以产生至少一个物体的三维(3D)图像的装置; 以及
- 5 (c) 在重建柱(20)中正确定位至少一个物体、从一系列或多个二维(2D)投射数据中产生细胞(1)的三维(3D)图像的装置(27, 40)。

27. 根据权利要求 23 中所述的系统, 多个重建柱(20)呈系列设置, 照射流经毛细管的至少一个物体的点光源(21)发射的光波波长涵盖从

10 X 线到远红外线的电磁波谱。

28. 根据权利要求 27 中所述的系统, 其中所述的位于重建柱(20)间和/或重建柱(20)内的光源发射的光谱不同。

15 29. 根据权利要求 28 中所述的系统, 其中所述的发射光谱含以最大触发免疫荧光染料和标志为中心的窄带光谱。

30. 根据权利要求 27 中所述的系统, 其中所述的多个重建柱(20)呈系列设置, 光感应器阵列(23)经光谱带宽滤过, 以感测对用于至少一个免疫荧光研究和倍性研究的荧光团发射光的波长。

20

31. 根据权利要求 27 中所述的系统, 其中所述的多个重建柱(20)呈系列设置, 隔以毛细管(2)的插入部分。

25 32. 根据权利要求 27 中所述的系统, 其中所述的发射光波长范围跨越从 10 埃到 2000 微米的电磁波谱。

33. 根据权利要求 23 中所述的系统, 其中所述的几何图形包括螺旋形。

30

34. 根据权利要求 33 中所述的系统, 点光源(21)覆盖圆周的任意角度范围, 沿至少 180 度角以等角递增分布。

35. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中所述的毛细管(2)包含与毛细流横断面相关的均一薄壁。

5 36. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中所述的触发装置(25, 26)位于重建模块的上游，从而在至少一个物体进入然后从重建柱中流出时提供一个用以起始并接着终止数据接收的计时信号。

37. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中所述的触发装置选自激光二极管、CCD、PMT、固相光检测器，以及上述元件的各种组合。
10

38. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中的触发装置产生触发信号，该信号与至少一个物体的速度(V)一起用于计算下游的重建模块何时开始收集感兴趣的至少一个物体的数据。

15

39. 根据权利要求 38 中所述的系统，其中所述的触发装置(25, 26, 27)产生触发信号(28, 29)，触发信号与至少一个物体的速度(V)一起用于计算下游重建模块的时间点，以获得基于上游触发信号(28, 29)设定的沿时间增量的多个投射数据。

20

40. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中所述的毛细管(2)用于产生从 1m/s 至 10m/s 的速度。

41. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中的重建柱(20)产生从多个固定点光源(21)进入毛细管(2)的投射光线，从点光源发射的光子有一个选择的几何学特征，使得在物体内部不存在焦平面。
25

42. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中所选的投射几何学特征选自从锥形和扇形。

30

43. 根据权利要求 41 中所述的系统，其中所述的投射光线穿过至少一个物体、被至少一个感应元件阵列所检测。

44. 根据权利要求 43 中所述的系统，其中：

(a)至少一个感应元件阵列(23)置于对应的光源(21)对面；

5 (b)至少一个感应元件阵列(23)有光学带宽过滤器，其中穿过的光谱
波段依感应器阵列而不同，这些阵列在多个重建模块(20)内部或之间。

45. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中所述的偏移数据用以对
系统进行标化。

10 46. 根据权利要求 45 中所述的系统，其中所述的系统通过下述方
式校准：i)在流式管中没有至少一个物体时获取图像；ii)获取已知光学
特性的至少一个物体的图像。

47. 根据权利要求 46 中所述的系统，其中所述的校准数据经过重
15 建。

48. 根据权利要求 46 中所述的系统，其中所述已知光学特性的至
少一个物体选自乳胶微球、多聚微球和扁球体。

20 49. 根据权利要求 41 中所述的系统，其中所述的各个点光源包括
一个环形光源。

50. 根据权利要求 41 中所述的系统，其中所述的重建环由来自顶
部光源和基底部宽的感应阵列构成的放射状重叠的扇形投射所确定。

25

51. 根据权利要求 41 中所述的系统，其中所述的点光源选自下述
点光源设备：

(a) 激光前方的针孔；

(b) 光纤；

30 (c) 光子源前的短焦距透镜；

(d) 照射荧光表面一个点的电子束；

(e) 高强度光子源；以及

(f) 上述元件从(a)至(e)的任意组合。

52. 根据权利要求 41 中所述的系统, 其中所述的感应器元件阵列选自下列元件: 电荷耦合器(CCD)、光电二极管、CMOS、CdZnTe、
5 MgI 感应器、固相感应器、以及包括线性排列的任意元件组合的光敏元件阵列。

53. 根据权利要求 52 中所述的系统, 其中所述的感应器阵列以光源和流式中心轴间的直线为中心。

10

54. 根据权利要求 53 中所述的系统, 其中所述的感应器阵列与流式轴垂直排列。

55. 根据权利要求 33 中所述的系统进一步含连续的亚元件交错排列的多个固定点光源, 上述元件与沿螺旋排列的点光源(21)上的每一个
15 不同点光源组成适当排列。

56. 根据权利要求 33 中所述的系统, 其中所述的感应元件阵列(23)沿一个柱形圆周弧形排列, 该圆周与重建柱(20)同心。

20

57. 根据权利要求 23 中所述的系统, 其中所述的重建柱(20)提供采用滤波背景投射算法进行重建的重建信号, 该算法计算与移动轴垂直的二维(2D)切面图像, 而多个切面的连续堆积产生了至少一个物体的三维(3D)图像, 对照的差异是至少一个物体内部光密度变量的函数。

25

58. 根据权利要求 23 中所述的系统, 其中所述的色谱分析仪用来区分一个细胞(1)内的多个分子探针和结构特征。

59. 根据权利要求 23 中所述的系统进一步包含与重建柱耦合的系列带宽滤波器, 用以分离波长数据, 并对各个染色分子进行重建和空间定位。
30

60. 根据权利要求 23 中所述的系统，其中所述的重建柱(20)以微制作技术制造。

5 61. 根据权利要求 26 中所述的系统进一步包含对一系列投射图像进行直接处理和分析以评价细胞(1)的疾病状态或转化状态的装置。

62. 根据权利要求 33 中所述的系统，其中所述的一个重建空间由顶部点光源和底部宽的感应器阵列构成的投射圆锥的放射状重叠确定。

10

63. 根据权利要求 28 中的系统，其中所述的重建柱(20)提供采用滤波背景投射重建算法重建的图像信号，该算法计算与移动轴垂直的切面的二维(2D)图像，对多个切面的连续堆积产生至少一个物体的三维(3D)图像，对照的差异是至少一个物体内部探针发射光密度变量的函数。

15

64. 用于显微镜下物体成像和分析的光学断层成像系统，该系统包括：一个脉高度分析仪(27)、一个光子源和光子感应器(23)，光子源、光子感应器(23)和脉冲高度分析仪(27)一起组成一个触发装置，脉冲高度分析仪(27)提供至少一个物体开始的第一个触发点(28)以及至少一个物体结束的第二个触发点(29)，从而产生一个对应的触发信号发送至重建柱，使得物体速度(V)与每个投射切面的位置同步，其中所述至少一个重建柱包括多个沿着在毛细管(2)上的几何图形布置的点光源(21)，从而至少一个物体穿过点光源阵列(21)时其中的每一个点通过多个角度被取样。

25

用光学断层成像技术对流体中微小物体成像的仪器和方法

相关申请

- 5 本申请与 Alan C, Nelson 的申请日期为 03/28/2001, 系列号为 60/279244, 标题为“用光学断层成像技术对流体中微小物体成像的仪器和方法”的临时未决申请有关, 并参照该申请, 而要求受益于该未决临时申请的申请日的优先权。

10 发明背景

本发明涉及应用点光源投射几何特征进行三维光学断层成像技术, 更具体地说, 即应用光学断层成像技术对流体中的显微镜下物体包括细胞成像。

- 15 随着如抗体探针和核酸杂交探针等的分子探针的出现, 一些与新疾病有关的问题可通过对上述分子探针进行标记然后检测其在细胞和组织中的定位及浓度而得到解决。由于出现了对这些探针进行更精确定位和定性的需要, 同时就需要更先进的技术, 在显微镜下测定探针的二维(2D)和三维(3D)密度。传统的光学显微镜观察堆积于玻片上的细胞, 只能进行近似的 2D 或 3D 成像, 原因是受以下因素的影响, 如焦
- 20 平面的深度、取样角度以及细胞处理所带来的问题, 其典型的问题是使得细胞在观察平面上相互重叠。光学显微镜的另一缺点是通过物镜进行观察的固有缺陷, 即只有焦平面内的区域才能提供用于分析的确切数据。

- 25 流式细胞分析方法通过让细胞一个接一个地在流体中流动而克服了细胞相互重叠的问题。但遗憾的是, 流式细胞分析系统不能获得像传统光学显微镜一样质量的细胞图像, 而且, 在任何情况下, 这些图像都不是三维的。对于上述背景, 熟悉本领域的人士可参考 Shapiro, HM 主编的《实用流式细胞分析术》, 第三版, Wiley-liss, 1995。

- 30 在计算机辅助断层成像领域, Johnson 等人申请的、发布日期 1995 年 3 月 28 日、标题为“三维显微断层成像分析系统”的美国专利

5,402,460 公布了一个用于生成标本的高分辨率、三维图像的显微断层成像系统,该系统采用了一个 X 线发生仪和一个能探测 X 线束在通过标本后衰减情况的 X 线探测仪。Johnson 等人的显微断层成像技术在对标本进行每次成像时作两个投射,这两个投射的 X 线束能量不同。在一次成像的两个投射完成后,在标本托架上旋转标本进行下一轮投射。对标本每次成像的两个投射一起分析可以提供标本中所含物质的断面上的定量信息。将不同成像的投射进行结合可提供标本的三维影像。美国专利 5,402,460 在此结合作为参考。虽然美国专利 5,402,460 介绍的 X 线技术可用于某些实际应用,但该专利并未提供用于流式细胞分析术的光学解决方案。

为克服本系统中前面提到的以及其他已发现的缺陷,本发明将流式细胞分析术的“一个接一个”细胞呈递与多点光源投射计算机光学断层成像结合起来,从多个投射中重建 2D 和 3D 细胞密度信息。

15 发明概述

本发明提供了一种应用点光源投射和断层影像重建技术对流体中微小物体成像的仪器和方法。该流式光学断层成像(FOT)系统包括一种流式细胞仪(如图 1 所示)和一个置于毛细管 2 周围的重建柱(如图 4 所示)。光子源 25 和光子感应器 26 与脉冲高度分析器 27 共同构成触发设备。脉冲高度分析器 27 根据已知的原理提供一个细胞开始的第一个触发点 28,而第二个触发点 29 用于该细胞的结束。脉冲高度分析器 27 输出与每个细胞开始和结束相对应的触发信号 30,该触发信号由重建柱 20 接收。来自重建柱的信号通过计算机断层影像重建技术进行直接分析或处理,从而提供有关细胞的二维或三维信息。

25

附图的简要描述

图 1 为根据本发明的实施方案构建的一个流式细胞分析系统的实例示意图。

图 2 为根据本发明的实施方案构建的一个单细胞流式处理过程的实例示意图。

图 3A 和图 3B 为根据本发明的实施方案构建的一个细胞和重建的

横断面实例示意图。

图 4 为根据本发明的实施方案构建的一个重建柱的实例示意图。

图 5 为根据本发明的实施方案构建的一个流式光学断层成像(FOT)系统的实例示意图。

5 图 6 为根据本发明的实施方案构建的一个重建柱内投射光的实例示意图。

图 7 为根据本发明的实施方案构建的一个重建柱从顶面观察的实例示意图。

10 图 8 为根据本发明的实施方案构建的用于细胞重建过程的源/线排列配置几何特征的实例示意图。

优选实施方案的具体描述

本发明在此描述的是基于与生物学细胞有关的特定例子，但应当明确的是，这些举例的目的是为了阐述本发明的原则，而本发明并不
15 仅限于此。在一个实例中，在一个显微镜下空间中构建点密度和发射强度的三维分布使得能够测定在一个显微镜下空间中任意位点的密度和荧光，并确定感兴趣的结构、分子和分子探针的所在部位。通过使用标记的分子探针，就可以测定显微镜下物体中附着于特殊结构上的探针的量。出于说明的目的，一个物体如一个细胞，可以用至少一个
20 标记的分子探针进行标记，对该探针的数量和定位进行检测可能获得有关该细胞疾病状态的重要信息，包括各种癌，如肺、乳腺、前列腺、子宫颈和卵巢癌，但并不仅限于此。

准备用于流式细胞分析的生物学细胞以用于特定疾病诊断的标记分子探针进行染色或标记，这些细胞要流过一个柱状的装置，该装置
25 提供投射影像并根据与细胞流动的矢状方向大致垂直的光学投射路径而重建 2D 和 3D 密度信息。通过控制细胞沿轴流动的速率，重建的 2D 垂直平面可以沿细胞的轴正确地定位(或堆积)，从而获得整个细胞的 3D 图像，或者直接根据 2D 光学发射或散射投影估计细胞的 3D 图像。

由于以下特性，流式细胞仪非常适合于图像重建。这些特性有：

30 • 细胞以单列流过毛细管，使得细胞重叠和阻塞的可能性被降至最小，

- 细胞通过毛细管的速率可以直接测定并保持稳定,
- 细胞趋向于沿毛细管的中心轴流动, 从而在结构上呈放射状对称, 以及

- 根据细胞的固定和悬浮情况, 细胞可保持其可塑性, 同时其形状因毛细管内的速率梯度而沿 Z 轴方向伸长。

本发明利用上述特性提供了一个用于点投射成像和断层影像重建的系统。

图 1 为根据本发明的实施方案构建的流式细胞分析系统的一个实例的示意图。该系统参照一个有 x, y 和 z 轴坐标的坐标系统 11 排列。在实际操作过程中, 细胞 1 通过一个已知的注射装置 4 注射进入注射管 3。毛细管在注射末端 5 较宽, 并包含一个压力帽 6。鞘液 7 进入管 8 中, 在毛细管 2 中形成层流。这是一种典型的流式细胞分析形式, 即细胞 1 在溶液中制备和悬浮后在压力下通过毛细管 2, 从而沿流动的长轴延伸并大致沿毛细管的中心轴移动, 如图中的虚线 9 所示。细胞可以很容易地在柱状毛细管中沿中心轴以轴向对称和稳定速率 10 呈单列流动。

图 2 为根据本发明的实施方案构建的单细胞流式处理过程的一个实例示意图。细胞 1 在由速率向量 10 所示的稳定速率(V)下通过毛细管 2。细胞 1 含有一个胞浆壁 12 和一个胞核壁 13。在细胞流过毛细管 2 的过程中, 细胞 1 穿过多个重建平面, 图中分别以 14a、14b 和 14c 表示第一、第二和第三重建平面。第一个平面切面 15a 穿过位于重建平面 14 a 内的胞浆壁。与之类似, 第二个平面切面 15b 穿过位于第二个重建平面 14b 内的细胞浆和细胞核的壁。而第三个平面切面 15c 则位于第三个重建平面 14c 内。本发明的一个中心特征在于多个波长可选的点光源以毛细管为中心分布。点光源与对面的光学探测器阵列一起运行, 后者对光谱中经选择的部分非常敏感, 从而能获取穿过细胞的投射光。获取的投射影像可以直接分析, 或应用断层影像重建算法进行处理, 从而提供细胞内密度分布和/或发散强度的空间图或图像。需要明确的是, 在实际操作中, 重建平面的数量可以是几个, 也可以是几百甚至更多, 这要根据系统所处理的物体需要的图像分辨率而定。一组重建的平行平面切面在软件中进行组合或叠加, 从而产生有关细

胞内致密程度和发散强度的三维(3D)图像。另外, 通过使用平面(2D)而非线性(1D)的光探测器阵列, 以及圆锥形而非扇形的光照射形式, 可同时得到穿过流动细胞的多个邻近的平面切面的投影。结果, 通过圆锥光束重建算法就可以从二维(2D)的投射中直接计算出细胞空间中密度分布和发散强度的三维(3D)图像。另外, 可直接分析含有无穷景深(infinite depth of field)的 2D 点光源投射影像。

对于一个生物学细胞, 重建平面间的距离 d 可以是几个微米或更小。细胞 1 内的各个点将与各时间间隔中的每个重建平面相对应, 该时间间隔(t)可根据下述相互关系进行描述:

10 $t=d \div V$ (等式 1)

图 3A 和图 3B 所示为根据本发明的实施方案构建的一个重建的横断面 16 示意图。根据穿过细胞的光投射进行的细胞内点致密度重建得益于流动细胞的轴向对称和中心性。另外, 投射取样的空间可以模式化为由以下三个不连续的腔室组成:

- 15
1. 细胞外液体 17(如鞘液或细胞悬液),
 2. 细胞浆 18, 以及
 3. 细胞核 19。

掌握上述三个腔室中光密度或分子探针的定量分布状况就足以解决很多细胞生物学和疾病诊断方面的重要问题。另外, 如果某种分子探针优先与界面结合, 那么就可以计算出两个界面, 包括胞浆或细胞壁 12 和胞核壁 13。否则, 也足以将这些壁确定为三个不同腔室间的转换界面。

通过整合重组的细胞各个切面, 或以螺旋状、空间测定的方式进行重组, 就可以获得 3D 形态学和空间信息, 但获得绝对(与相对对应)空间信息则有赖于细胞定位的确切信息。细胞定位是流体速率的函数。然而, 在几个实例中, 密度和分子探针的相对浓度足以解决诊断问题: 如, 与背景液中的非结合探针相比, 有多少探针存在于相对胞核的胞浆中? 或, 这种探针主要定位于细胞膜还是细胞核表面?

尽管细胞在穿过毛细管时可能成为放射性对称的结构, 但至少一种结合的分子探针在胞核和胞浆区域的分布可能不具有这种轴对称性。因此这就要求成像系统和(尤其是发散)重建算法能够提供足够的空

间分辨率，以定位结合的、含荧光的分子探针的空间，而使用的尺度要比用于上述三个腔室分析的尺度更精细。同时还进一步要求系统提供在两个细胞内腔室中呈不对称分布的探针浓度的定量信息。亚微米级的空间分辨率可以更容易地分析探针与胞浆或胞核中特殊亚细胞腔室、结构或细胞器的关系。

一个更具体的例子是早期发现高危癌症患者。在该例子中，当细胞进行转化时某些基因的功能表达可能上调或下调。检测基因产物(通常是一种蛋白)在于相对胞核的胞浆中表达水平的相对上调或下调，并以背景悬浮液中的非结合探针进行标准化在诊断学上具有重要意义。

10 如果基因产物是一种蛋白，那么标记的抗体探针就可以通过对基因蛋白产物的定位和/或定量来评价细胞的疾病状态。因此，这种三腔室分析方法足以用于疾病状态的评定。

图 4 为根据本发明的实施方案构建的一个重建柱的实例示意图，该重建柱环绕着含有流动细胞 1 的流式管 2。举例说，一个重建柱 20 包括一个点光源 21 的螺旋 24，这些点光源以一个预先确定的螺旋倾斜角(倾斜角为 θ)分布。每个点光源 21 产生一束光子 22，光子束呈典型的圆锥形或扇型。如图 4 举例中显示，光源的分布呈螺旋形，而光源的分布也可采取其他各种几何形式，这将部分取决于电子的速度、细胞速率和在感应器(探测器)获得不重叠投射信号的几何特征。排列的

20 感应元件 23 用于接收从点光源来的光。

在细胞 1 流经光源时，固定的点光源 21 和对面环绕着毛细管的探测器 23 一起获取穿过整个细胞的多个投射角。通过记录光源和减弱的传输光和/或发散光和/或散射光的发射和/或读出的时间，每个检测信号都将与流动细胞 z 向轴上的一个特定的已知部位相对应。通过这种方法，细胞 1 以已知速率沿与光源垂直的已知轴流动导致该光源发射或以同步方式被检测，细胞被穿过的投射光进行光学横断从而可在 x-y 平面上重建一个 2D 切面。对一系列切面进行叠加或数学组合，将形成细胞的 3D 图像。还可以将细胞运动与围绕流动轴的一个光源(或多个光源)的位置结合起来，从而获得可用于重建的数据，例如，以一种螺旋的方式构建细胞的 3D 图像。图像重建可以用扇形光束重建算法将由

30 线性(1D)投射重建的连续平面图像叠加而获得，也可以直接将平面(2D)

投射用锥形光束重建算法获得。细胞的 3D 图像可以提供亚细胞结构的定量数据，并对提供诊断信息的标记分子探针进行定位和定量。

如前所述，重建横断面或立体空间的 2D 或 3D 密度结构需要不只一个的穿过细胞横断面的投射。在传统的一个一个切面的医学 X 线计算机断层成像术中，获取多个投射是通过固定患者，而 X 线光源和对面的感应器沿一个环移动从而产生穿过患者的多个投射角。与之类似，本发明的流式光学断层成像系统在一个预先确定的速率(V)下使细胞通过多个光源，这些光源以不同的角度定位于毛细管周围，从而在细胞流过各个点光源时产生多个穿过细胞的投射。这些点光源发射光子穿过细胞，被排列于光源对面的感应器所检测。在毛细管周围的点光源可以沿螺旋 24 排列，或以其他合适的几何图形排列，从而使细胞流经光源阵列时从多个角度对细胞中的每个点进行取样。为获得一个较好的取样几何图形，这些点光源至少应覆盖 180 度圆周。较小的覆盖角度(如，小于取样角度)在某些情况下也可行，而增加额外的放射状覆盖将改善计算机重建的精确度和信噪比。根据几何学排列，应用传统的分析、叠加或统计学运算将有利于锥形或扇形光束的图像重建(例如，见 Gilbert, P, “源自投射的物体三维重建的叠加方法”，*Journal of Theoretical Biology*, 36: 105-17, 1972, Oppenheim, BE, “叠加三维重建的更精确算法” *IEEE Transaction on Nuclear Science* NS-21: 72-7, 1974, Singer, JR, Grumbaum, FA, Kohn, P, 和 Zubelli, JP, “漫射物体内部的图像重建”，*Science* 248(4958): 990-3, 1990. Mueller, K 和 Yage, R, “应用 2D 纹理作图硬件的同步重建技术(SART)进行快速 3D 锥形束重建”，*IEEE Transaction on Medical imaging* 19(12): 1227-37, 2001)。相关的方法包括下述方法，但不仅限于此：ART(代数重建技术，如 Beoman, SH, Bender, R, Gordon, R, 和 Rowe, JE 所阐述，“ART 是一种用于三维电子显微镜代数重建的科学”，*Journal of Theoretical Biology* 32: 205-16, 1971)，SIRT(同步叠加重建技术，如 Gilbert 所阐述，id. #1493)，MLEM(最大相似度预测的最大化，如 Manglos, SH, Jaszczak, RJ, 和 Floyd, CE 所阐述，“锥形束 SPECT 的最大相似度重建：构建和初步测试”，*Physics in Medicine and Biology* 34(12): 1947-57, 1989, #1382)，和 OSEM(有序子集预测的最大化，如 Mangols, SH, Gagne, GM, Krol A,

Thomas, FD,和 Narayanaswamy, R, “用有序子集对锥形束 CT 进行传输最大相似度重建”, *Phsics in Medicine and Biology* 40(7): 1225-41, 1995, #4389)。

5 方法

流式细胞分析仪

图 5 为根据本发明的实施方案构建的一个流式光学断层成像(FOT)系统的实例示意图。该流式光学断层成像系统包括一种流式细胞仪,重建柱 20 位于毛细管 2 的周围。光子源 25、光子感应器 26 和脉冲高度分析仪 27 一起形成一个触发装置。脉冲高度分析仪 27 根据已知的原则工作,提供用于细胞开始的第一个触发点 28 以及用于细胞结束的第二个触发点 29。脉冲高度分析仪 27 输出与每个细胞开始和结束相对应的触发信号 30, 这些触发信号由重建柱 20 接收。

计算机 40 通过信号线 41-43 耦连以传输数据、控制信号和记录信号到点光源 21、感应元件 23 和脉冲高度分析仪 27 的时间。上述计算机可以包括足以用于图像获取和图像重建处理的一个或多个已知的计算机和处理器阵列。

商用流式细胞仪有三个基本的流式配置,即柱状流式管、矩形流式管和空气系统中的流式。(见 Shapirl, HM, 实用流式细胞分析术, 第三版, Wiley-liss, 1995)。柱状流式管属优先配置,因为对于重建算法来说保持最佳的柱状几何特征对于减少由于流式硬件带来的任何半径依赖非常重要(见图 1)。而且,柱状流式管具有与毛细管横断面相关的均一薄壁。

另外,触发装置可位于重建模块的上游,当细胞以最优方式进入和流出重建柱时该装置提供一个“开始”和“终止”数据收集的记时信号。触发装置可包括一个激光二极管、CCD、PMT、一个光检测器组合、一个固态光检测器以及前述元件的联合体。触发装置有一个用于感知流过细胞的阈值设定,从而产生触发信号,与已知的细胞速率一起用于计算下游的重建柱何时开始收集感兴趣细胞的数据。另外,第一和第二触发点的时间间隔对应于细胞流入和流出重建柱,该时间间隔可被分为均等或不均等的增量,在每个增量中可通过控制光源 21

和读取感应阵列 23 而获取额外的投射数据。

细胞流的速率需精确控制和测量。这可通过高端的商用系统实现，该系统使用的速率在 1 米/秒到 10 米/秒之间。最佳细胞速率将取决于对数据收集速度和信噪比的考虑，这一点将在下面进行讨论。

5 重建模块

图 6 为根据本发明的实施方案构建的一个重建柱 20 内扇形光束投射的实例示意图。构建重建柱的目的在于提供一种投射光的方式，即从沿着一小段圆周的多个固定的点光源 21a-21c 向柱状的毛细管进行投射。从点光源发射的光子具有已知的投射几何学特征，如呈扇形或圆锥形，这些光束穿过毛细管、被一系列感应元件 23a、23b 或者 23c 所检测，这些感应元件可以位于点光源对面的较大段圆周上，这要依具体情况而定。尽管为了阐述问题这里描述了适于扇形光束透射的弧线形(1D)排列的感应器阵列，需要明确是适于锥形光束透射的直线形(1D)感应器阵列或平面(2D)感应器阵列也可类似地应用。通过上述方式，可产生一套投射光，这些投射光像直线一样将点光源与一个感应元件联系起来。沿某一特定的投射线路(如线路 31)离开光源的光子数目和特定的感应元件接收到的光子数目之间的差异，与光子同投射光路中流式管内的细胞以及其他成分相互作用时丢失或衰减的光子数目有关。

然而，光散射可带来一些问题，如光子能量偏移、几何学缺陷、准度差，以及多个光源同时发光时来自不同光源的光子均到达一个特定的感应元件。通过仔细构建重建柱，例如谨慎选择点光源及其对面感应器排列的几何学图形(如本发明所述)，正确调定或多路记数(multiplexing)多个点光源激发和感应器读取的时间，上述因素导致的光子污染可被最小化，但不能完全消除。

例如在没有细胞时，光子污染可通过系统校准来解决。即，每个点光源依次发光，测定其对每个感应器的效应，从而提供用于标化系统的偏移数据。可以采用一个额外的校准步骤，如对乳胶多聚体颗粒、其他小球或扁球形物成像，它们的光学特性已知并具有与细胞成像有关的密度变化范围。通过应用位于感应器的光谱带通滤波器(spectral bandpass filter)可以区别从荧光探针发出的光子和来自点光源的光子。

这将在下面进行讨论。

光源

每个光源可有一些相同的一般特性，首选的是：

- 可以是一个近似的小环状点光源，
- 5 • 可以很亮并具有已知的光谱，
- 从光源发出的光子具已知的几何学特征，如锥形束或扇形束。

每个光源为产生一个投射角的数据。多个投射角沿螺旋排列，该螺旋的轴即流式管的中心轴，在细胞流过模块时这些光源产生穿过每个连续平面(或重建切面)的多个投射角数据。依据感应器排列的几何学特征，几个点光源可在同一个圆周上线性排列，使得投射光在感应器上10 不发生重叠。在一个 180 度螺旋上等距排列光源可以得到一个好的几何学取样模式，尽管较小的角度覆盖范围在某些情况也可被接受，而采用 360 度角可以改善信噪比。光源的数目是每个平面重建(x-y 平面)或立体重建所需分辨率的函数。虽然在阐述问题时使用的是点光源的螺旋状排列方式，应明确的是点光源的排列可采取许多种几何方式。15 此外，光源的波长可以选择，可使用多种二极管或其他激光，或对白光或其他宽谱光源，例如汞或氙气弧光灯，进行带通过滤。

图 7 为根据本发明的实施方案构建的一个重建柱(如图 6)从上面观察的实例示意图。图示第一个点光源 21a 和感应阵列 23a，含细胞核20 19 的细胞以与页面垂直的方向流动，光源投射的轨迹以二维的形式参与构成一个重建环 32。重建环中的所有投射，即使以按时间顺序堆积的方式获取，被描述为相互重叠；这个重建环包含整个细胞。第二点光源 21b 和第二个感应阵列 23b 位于螺旋上约 30°的方位。第三点光源 21c 和第三个感应阵列 23c 位于螺旋上约 90°的方位。

25 数据收集与细胞速率同步设门，这一设门在细胞的一个“厚”的轴横断面内。所需的平面厚度是要求的 z 轴方向分辨率的函数。一般情况下，轴向(z 向)分辨率要小于穿轴平面方向的分辨率。另外，最佳重建环由各投射扇的重叠交集确定，这些投射扇的顶端为点光源，而底宽为感应器阵列。理想的情况是，重建柱的几何学特性应确保流动细胞30 的横断面被完全包含在重建环中。

在构建点光源时可以采取如下措施：

- 位于激光或其他高能量光源前的针孔,
 - 小横断面的光纤,
 - 光源前的短焦距透镜,
 - 照射磷面上一个点的电子束(一种 CRT), 以及
- 5 • 上述因素的各种组合。

由于几何特征的因素, 点光源与感兴趣物体(细胞)的距离越近, 放大倍数就越高, 这是因为, 物体离光源越近, 其包含的几何学角度越大。相反, 如基于系统设计已知所需的分辨率, 那么就可以对该几何特征进行优化以获得特定的分辨率。对于上述背景, 熟悉本领域的技术人员可参考 Blass, M 主编 光学手册: 纤维光学和非线性光学, 第二版, 第 IV 卷, McGraw-Hill, 2001。

参见图 8, 图 8 为根据本发明的实施方案构建的用于细胞重建过程的直线阵列 23 的实例示意图。例如, 假定一个细胞横断面 12 和核 19 包含在一个直径 30 微米的重建环中, 分辨率为 0.5 微米, 那么以 Nyquist 15 取样(如以因子 2 进行重叠取样)显示, 对于每个点光源 21, 至少需要 120 个感应元件 33。位于顶部的点光源 21 和基底部的线性阵列长度 34 构成一个三角形 35, 从而使直径 30 微米的细胞位于三角形 35 内的情况下尽可能地与点光源 21 相接近。在这个例子中, 如果阵列(如 CCD)中的每个元件是 20 微米宽, 阵列长度为 2400 微米, 那么, 细胞中心 20 应位于离点光源 100 微米处(为毛细管直径的一半), 而点光源与线性阵列的距离是 8 毫米, 放大倍数为 80。

第二个例子, 一个直径 30 微米的重建环和一个互补金属氧化物半导体(CMOS)感应阵列, 其中的像素单元大小为 4 微米。在本例中, 阵列含 120 个元件, 宽度为 480 微米, 点光源与细胞的距离为 100 微米 25 时, 离点光源的距离为 1.6mm, 放大倍数为 16。

感应元件

每个点光源应有相应的感应元件阵列如 CCD, 该阵列呈直线或曲线形几何形状排列, 位于点光源的对面以接收穿过重建环的光子。一般情况下, 感应元件的线性阵列的中点位于过点光源与流动中心轴的直线上, 且该阵列线可与流动轴垂直。可能用到 2D 阵列, 位于 2D 阵 30 列中的每一列元件只有某一子集被读取用于重建输入。在 2D 阵列中,

每个连续的元件亚单位可通过合适的元件数目而交错排列，这些元件根据沿螺旋排列的每个不同点光源作适当的排列。

对于一个一个切面的扇形束重建，采用 30 微米重建环，每扇 120 个感应元件、分辨率 0.5 微米，2000×2000 的 20 微米元件的 2D 阵列足以感应以 1 个放射角增量排列的 136 个点光源，而连续观测间的平均偏移是 300 微米，相当于 15 个感应元件(在阵列中央，偏移可能是 140 微米，或 7 个元件，而在阵列边缘，扫过观察间的 1 个放射角可以有一个相当大的偏移)。如果平均 15 个感应器阵列以提供一个切面的投射数据，那么细胞图像在 z 轴的分辨率为 3.75 微米；如果每个投射平均需 2 个阵列，那么物体空间的轴向分辨率为 0.5 微米，与横轴分辨率相等。

在本发明的一项优选实施方案中，2D 阵列沿柱状圆周弧形分布，该圆周与重建柱同轴，使得光线的长度均等。对于 30 微米重建环，弧形的 2D 阵列仅含有对面螺旋形点光源所需的元件，这个阵列可呈螺旋带状，有 120 个元件宽，136 个元件高(长)，如上例所述。

虽然前面出于说明的目的描述了平面或“厚”扇形照射，需要明确的是，真实的、非校准的锥形束照射可与 2D 平面感应器一起使用，从而通过锥形束算法获得 3D 重建。2D 投射图像可直接分析以获得有关细胞疾病情况或转化状态的信息。对于直接的、空间锥形束重建，假如点光源和感应器呈几何学排列，来自多个点光源的照射是多路传输的，使得来自不同点光源的锥形光束在感应器阵列上不发生重叠。

另外，如果细胞以 1 米/秒(或 1,000,000 微米/秒)的速率流动，同时 2D 阵列中的每个元件宽度为 20 微米，那么每隔 20 微秒的一个线性读出(read-out)就可以获取一个细胞 0.25 微米切面上的数据。对于下述例子，如果平均 15 个感应器均匀排列用以提供一个 3.75 微米切面的数据，那么每隔 300 微秒发生一次读出。使用一个更大的 2D 阵列可使重建图像的质量获得显著改善。

本发明的一个实施方案尤其适用于含多个透射或发射光波段的多光谱成像，该方案可以包括两个或更多连续排列的重建模块。上述多个重建柱以毛细管上的插入部分相互隔开，而每个重建模块提供的投射信息均足以为流经的物体产生完整重建影像。每个重建模块的点

光源和/或感应阵列均有一种最佳的特定光谱波段。例如，第一个重建模块可采用高亮的白光照射、无滤光的感应器，从而提供完整的投射数据以重建物体的光密度、吸收或散射系数图，而第二个重建模块可采用诸如氩离子激光(488nm)作照射、波长在 495nm 左右的较狭窄光谱，从而激发荧光探针标记的蛋白以用于免疫荧光分析，和对 520nm 5 散射敏感的滤光感应阵列一起产生第二个完整的投射数据，通过应用如下述的散射重建算法，足以构建被标记蛋白浓度分布图。第三个重建模块采用 535nm 和/或 342nm 左右的窄带光谱进行照射以激发与 DNA 化学计量(stoichiometrically)结合的碘化丙锭(propidium iodide)，10 其滤光感应器优先检测红色散射光(617nm)以进行倍性(ploidy)研究。需要明确的是，举上述例子出于说明的需要，该方法管用适用于任何波长的照射和感应。

图像重建

最常用和最易执行的重建算法是滤过背景投射方，该方法源自采用锥形束和扇形束几何特征的计算机 X 线断层成像术(CT)的相似范例。(参见下述文献，如，Kak, AC 和 Slaney, M. 计算机断层成像原理，IEEE Press，纽约，1988，以及 Herman, G. 缘自投射的图像重建：计算机断层成像基础，Academic Press，纽约，1988。)这些方法均基于改良的 Radon 变形法则，反映了光源/感应器配置的特定几何特征和照射光束的路径。然而，对于用以一个接一个切面获取图像的临床用 X 线 CT，20 人体通常被固定，而 X 线光源和感应器则沿绕着患者的圆弧移动以收集在一个切面内来自多个投射角的数据。接着，人体在 z 轴上重新定位，于是收集另一个切面的数据，如此等等。而对于更现代的螺旋 CT，患者在 z 轴上连续运动的同时光源-感应器连续旋转以提供螺旋投射数据，这些数据提供了与患者 z 轴垂直的投射。在流式光学断层成像术25 中，物体(细胞)相对于静止的光源和感应器阵列以恒速运动，而多个光源/感应系统以沿细胞速率向量的特定时间点同步获取数据，其方式是在一个给定的切面或空间产生多个投射角数据。对于一个接一个切面的扫描，重建算法将计算垂直于轴向运动平面的 2D 图像，多个切面的连续堆积就产生了物体的 3D 影像，对应的分别是 CT 或流式光学断层30 成像中物体 X 线衰减系数或光密度变化的函数。对于空间、锥形束扫

描, 重建算法直接从平面传播或散射光的投射中计算细胞或其他物体
内某个空间的 3D 图像, 对应的分别是光密度和/或标记探针的密度分
布函数。

对于产生细胞密度重建的光传播数据或/和重建标记探针分布的光
5 散射数据, 可采用图像重建算法而不是滤过背景投射。通常称为迭代
重建算法, 该算法在某些情况下更为有效, 尤其是对于散射断层成像,
和可能的本发明中物体轴向对称、具三腔的情况, 从而可以在重建算
法中整合一些预先信息以提高重建的质量(见, 如 Gilbert, P, “用于投
射物体三维重建的迭代方法”, Journal of Theoretical Biology 36:
10 105-17, 1972, 以及上述其他参考文献)。

类似地, 一种方法可以采用基于有限元模式(FEM)的统计学重建算
法。FEM 算法源自线性转移理论, 即光子弥散/转移方程通过元件的所
有边界得到解决, 从而产生一个将被成像物体的吸收、散射、折射指
数和各种异性因子特性结合起来的二维或三维图像。关于该方法的范
15 例见 Psulsen, KD 和 Jiang, H, “应用有限元弥散等式近似进行空间变化
光学性质重建”, Medical Physics 22(691-701) 1995, Hampel, U 和 Freyer,
R, “用于放射性对称边缘介质中光学吸收断层成像的快速图像重建”,
Medical Physics 25(1): 92-101, 1998, 和 Jiang, H, Paulsen, KD, 和
Osterberg, UL, “频率区域近红外光子弥散成像: 在多靶位类组织模型
20 中的初步评价”, Medical Physics 25(2): 183-93, 1998。

色谱分离

如果采用多色谱点光源(如白光), 那么不同的色谱着色(如
chromaphor)就可以用来对一个既定细胞内多个分子探针和结构特征进
行区别。在这里, 光源或感应器(或二者)中的系列带通滤波器对波长数
25 据进行分离, 使得可以对各个染色的分子进行重建和空间定位。对多
探针成像的一个更有效的方法是采用高亮白光源、在感应器阵列端同
时收集多个滤过波段, 使得图像重建算法可以对每种色计算空间图像
切面。这些可以显示为彩色图像。

荧光、磷光、化学发光和纳米-颗粒发射

30 作为流式光学断层成像系统的一个特例, 某些分子探针可以标记
上一个“报道者”, 其在原始光源刺激后可以发出不同(更长)波长的光。

来自报道者的继发光可以被标准的滤光器过滤，从而将原发光和继发光区别开来。然而，继发光图像重建算法更为复杂，因为继发光不一定以直线方式来自点光源。假定继发光以一种均匀的球形方式从继发光源辐射，那么继发光到达任何感应元件的强度就是它到感应元件距离的简单函数。当来自继发光源的光子呈非球形分布时需作进一步改进，即提供一个与光源相关并位于重建切面内继发光球形分布的模式。每种方法都将提供一种计算继发光源在重建切面或空间内定位的手段。被成像物体与感应器阵列间的对准将提高图像重建质量。

如果用光学滤波器同时测定初始光子强度和继发光子强度，那么源自初始光子强度的高分辨率密度重建可以被继发光源重建重叠或融合，从而在单一重建图像中可以得到局部探针浓度的图像形态。根据光子强度、信噪比、光源和/或感应器的滤光能力或产生窄带光的能力，可以使用与不同的标记分子探针相对应的多个继发光源。

美国专利 6,201,628，标题为“高通量光学扫描仪”，发布日期 2001 年 3 月 13 日，作者：Basiji 等，公布了一种可以对物质荧光、光密度或磷光进行自动、快速和敏感扫描的扫描仪。该扫描仪采用固定路径长度的光学序列，将用于高速扫描的移动光束和用于减噪的相位敏感检测结合起来。该扫描仪含有一个光源，一个扫描镜用以接收来自光源的光并将其扫过操纵镜(steering mirror)，一个操纵镜用以接收来自扫描镜的光并将其反射到底物，光沿一个扫描弧扫过底物，以及一个光感应器以接收从底物发射或散射的光，其中光源到感应器的光路长度在光扫描底物的过程中大体上保持稳定。光学序列还可包含一个波导或镜子以收集从底物发射或散射的光并将其引导至光感应器。对于相位敏感检测，光源的强度可调节，而感应器与相位敏感的感应电子设备相连接。还提供一个使用底物移动的扫描仪。对于二维成像，底物在一维方向被移动，而扫描镜在第二维方向扫描光束。对于一个高通量的扫描仪，堆积的底物从一个加样盘装载到传送带上。美国专利 6,201,628 列在此作为参考。

本发明在此描述相当详细，目的是为了顺应专利法规，同时为熟悉本专业的人士提供应用本发明的新原则所需的信息，并按要求构建和使用上述例示性的和特定的部件。然而，需要明确的是，本发明也

可在特定的不同装备、仪器以及重建算法下进行实施，而在不偏离本发明的真实精神和范围的前提下，可以对具体装备和操作步骤进行各种改良。

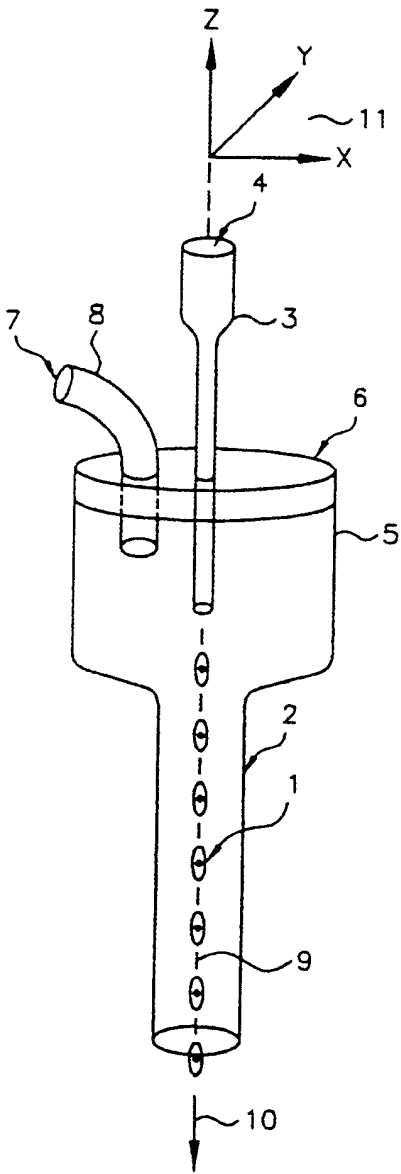


图 1

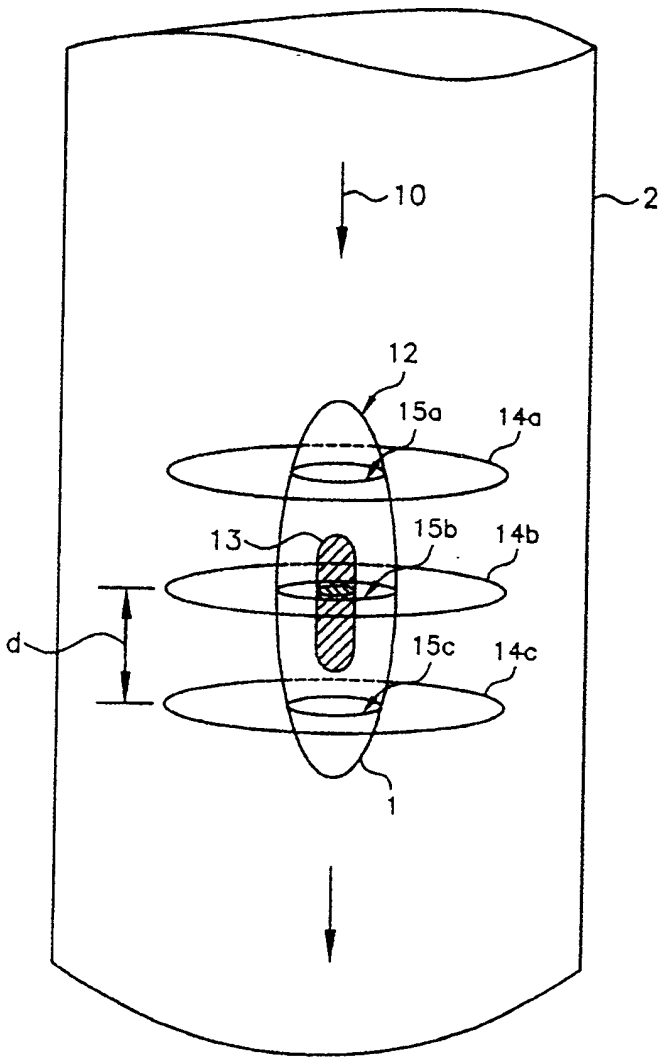


图 2

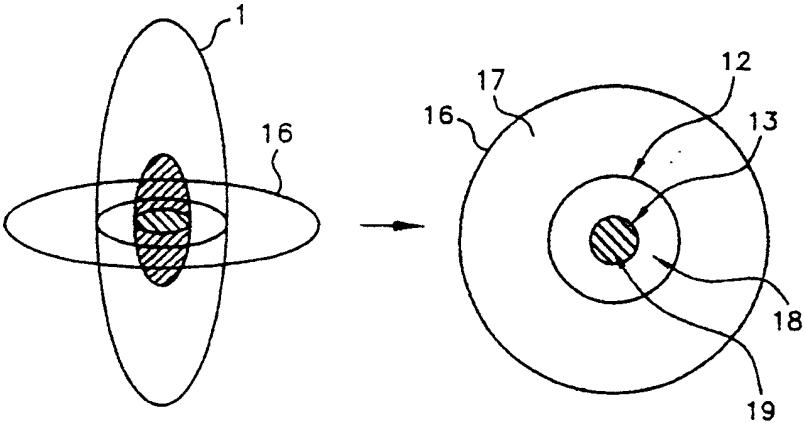


图 3A

图 3B

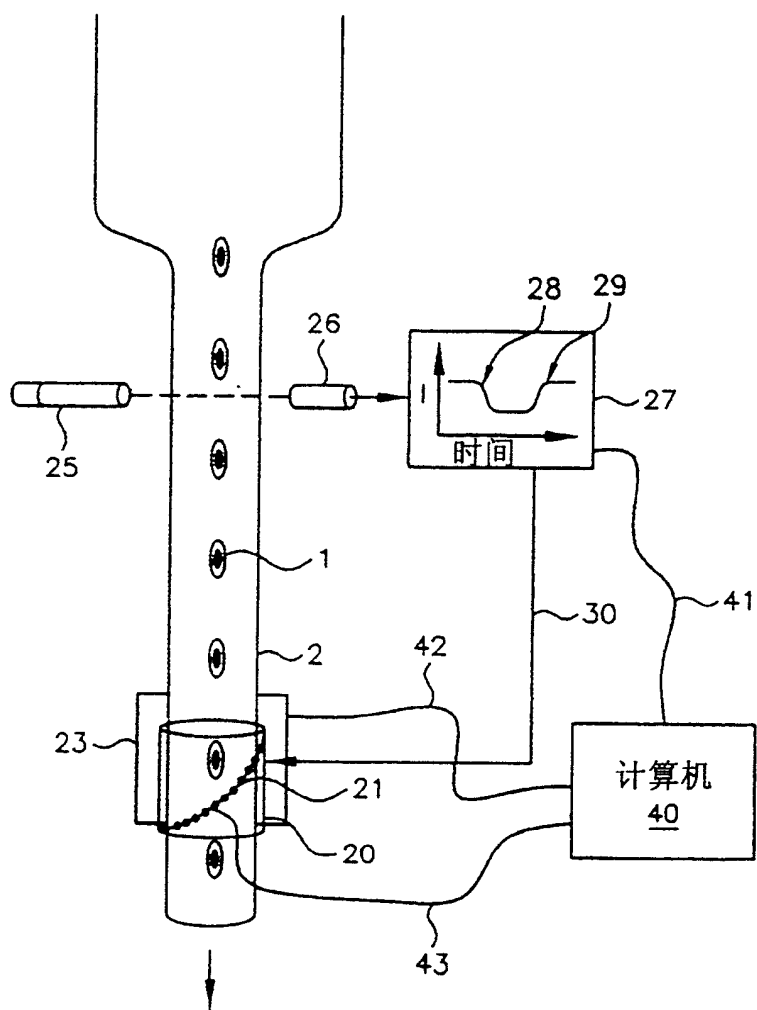


图 5

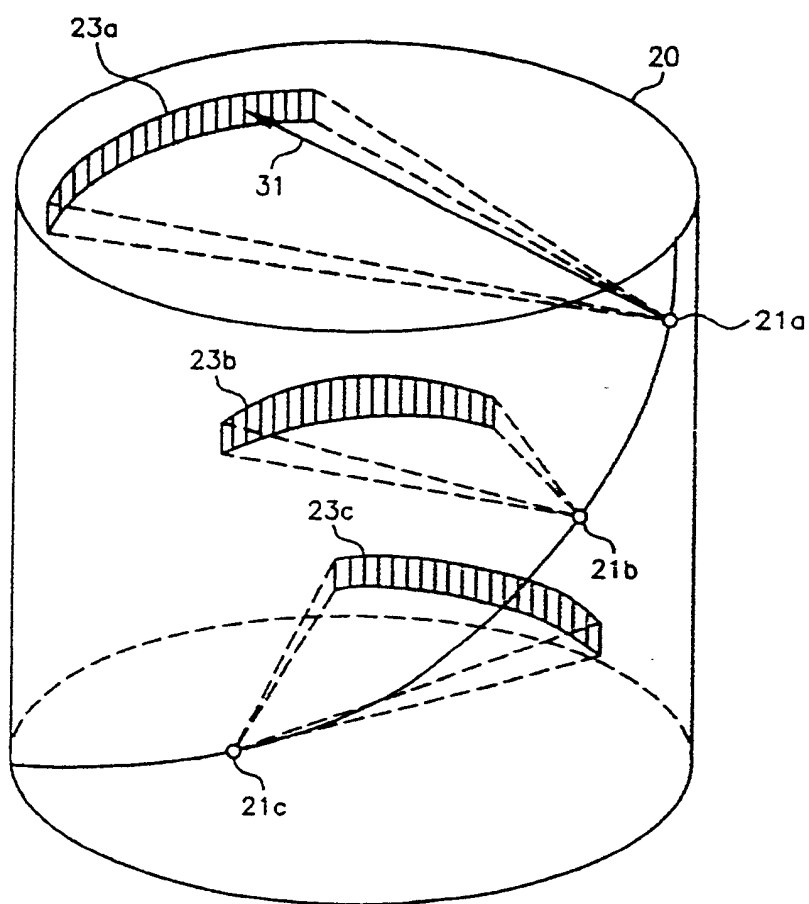


图 6

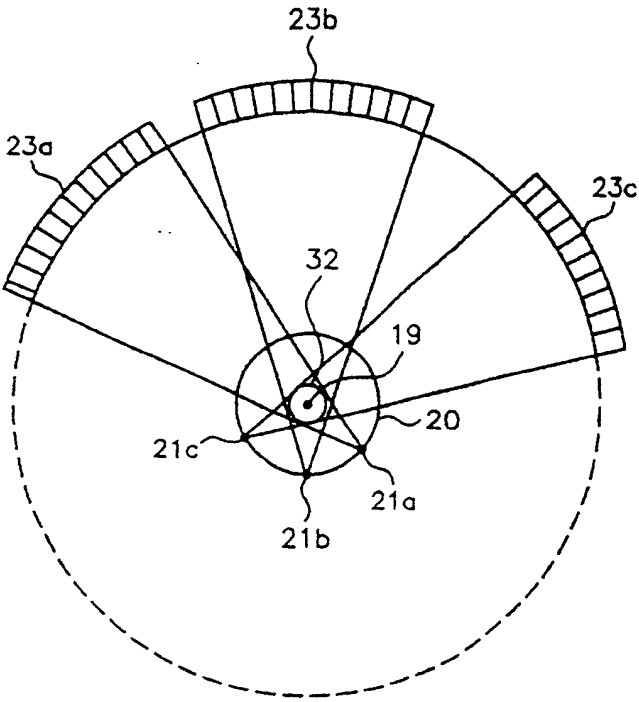


图 7

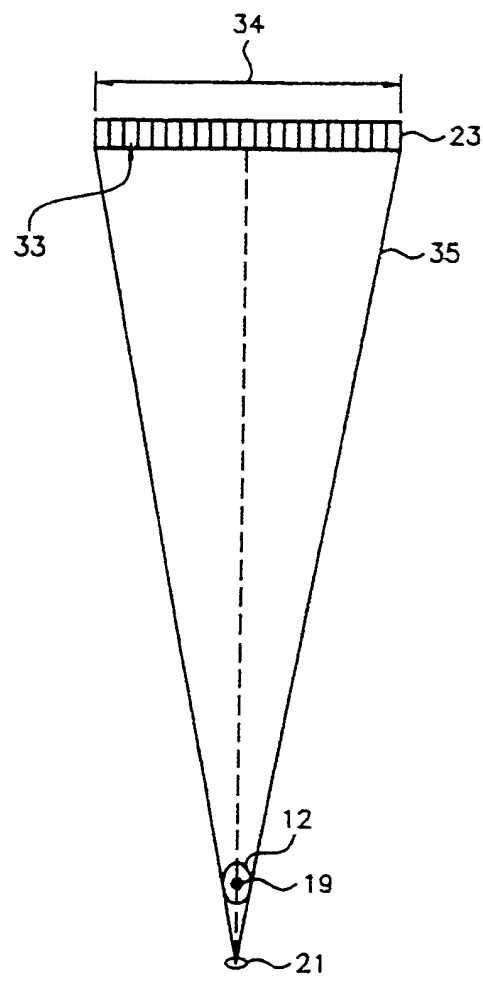


图 8