



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104293646 A

(43) 申请公布日 2015. 01. 21

(21) 申请号 201410443757. 8

C12M 1/34(2006. 01)

(22) 申请日 2010. 08. 23

(30) 优先权数据

61/236, 085 2009. 08. 22 US

61/332, 651 2010. 05. 07 US

(62) 分案原申请数据

201080047415. 4 2010. 08. 23

(71) 申请人 里兰斯坦福初级大学理事会

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 C. C. 王 K. E. 洛克 T. M. 贝尔

R. A. 赖乔 - 佩拉 B. 贝尔

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张文辉

(51) Int. Cl.

C12M 1/00(2006. 01)

C12M 1/38(2006. 01)

C12M 1/36(2006. 01)

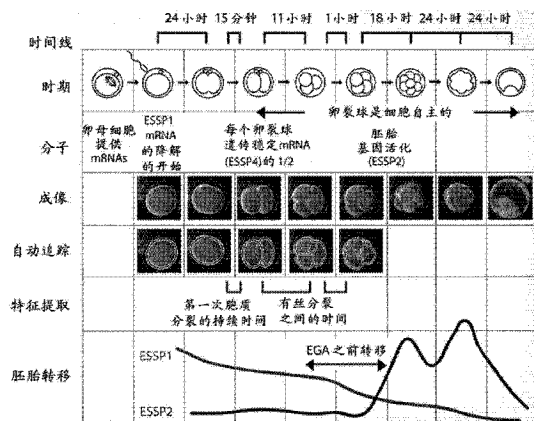
权利要求书3页 说明书46页 附图28页

(54) 发明名称

成像并评估胚胎、卵母细胞和干细胞

(57) 摘要

本发明提供了用于确定一个或多个胚胎或多潜能细胞的发育潜力和 / 或一个或多个胚胎或多潜能细胞中的染色体异常的存在的方法、组合物和试剂盒。这些方法、组合物和试剂盒在体外确定在人类中治疗不育症中最有用的胚胎和卵母细胞中 useful。



1. 一种用于将培养中的人类胚胎自动成像的设备,其包括:

- a) 配置以在孵育器内操作的一个或多个显微镜;
- b) 配置以聚焦在置于台上的相关培养皿上的每个显微镜;
- c) 包含用于照明所述相关培养皿中的胚胎的光源的每个显微镜;
- d) 包含照相机的每个显微镜;和
- e) 一种用于随时间储存来自一个或多个照相机的连续图像的方式和一种用于随时间分析连续图像的方式;

其中所述图像被分析用于测量一个或多个细胞参数,所述细胞参数选自由下列所组成的组:

- i) 第一次胞质分裂的持续时间;
 - ii) 胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔;
 - iii) 胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔;
 - iv) 第一次和第二次有丝分裂之间的时间间隔;和
 - v) 第二次和第三次有丝分裂之间的时间间隔。
2. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个显微镜的光源被配置以提供亮视野照明。
3. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个显微镜的光源被配置以提供暗视野照明。
4. 如权利要求 3 所述的设备,其中所述一个或多个显微镜的光源是红色或近红外的。
5. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数的测量发生在受精后约 48 小时至约 96 小时发生。
6. 如权利要求 5 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数的测量发生在受精后约 48 小时内发生。
7. 如权利要求 5 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数的测量发生在受精后约 54 小时内发生。
8. 如权利要求 5 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数的测量发生在受精后约 60 小时内发生。
9. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述连续图像时间间隔 5 分钟。
10. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数为:胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔和 / 或胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔。
11. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数为:胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔和胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔。
12. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数为:第一次和第二次有丝分裂之间的时间间隔和 / 或第二次和第三次有丝分裂之间的时间间隔。
13. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个细胞参数为:第一次和第二次有丝分裂之间的时间间隔和第二次和第三次有丝分裂之间的时间间隔。
14. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔为胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的起始之间的间隔、胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的结束之间的间隔、胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的结束之间的间隔或胞质分裂 1 的结束和胞

质分裂 2 的起始之间的间隔。

15. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔为胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的起始之间的间隔、胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的结束之间的间隔、胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的结束之间的间隔或胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的起始之间的间隔。

16. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔为胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的起始之间的间隔、胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的结束之间的间隔、胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的结束之间的间隔或胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的起始之间的间隔。

17. 如权利要求 1 所述的方法,其中所述胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔为胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的间隔、胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的结束之间的间隔、胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的结束之间的间隔或胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的起始之间的间隔。

18. 如权利要求 10 所述的方法,其中所述胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔为胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的间隔、胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的结束之间的间隔、胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的结束之间的间隔或胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的起始之间的间隔。

19. 如权利要求 11 所述的方法,其中所述胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔为胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的间隔、胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的结束之间的间隔、胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的结束之间的间隔或胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的起始之间的间隔。

20. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个显微镜被配置为通过计算机来控制。

21. 如权利要求 1 所述的设备,其中所述一个或多个显微镜包含在显微镜阵列中。

22. 如权利要求 21 所述的设备,其中所述包含在显微镜阵列中的一个或多个显微镜与阵列中的其它显微镜至少是部分分离的。

23. 如权利要求 21 所述的设备,其中所述包含在显微镜阵列中的一个或多个显微镜被配置为同时成像一个或多个培养皿 ;和所述一个或多个显微镜中的每个成像相应的一个或多个培养皿。

24. 如权利要求 3 所述的设备,其中所述一个或多个显微镜中的至少一个还包含 :暗视野片 ;聚光透镜 ;和一个或多个配置以捕捉图像和 / 或连接用于图像分析的计算机的传感器。

25. 如权利要求 1 所述的设备,其还包含基于与图像相关的数据配置以控制培养条件的反馈控制组件,所述培养条件包括温度和 pH 中的至少一种。

26. 如权利要求 1 所述的设备,其还包含含有凹入培养皿表面的多个微孔的培养皿,其中所述多个微孔具有大小和间距,使得一个或多个显微镜配置为同时观察多个微孔。

27. 如权利要求 1 所述的设备,其还包含 : (f) 配置以通过概率模型评估技术来评估一个或多个时间连续图像中胚胎的细胞边界的计算机,所述计算机还配置以跟踪基于评估的细胞边界的时间连续图像所显示的细胞边界。

28. 如权利要求 1 所述的设备, 其还包含:(f) 配置以通过概率模型评估技术来评估一个或多个时间连续图像中胚胎的细胞边界的计算机, 所述评估技术包括对细胞参数的多个假设的产生, 所述细胞参数与基于概率分布的一个或多个时间连续图像中的每个中的一个或多个细胞边界中的每个相关, 所述计算机还配置以跟踪基于评估的细胞边界的时间连续图像所显示的细胞边界以测量所述一个或多个细胞参数。

成像并评估胚胎、卵母细胞和干细胞

[0001] 本申请是申请日为 2010 年 8 月 23 日、中国申请号为 201080047415.4、发明名称为“成像并评估胚胎、卵母细胞和干细胞”的专利申请（国际申请号为 PCT/US2010/046343）的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求 2010 年 5 月 7 日提交的美国临时专利申请第 61/332,651 号和 2009 年 8 月 22 日提交的美国临时专利申请第 61/236,085 号的优先权，其两者通过引用全文并入本文。

发明领域

[0004] 本发明涉及来自人类和动物两者的合子 / 胚胎、卵母细胞和干细胞的生物和临床测试以及尤其是成像和评估的领域。

[0005] 发明背景

[0006] 不育症是影响 10-15% 生育年龄的夫妇的常见的健康问题。2006 年仅在美国，约进行了 140,000 个周期的体外受精 (IVF) (cdc.gov/art)。这产生每年超过一百万个用于植入并且发育足月的具有可变并且常常不清楚的潜力的胚胎的培养。IVF 之后的活胎率，每个周期，仅为 29%，而平均 30% 的活胎导致多胎妊娠 (cdc.gov/art)。多胎妊娠对母亲和胎儿都具有证据充分的不利结果，例如流产、早产和低出生率。IVF 失败的可能原因是不同的；然而，自从 1978 年引入 IVF 以来，主要挑战之一是鉴定最适于转移并且最可能产生足月妊娠的胚胎。

[0007] 基础胚胎发育领域中的认知受到限制，因为对人类胚胎生物学的研究仍然具有争议并且常常从研究资金中免除。结果，胚胎发育的现有知识中的大部分来源于模式生物的研究。然而，当来自不同物种的胚胎经历相似的发育时期时，时机因物种而不同。这些不同以及许多其他不同使得其不适于直接从一个物种推知到另一个物种 (Taft, R. E. (2008) *Theriogenology* 69(1):10-16)。人类发育的一般途径，以及根本的基本分子决定因素，对于人类胚胎发育来说是独一无二的。例如，在小鼠中，胚胎转录在受精后约 12 个小时被活化，与第一次卵裂分裂同时，而在人类胚胎中，胚胎基因活化 (EGA) 发生在第 3 天，约 8 细胞时期 (Bell, C. E. 等人 (2008) *Mol. Hum. Reprod.* 14:691-701; Braude, P. 等人 (1988) *Nature* 332:459-461; Hamatani, T. 等人 (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:10326-10331; Dobson, T. 等人 (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470)。此外，在早期人类发育中被调节的基因是独一无二的 (Dobson, T. 等人 (2004) *Human Molecular Genetics* 13(14):1461-1470)。而且，在其他物种例如小鼠中，超过 85% 的体外培养的胚胎达到胚泡期，哺乳动物发育中的第一大界标之一，而培养的人类胚胎具有约 30-50% 的平均胚泡形成率，以及镶嵌现象和不正常表型例如破碎和发育停滞的高发生率 (Rienzi, L. 等人 (2005) *Reprod. Biomed. Online* 10:669-681; Alikani, M. 等人 (2005) *Mol. Hum. Reprod.* 11:335-344; Keltz, M. D. 等人 (2006) *Fertil. Steril.* 86:321-324; French, D. B. 等人 (2009) *Fertil. Steril.*)。虽然有这些不同，但是大部分的植入前胚

胎发育研究来源于模式生物并且很难与人类胚胎发育相关 (Zernicka-Goetz, M. (2002) *Development* 129:815-829 ;Wang, Q. 等人 (2004) *Dev Cell*. 6:133-144 ;Bell, C. E. 等人 (2008) *Mol. Hum. Reprod*. 14:691-701 ;Zernicka-Goetz, M. (2006) *Curr. Opin. Genet. Dev*. 16:406-412 ;Mtango, N. R. 等人 (2008) *Int. Rev. Cell. Mol. Biol*. 268:223-290)。

[0008] 传统上在 IVF 临床中,人类胚胎成活力通过简单的形态学观察例如均匀大小的、单核的卵裂球的存在和细胞破碎的程度来测定 (Rijinders PM, Jansen CAM. (1998) *Hum Reprod* 13:2869-73 ;Milki AA 等人 (2002) *Fertil Steril* 77:1191-5)。最近,另外的方法例如胚胎的延长培养 (至第 5 天的胚泡期) 和经由着床前胚胎遗传学诊断 (PGD) 的染色体分析已经被用于测定胚胎质量 (Milki A 等人 (2000) *Fertil Steril* 73:126-9 ;Fragouli E, (2009) *Fertil Steril Jun* 21 [印刷出版前的 Epub] ;El-Toukhy T 等人 (2009) *Hum Reprod* 6:20 ;Vanneste E 等人 (2009) *Nat Med* 15:577-83)。然而,这些方法的潜在风险也存在,因为它们延长培养期并且破坏胚胎完整性 (Manipalviratn S 等人 (2009) *Fertil Steril* 91:305-15 ;Mastenbroek S 等人 (2007) *N Engl J Med*. 357:9-17)。

[0009] 近来所显示的是时差成像可以是观察早期胚胎发育的有用的工具。一些方法已经使用时差成像监测精子卵浆内注射 (ICSI) 之后的人类胚胎发育 (Nagy 等人 (1994) *Human Reproduction*. 9(9):1743-1748 ;Payne 等人 (1997) *Human Reproduction*. 12:532-541)。第 3 天,分析极体排出和原核形成并且与良好的形态学相关联。然而,没有与胚泡形成或妊娠结果有关的参数。其他方法已经关注作为指示的第一次卵裂的开始以预测人类胚胎的成活力 (Fenwick 等人 (2002) *Human Reproduction*, 17:407-412 ;Lundin 等人 (2001) *Human Reproduction* 16:2652-2657)。然而,这些方法没有认可胞质分裂的持续时间或早期分裂之间的时间间隔的重要性。

[0010] 其他方法已经使用时差成像以测量早期胚胎发育期间细胞分裂的时机和程度 (WO/2007/144001)。然而,这些方法仅公开用于牛胚胎的时差成像的基本和一般方法,其在发育潜力、形态学表现、分子和后生程序以及转移附近的时机和参数上基本上与人类胚胎不同。例如,牛胚胎与人类胚胎相比花费长得多的时间来植入 (分别为 30 天和 9 天)。(Taft, (2008) *Theriogenology* 69(1):10-16)。而且,没有公开可以预计人类胚胎成活力的特定的成像参数或时间间隔。

[0011] 最近,时差成像已经被用于观察受精之后最初 24 小时期间的人类胚胎发育 (Lemmen 等人 (2008) *Reproductive BioMedicine Online* 17(3):385-391)。发现首次分裂之后细胞核的同步与妊娠结果有关。然而,这一工作得出结论早期首次卵裂不是重要的预计参数,其与之前的研究相矛盾 (Fenwick 等人 (2002) *Human Reproduction* 17:407-412 ;Lundin 等人 (2001) *Human Reproduction* 16:2652-2657)。

[0012] 最终,没有研究通过与胚胎的分子程序或胚胎的染色体组合相关联而确认成像参数。因此在若干方面缺少人类胚胎评估的方法并且可通过本方法改进,其包括时差显微术的新应用、图像分析和成像参数与分子谱和染色体组合的关联性。本发明解决这些问题。

[0013] 发明概述

[0014] 提供了用于确定一个或多个胚胎或一个或多个胚胎中的多潜能细胞或多潜能细胞的发育潜力的方法、组合物和试剂盒。这些方法、组合物和试剂盒在体外确定具有良好发育潜力即发育成为胚泡的能力 (ability) 或能力 (capacity) 的胚胎和卵母细胞中,其

因此在治疗人类中的不育症的方法以及类似方法中是有用的。

[0015] 在本发明的一些方面中,提供了用于确定胚胎或多潜能细胞的发育潜力的方法。在这些方面中,测量胚胎或多潜能细胞的一个或多个细胞参数以取得细胞参数测量结果。细胞参数之后被用于提供对所述胚胎或多潜能细胞的发育潜力的确定,所述确定可用于指导临床的行动方针。在一些实施方案中,细胞参数是通过时差显微术可测量的形态学事件。在一些实施方案中,例如,当胚胎被测定时,所述一个或多个细胞参数是:胞质分裂事件例如胞质分裂 1 的持续时间;胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔和胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔。在某些实施方案中,细胞周期 1 的持续时间也用作细胞参数。在一些实施方案中,细胞参数测量结果通过将其与来自参考胚胎的可比较的细胞参数测量结果相比较并且使用这一比较的结果来提供所述胚胎发育潜力的确定来使用。在一些实施方案中,胚胎是人类胚胎。在一些实施方案中,细胞参数是被测量以取得基因表达测量结果的基因表达水平。在一些实施方案中,基因表达测量结果通过将其与来自参考多潜能细胞或胚胎或来自其的一个或多个细胞的基因表达测量结果相比较来使用,其中这一比较的结果被用来提供所述多潜能细胞或胚胎的发育潜力的确定。在一些实施方案中,所述胚胎是人类胚胎。

[0016] 在本发明的一些方面中,提供用于将胚胎或多潜能细胞按照它们相对于组中其他胚胎或多潜能细胞的发育潜力分级的方法。在这些实施方案中,测量所述组中的所述胚胎或多潜能细胞的一个或多个细胞参数以取得所述胚胎或多潜能细胞的每一个的细胞参数测量结果。之后将所述细胞参数测量结果用于确定所述组中所述胚胎或多潜能细胞的每一个相对于彼此的发育潜力,所述确定可用于指导临床的行动方针。在一些实施方案中,细胞参数是通过时差显微术可测量的形态学事件。在一些实施方案中,例如当胚胎被分级时,一个或多个细胞参数是胞质分裂事件例如胞质分裂 1 的持续时间;胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔和胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔。在某些实施方案中,细胞周期 1 的持续时间也被测量。在一些实施方案中,细胞参数是一个或多个基因的表达水平。在一些实施方案中,一个或多个细胞参数测量结果通过将来自所述组中的所述胚胎或多潜能细胞中的每一个的所述细胞参数测量结果彼此比较以确定所述胚胎或多潜能细胞相对于彼此的发育潜力。在一些实施方案中,所述一个或多个细胞参数测量结果通过将每个细胞参数测量结果与来自参考胚胎或多潜能细胞的细胞参数测量结果相比较以确定来自每个胚胎或多潜能细胞的发育潜力并且将这些发育潜力相比较以确定所述胚胎或多潜能细胞相对于彼此的发育潜力来使用。

[0017] 在本发明的一些方面中,提供用于为辅助生殖 (IVF) 提供用于向雌性动物转移的具有良好发育潜力的胚胎的方法。在这些方面中,在对于胚胎发育来说充足的条件下培养一个或多个胚胎。之后在所述一个或多个胚胎中测量一个或多个细胞参数以取得细胞参数测量结果。之后将所述细胞参数测量结果用于提供所述一个或多个胚胎的发育潜力的确定。证实良好发育潜力的一个或多个胚胎之后被转移至雌性动物中。

[0018] 本申请还涉及以下方面:

[0019] 项 1. 一种确定人类胚胎或多潜能细胞的发育潜力的方法,其包括:

[0020] (a) 测量所述人类胚胎或多潜能细胞的一个或多个细胞参数以获得细胞参数测量结果;和

[0021] (b) 使用所述细胞参数测量结果以提供对所述胚胎或多潜能细胞的发育潜力的确定。

[0022] 项 2. 如项 1 所述的方法,其中所述细胞参数是可通过时差显微术测量的。

[0023] 项 3. 如项 2 所述的方法,其中测定胚胎的发育潜力并且所述一个或多个细胞参数选自下列所组成的组:

[0024] (i) 胞质分裂事件的持续时间;

[0025] (ii) 胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔;和

[0026] (iii) 胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔。

[0027] 项 4. 如项 3 所述的方法,其中所述人类胚胎的良好发育潜力由下列指示:

[0028] (i) 胞质分裂 1 的持续时间为约 0 分钟至约 30 分钟;

[0029] (ii) 胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的开始之间的时间间隔为约 8-15 小时;和 / 或

[0030] (iii) 胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的时间间隔为约 0-5 小时。

[0031] 项 5. 如项 4 所述的方法,其中所述测量步骤还包括测量细胞周期 1 的持续时间。

[0032] 项 6. 如项 5 所述的方法,其中所述人类胚胎的良好发育潜力由为约 20-27 小时的细胞周期 1 的持续时间指示。

[0033] 项 7. 如项 3 所述的方法,其中所述使用步骤包括将所述细胞参数测量结果与来自参照人类胚胎的细胞参数测量结果相比较并且使用所述比较的结果以提供所述人类胚胎的发育潜力的确定。

[0034] 项 8. 如项 7 所述的方法,其中所述人类胚胎的不良发育潜力由下列指示:

[0035] (a) 所述人类胚胎比所述参照人类胚胎更长的胞质分裂 1;

[0036] (b) 所述人类胚胎比所述参照人类胚胎更长或更短的胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的开始之间的时间间隔;和 / 或

[0037] (c) 所述人类胚胎比所述参照人类胚胎更长的胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的时间间隔。

[0038] 项 9. 如项 8 所述的方法,其中所述测量还包括测量细胞周期 1 的持续时间。

[0039] 项 10. 如项 9 所述的方法,其中所述人类胚胎的不良发育潜力由所述胚胎比所述参照人类胚胎更长的细胞周期 1 来指示。

[0040] 项 11. 如项 1 所述的方法,其中所述一个或多个细胞参数是测量以获得基因表达测量结果的基因表达水平。

[0041] 项 12. 如项 11 所述的方法,其中确定胚胎的所述发育潜力并且所述一个或多个基因选自下列组成的组: Cofilin、DIAPH1、ECT2、MYLC2/MYL5、DGCR8、Dicer/DICER1、TARBP2、CPEB1、Symplekin/SYMPK、YBX2、ZAR1、CTNNB1、DNMT3B、TERT、YY1、IFGR2/IFNGR2、BTF3 和 NELF。

[0042] 项 13. 如项 11 所述的方法,其中所述使用步骤包括将所述基因表达测量结果与来自参照胚胎或多潜能细胞的基因表达测量结果相比较并且使用所述比较的结果以提供所述人类胚胎或多潜能细胞的发育潜力的确定。

[0043] 项 14. 如项 13 所述的方法,其中确定胚胎的所述发育潜力并且相对于所述参照胚胎在所述胚胎中一个或多个选自下列组成的组的基因的较低表达水平指示不良发育潜

力 :Cofilin、DIAPH1、ECT2、MYLC2/MYL5、DGCR8、Dicer/DICER1、TARBP2、CPEB1、Symplekin/SYMPK、YBX2、ZAR1、CTNNB1、DNMT3B、TERT、YY1、IFGR2/IFNGR2、BTF3 和 NEF。

[0044] 项 15. 一种将人类胚胎或多潜能细胞相对于彼此分级的方法,其包括下列步骤:

[0045] (a) 测量每个人类胚胎或多潜能细胞的至少一个细胞参数以获得每个胚胎或多潜能细胞的细胞参数测量结果;和

[0046] (b) 使用来自所述胚胎或多潜能细胞中的每一个的所述至少一个细胞参数测量结果以将所述人类胚胎或多潜能细胞相对于彼此分级。

[0047] 项 16. 如项 15 所述的方法,其中所述至少一个细胞参数是可通过时差显微术测量的。

[0048] 项 17. 如项 16 所述的方法,其中胚胎被分级并且所述至少一个细胞参数选自由下列组成的组:

[0049] (i) 胞质分裂事件的持续时间;

[0050] (ii) 胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔;和

[0051] (iii) 胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔。

[0052] 项 18. 如项 17 所述的方法,其中所述测量步骤还包括测量细胞周期 1 的持续时间。

[0053] 项 19. 如项 1 所述的方法,其中所述一个或多个细胞参数是一个或多个基因的表达水平。

[0054] 项 20. 如项 19 所述的方法,其中所述一个或多个基因选自由下列组成的组: Cofilin、DIAPH1、ECT2、MYLC2/MYL5、DGCR8、Dicer/DICER1、TARBP2、CPEB1、Symplekin/SYMPK、YBX2、ZAR1、CTNNB1、DNMT3B、TERT、YY1、IFGR2/IFNGR2、BTF3 和 NELF。

[0055] 项 21. 如项 15 所述的方法,其中所述使用步骤通过将来自所述胚胎或多潜能细胞中的每一个的所述细胞参数测量结果彼此相比较以确定所述胚胎或多潜能细胞相对于彼此的发育潜力来实现。

[0056] 项 22. 如项 15 所述的方法,其中所述使用步骤通过下列来实现:将来自所述胚胎或多潜能细胞中的每一个的所述细胞参数测量结果与来自参照胚胎或多潜能细胞的细胞参数测量结果相比较以确定每个胚胎或多潜能细胞的发育潜力;以及将每个胚胎或多潜能细胞的发育潜力相比较以确定所述胚胎或多潜能细胞相对于彼此的发育潜力。

[0057] 项 23. 一种向雌性提供具有良好发育潜力的人类胚胎的方法,其包括下列步骤:

[0058] (a) 在足以进行胚胎发育的条件下培养一个或多个胚胎;

[0059] (b) 测量所述一个或多个胚胎中的一个或多个细胞参数以获得细胞参数测量结果;

[0060] (c) 使用所述细胞参数测量结果以提供所述一个或多个胚胎的发育潜力的确定;

[0061] (d) 将证实良好发育潜力的所述一个或多个胚胎转移至需要其的雌性中。

[0062] 项 24. 如项 23 所述的方法,其中所述胚胎通过卵母细胞的体外受精来产生。

[0063] 项 25. 如项 23 所述的方法,其中所述卵母细胞体外成熟。

[0064] 项 26. 如项 23 所述的方法,其中所述卵母细胞体内成熟。

[0065] 项 27. 如项 25 所述的方法,其中体外成熟的卵母细胞用生长因子补充。

[0066] 项 28. 一种用于将培养中的细胞自动成像的设备,其包括:

- [0067] (a) 放置在孵育器内部的多个显微镜；
- [0068] (b) 安排以聚焦在固定在台上的培养皿上的每个显微镜；
- [0069] (c) 具有用于照明所述培养皿中的细胞的光源的每个显微镜；
- [0070] (d) 具有成像照相机的每个显微镜；
- [0071] (e) 用于随时间储存来自一个或多个照相机的图像并且设置程序用于分析连续图像的计算机。
- [0072] 项 29. 如项 28 所述的设备,其中所述光源提供暗视野照明。
- [0073] 项 30. 如项 28 所述的设备,其中所述光源是红色或近红外的。
- [0074] 项 31. 一种用于细胞培养的设备,其包括：
- [0075] (a) 具有微孔的有盖培养皿；
- [0076] (b) 有具有光学品质光洁度的底表面的每个微孔；
- [0077] (c) 将微孔紧密安排在一起以致它们可共用一个培养基滴头。
- [0078] 项 32. 如项 31 所述的设备,其中外壁被设置在微孔周围以便容纳培养基滴头。
- [0079] 项 33. 如项 31 所述的设备,其中置信标记被放置在所述微孔附近。
- [0080] 项 34. 一种用于确定生长的胚胎细胞或干细胞的发育潜力的系统,其包括：
- [0081] (a) 显微镜；
- [0082] (b) 从所述显微镜获取图像的成像照相机；
- [0083] (c) 用于储存来自所述照相机的图像的计算机；
- [0084] (d) 用于产生细胞的模型以便测量下列中的至少一个的软件:(i) 胞质分裂的持续时间,(ii) 有丝分裂事件之间的时间。
- [0085] 项 35. 一种用于将培养基中可运动的分裂细胞用显微镜成像的自动方法,其中所述分裂细胞被采样为一系列具有像素的数码图像,其包括下列步骤：
- [0086] (a) 将像素的集合表示为所计算的形状；
- [0087] (b) 通过扰动所述所计算的形状的值来预测归因于细胞运动和分裂的所述像素的集合变化；
- [0088] (c) 从所预测的形状产生模拟的图像的集合；
- [0089] (d) 将所述模拟的图像与所述真实的图像比较；
- [0090] (e) 使用所述比较以确定所预测的形状的准确度。
- [0091] 项 36. 如项 35 所述的方法,其中所述图像模拟包括模拟一个或多个细胞膜的轮廓。
- [0092] 项 37. 如项 2 所述的方法,其中所述多潜能细胞是卵母细胞并且所述一个或多个细胞参数选自由下列组成的组：
- [0093] (i) 产生极体的胞质分裂事件的持续时间；和
- [0094] (ii) 减数分裂细胞周期之间的时间间隔。
- [0095] 附图简述
- [0096] 当结合所附附图阅读时,从下列详细描述最好地理解本发明。强调的是,根据惯例,附图的不同特征是不按比例。相反,为了清楚不同特征的直径是任意放大或缩小的。附图包括下列各图。
- [0097] 图 1 是显示用于评估胚胎的流程图。

[0098] 图 2 显示 6 天的时间段的细胞卵裂和分裂的一系列照片。图像被标明第 1 天至第 6 天。比例尺代表 $50 \mu\text{m}$ 。

[0099] 图 3 是显示从 1 细胞胚胎（合子）成功发育为胚泡的百分比的柱状图。4 个不同实验的过程中，通过时差显微术观察总共 100 个胚胎直到第 5 天或第 6 天。显示了达到每个标明的阶段（8 细胞、4 至 7 细胞、2 至 3 细胞和 1 细胞）的细胞的百分比。

[0100] 图 4 是为了标明的时期而关注的一系列三个不同的胚胎（顶部、中部和底部箭头）。

[0101] 图 5 是显示用于本评估的阶段之间的时差的图表，包括第一次胞质分裂的持续时间，第一次和第二次分裂之间的时间（测量为胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的开始之间的时间间隔）以及第二次和第三次有丝分裂之间的时间（测量为胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的时间间隔）。

[0102] 图 6 是显示一大组胚胎的三个事件的测量的 3-D 点图，包括第一次胞质分裂的持续时间，第一次和第二次细胞分裂之间的时间间隔（测量为胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的开始之间的时间间隔）以及第二次细胞和第三次细胞分裂之间的时间间隔（测量为胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的时间间隔）。达到胚泡阶段的胚胎（用圆环标记）显示在 3-D 图上聚集在一起，而在达到胚泡前停滞的胚胎（用 X 标记）分散各处。

[0103] 图 7 是显示用于使用 3 维形态学参数预测胚泡形成的接受者操作表征 (ROC) 曲线的图表。

[0104] 图 8 是显示来自 6 个停滞的 1 至 2 细胞胚胎和 5 个正常的 1 至 2 细胞胚胎的 52 个基因的表达水平的雷达图表。如通过曼 - 惠特尼检验所确定的，正常和不正常胚胎之间的表达水平上的差异对于以黄色加亮并且用星号指示的那些基因来说是统计学上显著的。

[0105] 图 9 是显示停滞的 2 细胞胚胎和正常的 2 细胞胚胎中不同基因的表达水平的柱状图。顶部显示停滞的 2 细胞胚胎的选择数量的时差图像。

[0106] 图 10 是显示图 9 中在停滞的 4 细胞胚胎和正常的 4 细胞胚胎中存在的相同基因的比较的柱状图。顶部显示停滞的 4 细胞胚胎的选择数量的时差图像。

[0107] 图 11 是显示具有 4 个不同模式的基因表达模式 (ESSP) 的一系列柱状图。标明的是胚胎基因活化（第 2 天）和第 3 天的典型表达之前的早期转移的时机。

[0108] 图 12a-b 显示来自不同阶段的单个卵裂球的基因的表达。a. 来自标绘在不同细胞时期的单个卵裂球的两个基因 CTNNB1 和 CDX2 的基因表达以及在不同阶段例如 2 细胞、3 细胞、桑椹胚和胚泡这些基因表达水平上的变化。b. 柱状的基因表达标记代表与来自合子程序的基因表达比较的母体程序中的基因表达。

[0109] 图 13 是用于使用时差图像分析和有关的分子分析测定胚胎成活力的模型的图。

[0110] 图 14 是显示体外卵母细胞成熟过程中发育的三个阶段的一系列照片。

[0111] 图 15A-F 是显示体外卵母细胞成熟后胚胎发育的过程的一系列照片。

[0112] 图 16 是显示用于测定卵母细胞的程序的流程图。

[0113] 图 17 是显示用于测定干细胞和多潜能干细胞的程序的流程图。

[0114] 图 18a-e 是显示诱导的多潜能干细胞分化为神经元玫瑰花状簇 (rosette) 的过程的一系列照片。

[0115] 图 19 是测定表达水平的基因可被分类的类别的表,包括每类别基因的数目。

[0116] 图 20 是在 141 个正常发育的胚胎和单个卵裂球的基因表达分析中确定的四个胚胎期特异模式 (ESSP) 和将所述基因分类至这些类别中的每一个的表。

[0117] 图 21a-e 显示证明成像参数预测胚泡形成的能力的自动图像分析。a 显示单个胚胎的跟踪算法的结果。b 显示被分析的一组 14 个胚胎。c 显示对胞质分裂的持续时间以及第一次和第二次有丝分裂之间的时间的手动图像分析与自动分析的比较。d 显示良好胚泡形态学和不良胚泡形态学的比较。

[0118] 图 22 是根据本发明的暗视野显微镜的概要图;左边的插图显示激光加工的暗视野片装置。

[0119] 图 23A-B 是如图 22 中所描述的三个显微镜的阵列的照片,装载在支架上以便安装在孵育器中并用与电脑连接。图 23A 显示显微镜而图 23B 显示显微镜内部孵育器。

[0120] 图 24 是在本操作中使用的图像捕获软件的屏幕截图,显示从 3 个通道成像的胚胎。

[0121] 图 25(a)-(d) 是显示来自实验 2,位置 2 的所选择的时差图像的一系列四张照片。图 25(a) 和 25(b) 是在培养基更换前捕获的图像而图 25(c) 和 25(d) 是在培养基更换后捕获的图像。

[0122] 图 26(a)-(d) (a) 和 (b) 是显示正常和不正常胚胎的细胞活性的图表(左)和照片(右)。图 26(a) 和 26(b) 一起显示在第 3 天胚胎具有相似的形态学但是它们的细胞活性曲线图却完全不同并且它们中仅一个发育为胚泡。

[0123] 图 27A-B 是具有微孔的定制有盖培养皿的图。图 27A 显示具有不同维数的培养皿的图而图 27B 显示微孔的 3-D 视图。

[0124] 图 28(a)-(b) 是显示具有和不具有前期图像配准的细胞活性的图表。图 28(a) 和 28(b) 一起显示配准净化了结果并且除去归因于胚胎移位或旋转的峰。

[0125] 图 29(a)-(b) 是显示正常和不正常胚胎的细胞活性的图表(左)和细胞照片(右)。图 29(a) 和图 29(b) 一起显示在第三天胚胎具有相似的形态学但是它们的细胞活性曲线图却完全不同并且它们中仅一个发育为胚泡。

[0126] 图 30 是显示胚胎发育期间连续成对图像之间的像素强度的差异的图表。这可被独立使用以测定胚胎成活力或作为通过确定应当使用多少粒子(预测的胚胎模型)改善其他算法例如粒子滤波器的方法。

[0127] 图 31A-G 是显示不同细胞阶段的来自 2D 跟踪的结果的一系列七张照片。细胞过程通过与每个照片对相关帧的帧序号标明:15 帧(图 31A)、45(B)、48(C)、189(D)、190(E)、196(F) 和 234(G)。底部箭头显示所覆盖的模拟图像。轮廓是可见的细胞膜而白色虚线是闭塞的膜。每 5 分钟捕获图像帧并且仅展示了一些。

[0128] 图 32A-B 是显示 3D 细胞跟踪的两个成功实例的一系列照片和图。在胚胎的每张照片下的说明显示 3D 模型的俯视图,除了帧 314 和帧 228,其分别在帧 314 和帧 228 中显示模型的侧视图。每 5 分钟捕获图像帧。

[0129] 图 33 是 1 细胞至 2 细胞分裂的粒子滤波器结果的图解表示。数据点是细胞中心的 3D 定位。点显示 1 细胞模型、2 细胞模型、3 细胞模型和 4 细胞模型。顶部箭头显示预测之后的粒子而底部箭头显示重采样之后的粒子。

[0130] 图 34A-B 是显示对一组 14 个胚胎的自动与手动分析的对比的图表。图 34A 显示第一次胞质分裂的持续时间的对比而图 34B 显示第一次和第二次有丝分裂之间的时间的对比。

[0131] 图 35 是显示图像分析如何被用于模型胚胎并且测量某些形态学参数的流程图。

[0132] 发明详述

[0133] 在描述本方法和组合物之前,应当理解的是,本发明不限于所描述的具体方法和组合物,因为这些当然可以变化。还应当理解的是,在本文使用的术语仅用于描述特定实施方案的目的,而不意为限制性的,因为本发明的范围将仅由所附的权利要求限定

[0134] 当提供数值的范围时,应当理解的是,在所述范围的上限和下限之间的每个中间值(自到所述下限的单位的十分之一,除上下文以其他方式明确地说明以外)也被特别地公开。在指定的范围内的任何指定的值或中间值与在该指定的范围内任何其它指定的值或中间值之间的每个更小的范围包含于本发明的范围内。这些更小的范围的上限和下限可以独立地包括或排除在所述更小的范围之内,任一、无一或两个限值包括在所述更小的范围之内时的每个范围也包含本发明的范围内,并受在所指定的范围内特别排除任何值的限制。当指定的范围包括两个限值之一或两者时,排除了所包括的限值之一或两者的范围也包括在本发明的范围之内。

[0135] 除另外定义以外,本文使用的所有技术术语和科学术语与本发明所属技术领域普通技术人员通常所理解的含义相同。尽管类似于或等同于在本文描述的那些的任何方法和材料可以用于本发明的实践或试验,但现在描述了一些可能的和优选的方法和材料。在本文中提及的所有出版物通过引用并入本文以公开和描述与所述出版物所引用的相关的方法和/或材料。应当理解的是,当存在矛盾时,本公开内容替代所并入的出版物的任何公开。

[0136] 必须注意的是,如在本文和在附随的权利要求中使用的,除上下文中以其他方式明确说明以外,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”,包括复数的指称对象。因此,例如,提及“一个细胞”包括多个这样的细胞,提及“该肽”包括提及一种或多种肽和本领域技术人员已知的其等价物,例如多肽,等等。

[0137] 本文讨论的出版物仅为了其在本申请提交日之前的公开而提供。此处不应解释为承认本发明没有权利凭借在先发明而先于上述出版物。此外,所提供的出版物的日期可能不同于实际的出版日期,其可能需要被各自确认。

[0138] 定义

[0139] 提供了用于确定一个或多个胚胎或多潜能细胞的发育潜力和/或一个或多个胚胎或多潜能细胞中染色体异常的存在的方法、组合物和试剂盒。这些方法、组合物和试剂盒在体外确定在治疗人类中的不育症中最有用的胚胎和卵母细胞中。本发明的这些和其他的对象、优点和特征对本领域那些技术人员来说在阅读如下文更加全面地描述的主题方法和组合物的细节时变得显而易见。

[0140] 术语“发育潜力”和“发育感受态”被用于本文意指健康胚胎或多潜能细胞生长或发育的能力(ability)或能力(capacity)。

[0141] 术语“胚胎”本文被用于意指当两个单倍体配子细胞例如未受精的次级卵母细胞和精子结合以形成二倍体全能细胞例如合子时形成的合子和由紧接随后的直到桑椹胚即

16 细胞阶段和胚泡阶段的细胞分裂例如胚胎卵裂（分化的滋养外胚层和内细胞团）产生的胚胎两者。

[0142] 术语“多潜能细胞”本文被用于意指具有分化为生物体中多种类型的细胞的能力的任何细胞。多潜能细胞的实例包括干细胞卵母细胞和 1 细胞胚胎（即合子）。

[0143] 术语“干细胞”本文被用于意指细胞或细胞群，其：(a) 具有自我更新的能力和 (b) 具有产生不同的分化的细胞类型的潜力。通常，干细胞具有产生多重谱系的细胞的潜力。如本文所用的，干细胞可以是全能干细胞，例如受精的卵母细胞，其产生生物体的所有的胚胎和胚外组织；多潜能干细胞，例如胚胎干 (ES) 细胞，胚胎胚 (EG) 细胞或诱导的多潜能干 (iPS) 细胞，其产生生物体的所有胚胎组织，即内胚层、中胚层和外胚层谱系；多能干细胞，例如间质干细胞，其产生生物体的胚胎组织中的至少两种，即，内胚层、中胚层和外胚层谱系中的至少两种或其可以是组织特异性干细胞，其产生特定组织的多种类型的分化细胞。组织特异性干细胞包括产生特定组织的细胞的组织特异性胚胎细胞和位于成年组织中并且可产生这一组织的细胞的体干细胞，例如产生中枢神经系统的所有细胞的神经干细胞、产生骨骼肌的卫星细胞和产生造血系统的所有细胞的造血干细胞。

[0144] 术语“卵母细胞”本文被用于意指未受精的雌性卵母细胞或配子。本申请的卵母细胞可以是初级卵母细胞，在这种情况下它们被放置通过或正在通过减数分裂 I，或次级卵母细胞，在这种情况下它们被放置通过或正在通过减数分裂 II。

[0145] “减数分裂”意指导致配子产生的细胞周期事件。在第一次减数分裂细胞周期或减数分裂 I 中，细胞的染色体被复制并且分至两个子细胞中。之后这些子细胞在并未伴随 DNA 合成的第二次减数分裂细胞周期或减数分裂 II 中分离，产生具有单倍体数的染色体的配子。

[0146] “生发泡”阶段意指与减数分裂 I 细胞周期的前期 I 有关的初级卵母细胞的成熟的阶段，即在核质的第一次分裂之前。这一时期的卵母细胞也称为“生发泡卵母细胞”，因为特有地巨大细胞核，称为生发泡。在体外培养的正常的人类卵母细胞中，生发泡在成熟开始后约 6-24 小时发生。

[0147] “中期 I”阶段意指与减数分裂 I 细胞周期的中期 I 有关的初级卵母细胞的成熟的阶段。与生发泡卵母细胞相比，中期 I 卵母细胞没有大的，清楚界定的细胞核。在体外培养的正常的人类卵母细胞中，中期 I 在成熟开始后约 12-36 小时发生。

[0148] “中期 II”阶段意指与减数分裂 II 细胞周期的中期 II 有关的次级卵母细胞的成熟的阶段。中期 II 是可通过第一极体的排出辨别的。在体外培养的正常的人类卵母细胞中，中期 II 在成熟开始后约 24-48 小时发生。

[0149] “有丝分裂细胞周期”意指细胞中导致细胞的染色体的复制以及将这些染色体和细胞的细胞质分至两个子细胞中的事件。有丝分裂细胞周期分为两个时期：分裂间期和有丝分裂。在分裂间期，细胞生长并且复制其 DNA。在有丝分裂中，细胞起始并且完成细胞分裂，首先分隔其核质并且之后将其胞质和其分隔的核质（胞质分裂）分到两个分离的细胞中。

[0150] “第一次有丝分裂细胞周期”或“细胞周期 1”意指从受精至第一次胞质分裂事件即受精的卵母细胞分裂为两个子细胞的时间间隔。在卵母细胞被体外受精的实例中，注射人绒毛膜促性腺激素 (HCG)（通常在卵母细胞提取前施用）至第一次胞质分裂时间完成之

间的时间间隔可用作替代的时间间隔。

[0151] “第二次有丝分裂细胞周期”或“细胞周期 2”意指在胚胎中观察到的第二次细胞周期事件,通过有丝分裂从受精的卵母细胞产生子细胞和通过有丝分裂从这些子细胞中的一个(“前导子细胞”或子细胞 A)的产生第一组第三代细胞(granddaughter cell)之间的时间间隔,当完成细胞周期 2 时,胚胎由 3 个细胞组成。换句话说,细胞周期 2 可以直观地确定为包含 2 细胞的胚胎和包含 3 细胞的胚胎之间的时间。

[0152] “第三次有丝分裂细胞周期”或“细胞周期 3”意指在胚胎中观察到的第三次细胞周期事件,通常是通过有丝分裂从受精的卵母细胞产生子细胞至通过有丝分裂从第二子细胞中的一个(“延迟子细胞”或子细胞 B)产生第二组第三代细胞时间间隔,当完成细胞周期 3 时,胚胎由 4 个细胞组成。换句话说,细胞周期 3 可以直观地确定为包含 3 细胞的胚胎和包含 4 细胞的胚胎之间的时间。

[0153] “第一次卵裂事件”意指第一次分裂,即,卵母细胞分裂为两个子细胞,即细胞周期 1。当第一次卵裂事件完成时,胚胎由 2 细胞组成。

[0154] “第二次卵裂事件”意指第二组分裂,即,前导子细胞分裂为两个第三代子细胞和延迟子细胞分裂为两个第三代子细胞。换句话说,第二次卵裂事件由细胞周期 2 和细胞周期 3 两者组成。当第二次卵裂事件完成时,胚胎由 4 细胞组成。

[0155] “第三次卵裂事件”意指第三组分裂,即,所有第三代子细胞的分裂。当第三次卵裂事件完成时,胚胎由 8 细胞组成。

[0156] “胞质分裂”或“细胞分裂”意指细胞经历细胞分裂的有丝分裂的时期。换句话说,其是细胞的分隔的核质和其胞质被分开以产生两个子细胞的有丝分裂的阶段。胞质分裂的时间段可被确定为当细胞膜的收缩(“卵裂沟”)被首次观察到时和这一收缩事件的结束即两个子细胞产生之间的时间段或窗口。卵裂沟的起始可以直观地确定为细胞膜的曲率从凸的(向外的圆形的)变为凹的(向里弯曲具有凹痕或凹入)的点。这通过点在 2 个卵裂沟处的白色箭头描述于图 4 顶部组。细胞延长的起始同样可用于标记胞质分裂的起始,在这种情况下胞质分裂的时间段被定义为细胞延长的起始和细胞分裂的结束之间的时间段。

[0157] “第一次胞质分裂”或“胞质分裂 1”意指受精之后的第一次细胞分裂事件,即受精的卵母细胞分裂以产生两个子细胞。第一次细胞分裂通常发生在受精后一天。

[0158] “第二次胞质分裂”或“胞质分裂 2”意指在胚胎中观察到的第二次细胞分裂事件,即受精的卵母细胞分裂的一个子细胞(“前导子细胞”或子代 A)分裂为第一组两个第三代。

[0159] “第三次胞质分裂”或“胞质分裂 3”意指在胚胎中观察到的第三次细胞分裂事件,即受精的卵母细胞分裂的另一个子细胞(“延迟子细胞”或子代 B)分裂为第二组两个第三代。

[0160] 术语“基信标记(fiduciary marker)”或“基准标记”在成像系统的视野领域中使用的物品,其出现在所产生的图像中,被用作参考的点或度量。其可以是被放置在成像对象中或之上的某物或在光学仪器的十字线中的一个或一组标记物。

[0161] 术语“微孔”是指细胞水平大小的容器,优选地提供用于接纳单个真核细胞。

[0162] 感兴趣的多潜能细胞和胚胎

[0163] 在本发明的方法中,通过测量一个或多个胚胎或多潜能细胞的一个或多个细胞参数并将这些测量用于确定所述胚胎或多潜能细胞的发育潜力来测定所述胚胎或多潜能细

胞的发育潜力。由此产生的信息可被用于指导临床决策,例如是否转移受精的胚胎,是否植入培养的一个或多个细胞。

[0164] 可通过本发明的方法测定的胚胎的实例包括 1 细胞胚胎(也称为合子)、2 细胞胚胎、3 细胞胚胎、4 细胞胚胎、5 细胞胚胎、6 细胞胚胎、8 细胞胚胎等等,通常高达 16 细胞胚胎并且包括 16 细胞胚胎,其中的任一种可通过任何方便的方式从例如已经体内成熟的卵母细胞或已经体外成熟的卵母细胞产生。

[0165] 可通过本发明的方法测定的多潜能细胞的实例包括全能干细胞例如卵母细胞诸如初级卵母细胞和次级卵母细胞;多潜能干细胞例如 ES 细胞、EG 细胞、iPS 细胞和类似细胞;多能细胞,例如间质干细胞和组织特异性干细胞。它们可以来自生命的任何阶段,例如胚胎的、新生期的、少年的、成年的和任何性别,即 XX 或 XY。

[0166] 胚胎和多潜能细胞可来源于任何生物体,例如任何哺乳细胞种类例如人类、灵长类动物、马科动物、牛科动物、猪科动物、犬科动物、猫科动物等。优选地,它们来源于人类。它们可以是之前被冷冻的,例如,1 细胞阶段的冷冻保存并且之后解冻的胚胎或冷冻并解冻的卵母细胞和干细胞。可选择地,它们可以是新鲜制备的,例如,通过体外受精技术从卵母细胞新鲜制备的胚胎;通过体外成熟技术新鲜采集和/或新鲜成熟或者来源于体外分化为生殖细胞并且成熟为卵母细胞的多潜能干细胞的卵母细胞;通过本领域已知的方法从组织的解离和培养新鲜制备的干细胞以及类似细胞。它们可在本领域中已知的任何适合的条件培养以促进有待被测定的样品的存活、生长和/或发育,例如对于胚胎,在例如体外受精领域中所用的那些的条件下;参见例如美国专利第 6,610,543 号、美国专利第 6,130,086 号、美国专利第 5,837,543 号,其公开内容通过引用并入本文;对于卵母细胞,在例如本领域中所用的以促进卵母细胞成熟的那些的条件下;参见例如美国专利第 5,882,928 号和美国专利第 6,281,013 号,其公开内容通过引用并入本文;对于干细胞,在例如本领域中所用的以促进增殖的那些的条件下;参见例如美国专利第 6,777,233 号、美国专利第 7037892 号、美国专利第 7,029,913 号、美国专利第 5,843,780 号和美国专利第 6,200,806 号、美国专利申请第 2009/0047263 号、美国专利申请第 2009/0068742 号,其公开内容通过引用并入本文。通常,胚胎/多潜能细胞在配合所测定的特定胚胎/多潜能细胞的需要已经补充了血清或血清物质、氨基酸和生长因子的商业上可得的培养基例如 KnockOut DMEM、DMEM-F12 或 Iscoves 改良杜尔贝可培养基中培养。

[0167] 时差成像分析

[0168] 在一些实施方案中,胚胎/多潜能细胞通过经由时差成像测量细胞参数来测定。胚胎/多潜能细胞可在标准培养皿中培养。可选择地胚胎/多潜能细胞可在定制培养皿例如具有如本文描述的光学品质的微孔的定制培养皿中培养。在这些定制培养皿中,每个微孔装有一个单个的胚胎/多潜能细胞并且每个微孔的底部表面具有光学品质光洁度以致单个皿中的整组胚胎可通过具有足够分辨率的单个小型显微镜同时成像以跟随细胞有丝分裂过程。整组的微孔共享培养皿中同一个培养基滴头(drop)并且还可包括放置在微孔周围的用于稳定培养基滴头的外部孔以及邻近微孔放置的基准标记物。可用等离子刻蚀或另一种处理调整表面的疏水性以防止用培养基充满时微孔中形成气泡。无论使用标准培养皿还是定制培养皿,培养期间,可在同一培养基中培养一个或多个发育的胚胎,例如每皿可培养 1 个至 30 个之间的胚胎。

[0169] 随时间获取图像并且之后分析图像以取得一个或多个细胞参数的测量。可用装配用于数字图像存储和分析的任何计算机控制的显微镜例如装配加热台和培养箱的倒置显微镜或适于常规孵育器内部的定制微型显微镜阵列进行时差成像。微型显微镜的阵列使得在同一孵育器中的多个皿的样品能够同时培养并且大小可调节以适应多个通道而对连续图像捕获之间的最小时间间隔没有限制。使用多个显微镜消除了移动样品的需要,其增加了系统准确度和整个系统的可靠性。孵育器中的单个显微镜可以是部分或全部分离的,为每个培养皿提供自身的控制的环境。这允许皿被转移至成像位置或从成像位置转移而不影响其他样品的环境。

[0170] 用于时差成像的成像系统可使用亮视野照明、暗视野照明、相位对比、霍夫曼调制相衬 (Hoffman modulation contrast)、微差干涉对比或荧光。在一些实施方案中,暗视野照明可被用来为随后的特征提取和图像分析提供增强的图像对比。此外,红色或近红外光源可被用来减少光毒性并且提高细胞膜和细胞的内部部分之间的对比度。

[0171] 所获取的图像可在连续基底上储存在活动视频中或在间断基底上(如在时差照相术中),其中对象被反复成像在静止的照片上。优选地,图像之间的时间间隔应在 1 至 30 分钟之间以便捕获如下文所描述的重要的形态学事件。在可选择的实施方案中,图像之间的时间间隔可取决于细胞活性的量而变化。例如,在活性期间,可以每几秒或每分钟这么频繁地获取图像,而在非活性期间,可以每 10 或 15 分钟或更久地获取图像。对所捕获的图像的实时图像分析可被用于检测什么时候和如何变化时间间隔。在我们的方法中,样品接收的光的总量估计等于 5 天成像大约 24 分钟的连续低水平曝光。用于时差成像系统的光强度比通常用于辅助生殖显微镜的光强度低得多,归因于 LED 的低功率(例如使用相比于通常 100W 卤素灯泡的 1W LED)和照相机传感器的高敏感度。因此,使用时差成像系统由胚胎接收到的光能量的总量能够与 IVF 临床的常规操作期间接收到的能量的量差不多或更少。此外,曝光时间可显著缩短以减少对胚胎/多潜能细胞的曝光的总量。对于 2 天的成像,在每 5 分钟以 0.5 秒曝光/图像捕获图像的情况下,低水平曝光的总量小于 5 分钟。

[0172] 图像采集之后,提取并分析图像的不同细胞参数例如大小,透明带的厚度、破碎的程度,从细胞分裂产生的子细胞的对称性、前几次有丝分裂之间的时间间隔和胞质分裂的持续时间。

[0173] 可通过时差成像测量的细胞参数通常是形态学事件。例如,在测定胚胎时,时差成像可被用于测量胞质分裂事件例如胞质分裂 1、胞质分裂 2、胞质分裂 3、胞质分裂 4 的持续时间,其中胞质分裂事件的持续时间定义为首次观察到卵裂沟(胞质分裂的起始)和卵裂沟分离为两个子细胞(即两个子细胞的产生)之间的时间间隔。感兴趣的另一个参数是细胞周期事件例如细胞周期 1、细胞周期 2、细胞周期 3 或细胞周期 4 的持续时间,其中细胞周期事件的持续时间被定义为一个细胞(对于细胞周期 1 来说,卵子的受精;对于之后的细胞周期来说,在胞质分裂结束时)的产生和来自这一细胞的两个子细胞的产生之间的时间间隔。可通过时差成像测量的感兴趣的其他细胞参数包括由这些细胞事件定义的时间间隔,例如 (a) 胞质分裂 1 和胞质分裂 2 之间的时间间隔,可定义为胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的起始之间的间隔、胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的结束之间的间隔、胞质分裂 1 的起始和胞质分裂 2 的结束之间的间隔或胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的起始之间的间隔的任一个;或者 (b) 胞质分裂 2 和胞质分裂 3 之间的时间间隔,可定义为胞质分裂 2 的起始

和胞质分裂 3 的起始之间的间隔、或胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的结束之间的间隔、或胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的结束之间的间隔或胞质分裂 2 的结束和胞质分裂 3 的起始之间的间隔的任一个。

[0174] 为了体外受精的目的,被认为是有利的发育中早期例如第 2 天或第 3 天即直到 8 细胞阶段将胚胎转移至子宫以减少胚胎损失(归因于培养条件相对于体外环境的缺点)并减少与可在培养期间发生的后生错误有关的可能的不良后果(Katari 等人(2009)Hum Mol Genet. 18(20):3769-78;Sepúlveda 等人(2009)Fertil Steril. 91(5):1765-70)。因此,优选的是,尽管分析的时间较长,例如约 36 小时、约 54 小时、约 60 小时、约 72 小时、约 84 小时、约 96 小时或更长,本方法同样预期在受精的 2 天中发生的细胞参数的测量。

[0175] 可通过时差成像测定的正在成熟的卵母细胞的细胞参数的实例包括但不限于卵母细胞细胞膜的形态学上的变化,例如从透明带分离的速度和程度;卵母细胞细胞核的形态学上的变化,例如胚泡破裂(GVBD)的起始、完成和速度;细胞质和细胞核中颗粒的运动速度和方向;卵母细胞和第一极体的胞质分裂以及第一极体的排出的运动和/或持续时间。其他的参数包括成熟次级卵母细胞和第二极体的胞质分裂的持续时间。

[0176] 可通过时差成像测定的干细胞或干细胞群中的细胞参数的实例包括但不限于胞质分裂事件的持续时间,胞质分裂事件之间的时间,胞质分裂事件之前和过程中干细胞的大小和形状、由胞质分裂事件产生的子细胞的数目、卵裂沟的空间定向、所观察到的非对称分裂的速度和/或数目(即其中一个子细胞保持干细胞而其他的分化)、所观察到的对称分裂的速度和/或数目(即其中两个子细胞都保持干细胞或都分化)以及胞质分裂事件的结束和当干细胞开始分化之间的时间间隔。

[0177] 参数可手动测量或者它们可被自动测量,例如通过图像分析软件。当使用图像分析软件时,可以使用利用以序贯蒙特卡罗方法为基础的随机模型估算技术的图像分析算法,例如产生假定的胚胎/多潜能细胞模型的分布,以简单的光学模型为基础模拟图像并将这些模拟与观察到的图像数据比较。当使用这样的随机模型估算时,细胞可以被建模为任何适合的形状,例如 2D 空间中的椭圆的集合,3D 空间中的椭圆体的集合以及类似形状。为了处理遮挡和深度不确定性,方法可实行相应于所期望的实体行为的几何约束。为了提高鲁棒性,可在一个或多个焦平面上捕获图像。

[0178] 基因表达分析

[0179] 在一些实施方案中,通过测量基因表达测定胚胎或多潜能细胞。在这些实施方案中,细胞参数是基因表达水平或基因表达谱。测定一个或多个基因的表达,即获得表达谱或表达评估,可通过测量感兴趣的一个或多个基因的核酸转录物(例如 mRNA)例如核酸表达谱进行;或通过测量为感兴趣的一个或多个基因的表达产物的一个或多个不同蛋白/多肽的水平即蛋白组表达谱来进行。换句话说,术语“表达谱”和“表达评估”被宽泛使用以包括 RNA 水平或蛋白水平的基因表达谱。

[0180] 在一些实施方案中,基因的表达可通过获得核酸表达谱来估计,其中确定样品中的一种或多种核酸的量或水平,例如感兴趣的一种或多种基因的核酸转录物。在这些实施方案中,被测定以产生表达谱的样品是核酸样品。核酸样品包括多个或一群不同核酸,其包括正被评估的胚胎或细胞的感兴趣的基因的表达信息。核酸可包括 RNA 或 DNA 核酸,例如 mRNA、cRNA、cDNA 等,只要样品保留其所获得自的宿主细胞或组织的表达信息。样品可以许

多不同方式制备,如本领域中已知的,例如通过从细胞分离 mRNA,其中所分离的 mRNA 如在差异表达领域中已知的被用来扩增、使用以制备 cDNA、cRNA 等。使用标准程序,样品可从单个细胞制备,例如感兴趣的多潜能细胞的培养基的多潜能细胞或来自感兴趣的胚胎的单个细胞(卵裂球);或来自几个细胞,例如多潜能细胞的培养基的一部分或感兴趣的胚胎的 2、3、或 4 或者更多个卵裂球。

[0181] 表达谱可使用任何常规程序从初始核酸样品产生。当产生表达谱的多种不同方式是已知的,例如在差异基因表达分析的领域中使用的那些时,用于产生表达谱的一个代表性且适宜性类型的程序是以阵列基础的基因表达谱产生程序。这些应用是杂交测定,其中使用在有待被产生的谱中展示用于有待被测定或进行谱分析的基因中的每一种的“探针”核酸的核酸。在这些测定中,首先从正在测定的初始核酸样品制备靶核酸的一个样品,其中,制备可包括用标记物例如信号表达系统的一员来标记靶核酸。靶核酸样品制备之后,将样品在杂交条件下与阵列接触,由此在与连接至阵列表面的探针序列互补的靶核酸之间形成复合物。之后定性或者定量地检测杂交复合物的存在。

[0182] 可实行以产生在主题方法中使用的表达谱的特异杂交技术包括描述于美国专利第 5,143,854 ;5,288,644 ;5,324,633 ;5,432,049 ;5,470,710 ;5,492,806 ;5,503,980 ;5,510,270 ;5,525,464 ;5,547,839 ;5,580,732 ;5,661,028 ;5,800,992 号,其公开内容通过引用并入本文;以及 W095/21265 ;W096/31622 ;W097/10365 ;W097/27317 ;EP 373 203 和 EP 785 280 中的技术。在这些方法中,如上文描述的将包括用于其表达正被测定的表型决定基因中的每一种的探针的“探针”核酸的阵列与靶核酸接触。在杂交条件例如严格杂交条件下进行接触,并且之后除去未结合的核酸。如本文所用的,术语“严格测定条件”是指适于产生具有足够互补性以在测定中提供所期望的特异性水平的核酸例如表面结合的和溶液相核酸的结合对而较不适于形成具有不足以提供所期望的特异性的互补性的结合成员之间的结合对的条件。严格互补条件是杂交和清洗条件的总和或组合(全体)。

[0183] 所得到的杂交的核酸的模式提供关于已经被探针探测的基因中的每一种的表达信息,其中表达信息是以基因是否表达以及典型地什么水平表达的方式,其中表达信息,即表达谱(例如以转录组(transcriptosome)形式),都可以是定性和定量的。

[0184] 可选择地,可使用用于将样品中的一个或多个核酸的水平定量的非阵列基础的方法,包括以扩增程序为基础的那些例如聚合酶链式反应(PCR)基础的测定,包括定量 PCR、逆转录 PCR(RT-PCR)、实时 PCR 和类似方法。

[0185] 在一些实施方案中,基因的表达可通过获得蛋白组表达谱来评估,其中确定样品中的一种或多种蛋白/多肽的量或水平,例如由感兴趣的基因编码的蛋白/多肽。在这些实施方案中,被测定以产生所述方法中使用的表达谱的样品是蛋白样品。当表达谱是蛋白组表达谱,即样品中一种或多种蛋白水平的谱时,可使用用于评估蛋白水平的任何常规程序,其中确定所测定的样品中的一种或多种蛋白的水平。

[0186] 尽管用于蛋白水平的多种不同方式的测定是本领域中已知的,但用于测定蛋白水平的一种代表性且适宜性类型的方案是 ELISA。在 ELISA 和以 ELISA 基础的测定中,对于感兴趣的蛋白来说特异性的一种或多种抗体可被固定在所选择的固体表面上,优选地展示蛋白亲和性的表面例如聚苯乙烯微量滴定板的孔。清洗以除去不完全吸附的材料之后,将测定板孔用于测试样品例如牛血清白蛋白(BSA)、酪蛋白或奶粉溶液来说已知抗原中性

的非特异性“封闭”蛋白包被。这允许封闭固定表面上的非特异性吸附位点,由此减少由所述表面上抗原的非特异性结合导致的背景。清洗以除去未结合封闭的封闭蛋白之后,将固定的表面与有待被测试的样品在有助于免疫复合物(抗原/抗体)形成的条件下接触。这些条件包括同样有助于帮助减少非特异性背景的用稀释液例如溶于盐酸缓冲盐水(PBS)/吐温或 PBS/Triton-X100 中的 BSA 或牛血清丙种球蛋白(BGG) 稀释样品和允许样品在约 25°C -27°C 的温度(尽管也可使用其他温度) 孵育约 2-4 小时。孵育后,清洗抗血清接触的表面以便除去非免疫复合的材料。示例性的清洗程序包括用溶液例如 PBS/ 吐温、PBS/Triton-X100 或硼酸盐缓冲液清洗。免疫复合物形成的出现和量然后可通过使结合的免疫复合物经历对与第一抗体不同的靶具有特异性的第二抗体并且检测第二抗体的结合来确定。在某些实施方案中,第二抗体具有所结合的酶,例如尿素酶、过氧化物酶或碱性磷酸化酶,其将在与适当的显色底物孵育时产生有色沉淀。例如,可使用尿素酶或过氧化物酶结合的抗人类 IgG 一段时间并且在有利于免疫复合物形成的发展的条件下(例如在含有 PBS 的溶液例如 PBS/ 吐温中于室温孵育 2 小时)。这样用第二抗体孵育并且清洗以除去未结合的材料之后,将标记的量定量,例如通过在尿素酶标记的实例中用显色底物例如尿素和溴甲酚紫或在过氧化物酶标记物的实例中用 2, 2' - 联氮 - 双 - (3- 乙基 - 苯并噻唑啉) - 6- 磺酸 (ABTS) 和 H₂O₂ 孵育。之后通过测量颜色生成的程度例如使用可见光谱分光光度计获得定量。

[0187] 之前的格式可通过首先将样品与测定板结合来改变。之后将初级抗体与测定板孵育,之后使用对初级抗体具有特异性的标记的次级抗体检测结合的初级抗体。

[0188] 一种或多种抗体固定于其上的固体基质可由许多种材料制成并且为许多种形状例如微量滴定板、微珠、测验片、树脂颗粒等。可以选择基质以最大化信噪比,从而最小化背景结合以及便于分离和包被。可以适合所使用的基质的方式实施清洗,例如通过将微珠或测验片从储器除去,将储器例如微量滴定板孔清空或稀释或者用清洗溶液或溶剂漂洗珠、颗粒、层析柱或滤器。

[0189] 可选择地,可使用用于测量样品中一种或多种蛋白的水平的方法以非 ELISA 基础的方法。代表性的实例包括但不限于质谱、蛋白组阵列、xMAPTM 微球技术、流式细胞计、蛋白质印迹和免疫组织化学。

[0190] 所得到的结果提供了与已经被探针探测的基因中的每一种的表达有关的信息,其中表达信息以基因是否表达以及通常以什么水平表达的方式并且其中表达数据可以是定性并且定量的。

[0191] 在产生表达谱时,在一些实施方案中,测定样品以产生包括至少一个基因/蛋白、有时多个基因/蛋白的表达数据的表达谱,其中复数意指至少两种不同的基因/蛋白以及经常至少约 3 种,通常至少约 10 种或更多,常常至少约 15 种不同的基因/蛋白或更多,例如 50 种或更多或者 100 种或更多等。

[0192] 在最广泛的意义上,表达评估可以是定性或者定量的。像这样,当检测是定性的时,所述方法提供读数或评价,例如评估靶分析物例如核酸或表达产物是否存在于被测定的样品中。在还有另外的实施方案中,所述方法提供了靶分析物是否存在于被评估的样品中的定量检测,即估计或评估靶分析物例如被测定的样品中的核酸或蛋白的真实量或相对丰度。在这些实施方案中,定量检测可以是绝对的或如果所述方法是检测样品中的两种或

更多种不同分析物例如核酸或蛋白的方法时是相对的。像这样,术语“定量”用于定量样品中的靶分析物例如一种或多种核酸或蛋白的上下文时,可指绝对或相对定量。绝对定量可通过包含已知浓度的一种或多种对照分析物并且用已知的对照分析物(例如通过产生标准曲线)参照即标准化靶分析物的检测水平来完成。可选择地,可通过将两种或更多种不同的靶分析物之间的检测水平或量比较以提供两种或更多种不同分析物中的每一种的相对定量例如相对于彼此来完成相对定量。

[0193] 表达水平预测合子发育潜力的基因的实例包括 Cofillin(NM_005507), DIAPH1(NM_001079812、NM_005219), ECT2(NM_018098), MYLC2/MYL5(NM_002477), DGCR8(NM_022720), Dicer/DICER1(NM_030621、NM_177438), TARBP2(NM_004178、NM_134323、NM_134324), CPEB1(NM_001079533, NM_001079534、NM_001079535、NM_030594), Symplekin/SYMPK(NM_004819), YBX2(NM_015982), ZAR1(NM_175619), CTNNB1(NM_001098209、NM_001098210、NM_001098210、NM_001904), DNMT3B(NM_006892、NM_175848、NM_175849、NM_175850), TERT(NM_198253、NM_198255), YY1(NM_003403), IFGR2/IFNGR2(NM_005534), BTF3(NM_001037637、NM_001207), 和 NELF(NM_001130969、NM_001130970、NM_001130971、NM_015537)。表达水平可作为预测胚胎发育潜力的细胞参数的其他基因提供于图 8 中。获得基因表达水平测量时,基因水平常常被评估并且之后对标准对照例如已知在整个发育中恒定的基因例如 GAPDH 或 RPLPO 或者在这一时间点其表达已知的基因的样品中的表达水平进行标准化。

[0194] 基因表达水平可从单个细胞、例如来自感兴趣的胚胎的分裂球或分离的卵母细胞或来自干细胞的培养基的分离的细胞等确定,或者它们可以从胚胎例如感兴趣的胚胎的 2、3 或 4 或更多个卵裂球直到并且包括感兴趣的整个胚胎、或者来自干细胞的培养基的多个细胞直到并且包括干细胞的整个培养基等确定。

[0195] 在其他的方面,本发明包括用于在单个细胞上进行同时的基因分型和基因表达分析的程序。对于胚胎,这可用于改善着床前胚胎遗传学诊断(PGD),一种将单个细胞从胚胎除去并且检测其 DNA 的染色体组型缺陷或者特定疾病基因的存在的过程。我们的方法允许同时的遗传和基因表达分析。所述方法包括下列步骤:(1) 将单个细胞收集到小体积的培养基或缓冲液中,(2) 使用基因分型和基因表达分析引物的混合物进行一步逆转录和聚合酶链式反应(PCR)扩增,(3) 小于 18 个循环的 PCR 之后收集等份的扩增的 cDNA 以维持扩增的线性,(4) 使用 cDNA 等份用标准技术例如定量实时 PCR 进行基因表达分析,(5) 使用剩余的样品进行第二轮 PCR 以为了基因分型的目的进一步扩增遗传信息和(6) 使用标准技术例如凝胶电泳进行基因分型。

[0196] 从图像和 / 或基因表达分析确定发育潜力

[0197] 一旦已经获得细胞参数测量结果,所述测量就被用来确定胚胎 / 多潜能细胞的发育潜力。如上文所讨论的,术语“发育潜力”和“发育感受性”是指多潜能细胞或组织生长或发育的能力(ability)或能力(capacity)。例如,在卵母细胞或胚胎的实例中,发育潜力可以是卵母细胞或胚胎生长或发育为健康胚泡的能力(ability)或能力(capacity)。作为另一个实例,在干细胞的实例中,发育潜力是生长或发育为感兴趣的一个或多个细胞例如神经元、肌肉、B 或 T 细胞和类似细胞的能力(ability)或能力(capacity)。在一些实施方案中,卵母细胞或胚胎的发育潜力是所述卵母细胞或胚胎发育为健康胚泡;以成功植

入子宫；以经过妊娠和 / 或以活着出生的能力 (ability) 或能力 (capacity)。在一些实施方案中，多潜能细胞的发育潜力是所述多潜能细胞发育为感兴趣的一个或多个细胞例如神经元、肌肉、B 或 T 细胞和类似细胞和 / 或体内促进感兴趣的组织的能力 (ability) 或能力 (capacity)。

[0198] “良好发育潜力”意指胚胎 / 多潜能细胞统计学上很可能如所期望的发育，即其具有如所期望的发育的 55%、60%、70%、80%、90%、95% 或更高的概率，例如 100% 的概率。换句话说，证明曾获得对良好发育潜力的确定的细胞参数测量结果的 100 个中 55 个、100 个中 60 个、100 个中 70 个、100 个中 80 个、100 个中 90 个、100 个中 95 个或整个 100 个中 100 个胚胎或多潜能细胞事实上确实如所期望的继续发育。相反地，“不良发育潜力”意指胚胎 / 多潜能细胞统计学上很可能不如所期望的发育，即其具有如所期望的发育的 50%、40%、30%、20%、10%、5% 或更少的概率，例如 0% 的概率。换句话说，证明曾获得对不良发育潜力的确定的细胞参数测量结果的 100 个中仅 50 个、100 个中 40 个、100 个中 30 个、100 个中 20 个、100 个中 10 个、100 个中 5 个或更少的胚胎或多潜能细胞事实上确实如所期望的继续发育。如本文所用的，“正常的”或“健康的”胚胎和多潜能细胞证明良好发育潜力而“不正常的”胚胎和多潜能细胞表现出不良的发育潜力。

[0199] 在一些实施方案中，细胞参数测量结果被直接用于确定胚胎或多潜能细胞的发育潜力。换句话说，测量本身的绝对值足以确定发育潜力。使用时差成像测量细胞单数的实施方案中这样的实例包括但不限于下列，其单独或组合中的任一种指示人类胚胎中的良好发育潜力：(a) 持续约 0-30 分钟例如，约 6-20 分钟，平均约 12-14 分钟的胞质分裂 1；(b) 持续约 20-27 小时例如约 25-27 小时的细胞周期 1；(c) 约 8-15 小时，例如约 9-13 小时，具有约 11 ± 2.1 小时的平均值的胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的开始之间的时间间隔；(d) 约 0-5 小时，例如约 0-3 小时，具有约 1 ± 1.6 小时的平均时间的胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的时间间隔，即同步性。单独或组合中任一种指示人类胚胎中不良发育潜力的直接的测量的实例包括但不限于 (a) 持续超过约 30 分钟例如约 32、35、40、45、50、55 或 60 分钟或更多的胞质分裂 1；(b) 持续超过约 27 小时例如 28、29 或 30 或更多小时的细胞周期 1；(c) 持续超过 15 小时例如 16、17、18、19 或 20 或更多小时或少于 8 小时例如约 7、5、4 或 3 或更少小时的胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的开始之间的时间间隔；(d) 6、7、8、9 或 10 或者更多小时的胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的时间间隔。

[0200] 在一些实施方案中，通过将其与来自参照或对照胚胎 / 多潜能细胞的细胞参数测量结果比较并且使用这一比较的结果以提供对所述胚胎 / 多潜能细胞的发育潜力的确定来使用细胞参数测量结果。术语“参照”和“对照”如本文所用的意指被用来解释给定胚胎 / 多潜能细胞的细胞参数测量结果并且给出对其发育潜力的确定的标准化的胚胎或细胞。参考或对照可以是已知具有所期望的表型例如良好发育潜力并且因此可以是阳性参照或对照胚胎 / 多潜能细胞的胚胎 / 多潜能细胞。可选择地，所述参照 / 对照胚胎 / 多潜能细胞可以是已知不具有所期望的表型并且因此是阴性参照或对照胚胎 / 多潜能细胞的胚胎 / 多潜能细胞。

[0201] 在某些实施方案中，将所获得的一个或多个细胞参数测量结果与来自单个参照 / 对照胚胎 / 多潜能细胞的可比较的一个或多个细胞参数测量结果比较以获得与评估的所述胚胎 / 细胞的表型有关的信息。在还有其他的实施方案中，将所获得的一个或多个细胞

参数测量结果与来自两个或更多个不同参照 / 对照胚胎或多潜能细胞的可比较的一个或多个细胞参数测量结果比较以获得与评估的所述胚胎 / 细胞的表型有关的更深入的信息。例如, 可将从所评估的所述一个或多个胚胎或多潜能细胞获得的细胞参数测量结果与阳性和阴性胚胎或多潜能细胞两者相比较以获得与所述胚胎 / 细胞是否具有感兴趣的表型有关的确定的信息。

[0202] 作为一个实例, 正常人类胚胎即具有良好发育潜力的胞质分裂 1 为约 0-30 分钟, 更经常地约 6-20 分钟, 平均约 12-14 分钟, 即约 1、2、3、4 或 5 分钟, 更经常地约 6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19 或 20 分钟, 在某些实例中为 21、22、23、24、25、26、27、28、29 或多达约 30 分钟。当与从正常参照胚胎所观察到的相比所评估的胚胎中完成胞质分裂 1 的较长的时间段指示不良发育潜力。作为第二个实例, 正常人类胚胎中的细胞周期 1 即从受精到胞质分裂 1 完成的时间, 通常在约 20-27 小时中, 更经常地在约 25-27 小时, 即约 15、16、17、18 或 19 小时, 更经常地约 20、21、22、23 或 24 小时和更经常地约 25、26 或 27 小时中完成。当与从正常参照胚胎所观察到的相比所评估的胚胎中较长的细胞周期 1 指示不良发育潜力。作为第三个实例, 正常人类胚胎中胞质分裂 1 的结束和胞质分裂 2 的开始是约 8-15 小时, 更常常约 9-13 小时, 具有约 11 ± 2.1 小时的平均值, 即 6、7 或 8 小时, 更经常地约 9、10、11、12、13、14 或多达约 15 小时。与从正常参照胚胎所观察到的相比所评估的胚胎中较长或较短的细胞周期 2 指示不良发育潜力。作为第四个实例, 正常人类胚胎中胞质分裂 2 的起始和胞质分裂 3 的起始之间的时间间隔即第二次和第三次有丝分裂的同步性是通常约 0-5 小时, 更经常地约 0、1、2 或 3 小时, 具有约 1 ± 1.6 小时的平均值, 与从正常参照胚胎所观察到的相比所评估的胚胎中胞质分裂 2 的完成和胞质分裂 3 之间的较长的间隔指示不良发育潜力。最后, 作为当使用基因表达水平作为评估发育潜力的参数时可如何应用这一实施方案的实例, Cofilin、DIAPH1、ECT2、MYLC2、DGCR8、Dicer、TARBP2、CPEB1、Symplekin、YBX2、ZAR1、CTNNA1、DNMT3B、TERT、YY1、IFGR2、BTF3 和 / 或 NELF 的较低的表达水平即与从正常参照 2 细胞胚胎所观察到的相比所评估的 2 细胞胚胎中低 1.5- 倍、2- 倍、3- 倍、4- 倍、5- 倍、10- 倍、20- 倍、50- 倍或 100- 倍的表达指示不良发育潜力, 而等于或大于从正常参照 2 细胞胚胎所观察到的表达的表达式指示良好发育潜力。其他实例可来自于经验数据, 例如通过观察有待被测定的胚胎 / 多潜能细胞旁边的一个或多个参照胚胎或多潜能细胞。可使用任何参照胚胎 / 多潜能细胞, 例如具有良好发育潜力的正常参照样品或具有不良发育潜力的异常参照样品。在一些实例中, 可使用不只一个参照样品, 例如正常参照样品和异常参照样品两者都可使用。

[0203] 在一些实施方案中, 使用通过时差显微术或通过表达谱分析但不是通过时差显微术和表达谱分析两者获取的细胞参数测量结果是可以期望的。在其他的实施方案中, 使用通过时差显微术获取的细胞参数测量结果以及通过表达谱分析获取的细胞参数测量结果是可以期望的。

[0204] 如上文所讨论的, 可测量并使用一个或多个参数来确定胚胎或多潜能细胞的发育潜力。在一些实施方案中, 单个参数的测量可能足以获得对发育潜力的确定。在一些实施方案中, 使用不只一个参数例如 2 个细胞参数、3 个细胞参数或 4 个或更多个细胞参数的测量是可以期望的。

[0205] 在某些实施方案中, 对于多个参数的测定是可以期望的, 因为对多个参数的测定

可提供更高的敏感性和特异性。敏感性意指正确鉴定为阳性的实际上阳性的比例。这可被算术表示为：

[0206]

$$\text{敏感性} = \frac{\text{(真正阳性的数目)}}{\text{(真正阳性的数目 + 假阴性的数目)}}$$

[0207] 因此，在其中“阳性”是具有良好发育潜力即将发育为胚泡的胚胎而“阴性”是具有不良发育潜力即将不会发育为胚泡的胚胎的方法中，100%的敏感性意指测试识别像这样将发育为胚泡的所有胚胎。在一些实施方案中，测定的敏感性可以是约70%、80%、90%、95%、98%或更高，例如100%。特异性意指被正确鉴定为阴性的阴性的比例。这可被算术地描述为：

[0208]

$$\text{特异性} = \frac{\text{(真正阴性的数目)}}{\text{(真正阴性的数目 + 假阳性的数目)}}$$

[0209] 因此，在其中阳性是具有良好发育潜力即将发育为胚泡的胚胎而阴性是具有不良发育潜力即将不会发育为胚泡的胚胎的方法中，100%的特异性意指测试识别将不会发育为胚泡即将在胚泡期之前停滞的所有胚胎。在一些实施方案中，测定的特异性可以是约70%、80%、90%、95%、98%或更高，例如100%。

[0210] 如下文实施例部分和图7中所证明的，三个参数的使用提供94%的敏感性和93%的特异性以及3倍于胚泡分布的标准偏差的截止点。换句话说，本发明的方法能够在胚泡阶段之前正确鉴定94%的机会（敏感性）将要发育成为胚泡的胚胎的数目和93%的机会（特异性）将要停滞的胚胎的数目。此外所述特定的平均值和/或截止点可取决于用于计算这些值的数据集以及特定应用而修改。

[0211] 在一些实施方案中，胚胎或多潜能细胞的评估包括产生包括受治疗者胚胎/多潜能细胞的技术人员评估，例如“发育潜力评估”、“染色体异常的评估”等的书面报告。因此，主题方法可进一步包括产生或输出提供这样的评估的结果的报告步骤，所述报告可以电子介质（例如在电脑监视器上电子显示）的形式或实体介质（例如打印在纸上或其他实体介质上的报告）的形式提供。

[0212] 如本文所描述的，“报告”是电子或实体文件。其包括提供与通过本发明的方法获取的评估有关的感兴趣的信息的报告元素。可完全或部分电子地生成受治疗者报告。受治疗者报告包括至少受治疗者胚胎或多潜能细胞的发育潜力的评估、染色体异常的存在的可能性的评估等。受治疗者报告可进一步包括下列中的一个或多个：1) 与测试装置有关的信息；2) 服务提供者信息；3) 受治疗者数据；4) 样品数据；5) 详细的评估报告部分，提供与如何获得评估有关的信息，例如 a) 所获取的细胞参数测量、b) 所使用的参照值，如果有的话；和 6) 其他特征。

[0213] 报告可包括关于测试机构的信息，所述信息与进行样品采集和/或数据生成的医院、临床或实验室有关。样品采集可包括如何生成样品，例如如何从受治疗者收获样品和/或如何培养样品等。数据生成可包括如何获得图像或如何分析基因表达谱。这一信息可包括与例如测试机构的名称和位置、进行所述测定和/或输入数据的实验室技术人员的身

份、进行和 / 或分析测定的日期和时间、样品和 / 或结果数据储存的位置、测定中使用的试剂 (例如试剂盒等) 的批量编号以及类似信息有关的一个或多个细节。具有这一信息的报告领域 (Report field) 可通常使用由使用者提供的信息填充。

[0214] 报告可包括关于服务提供者的信息, 所述服务提供者可位于使用者所在的卫生保健机构外或卫生保健机构内。这样的信息的实例可包括服务提供者的名称和位置, 查阅者的名称以及需要或期望时进行样品分离和 / 或数据生成的个人的名字。具有这一信息的报告领域通常可使用由使用者输入的数据填充, 其可从预制脚本选择中选择 (例如使用下拉菜单)。报告中其他的服务提供者信息可包括与结果有关和 / 或与说明性报告有关的技术信息的联系信息。

[0215] 报告可包括受治疗者数据部分, 包括从其收集卵母细胞或多潜能细胞的受治疗者的医疗史、患者年龄、体外受精周期表证 (例如受精速度、第 3 天卵泡刺激素 (FSH) 水平) 和何时收集卵母细胞、合子 / 胚胎队列参数 (例如胚胎的总数)。该受治疗者数据可被并入以促进胚胎评估和 / 或帮助确定转移的胚胎的优化数目。报告还可包括管理性受治疗者数据 (也就是对于评估发育潜力来说非必需的信息) 例如确定受治疗者的信息 (诸如名字、受治疗者的出生日期 (DOB)、性别、邮箱和 / 或居住地址、医疗记录号码 (MRN)、医疗卫生机构中的房间和 / 或床位号), 保险信息以及类似信息), 安排发育潜力的评估的受治疗者的医师或其他卫生专业人士的名字以及 (如果与进行安排的医师不同) 受治疗者的护理负责的工作医师 (例如初级护理医师) 的名字。

[0216] 报告可包括样品数据部分, 其可提供与评估中分析的生物样品有关的信息, 例如样品的类型 (胚胎或多潜能细胞以及多潜能细胞的类型), 如何处理样品 (例如储存温度、制备程序) 和收集的日期和时间。具有这一信息的报告领域通常可使用由使用者输入的数据填充。其中一些可提供为预制脚本的选择 (例如使用下拉菜单)。

[0217] 报告可包括评估报告部分, 其可包括与如何如本文中所描述的获取评估 / 确定有关的信息。说明性报告可包括例如所评估的胚胎或多潜能细胞的时差图像和 / 或基因表达结果。报告的评估部分还可任选地包括推荐部分。例如, 当结果指示胚胎的良好发育潜力时, 推荐可包括在如本领域推荐的生育治疗期间将有限数目的胚胎植入子宫的推荐。

[0218] 还应当很容易理解的是报告可包括另外的元素或修饰的元素。例如, 当为电子的时, 报告可包含指向提供与所选择的报告的元素有关的更详细信息的内部或外部数据库的超链接。例如, 报告的患者信息元素可包括电子患者记录或获取这样的患者记录的站点的超链接, 所述患者记录保留在机密数据库中。后面的这一实施方案可能在医院系统或临床应用 (clinic setting) 中感兴趣。当以电子的形式时, 报告记录在适合的物理介质上, 例如计算机可读的介质诸如计算机存储器、zip 驱动器、CD、DVD 等上。

[0219] 应当很容易理解的是报告可包括上文元素中的全部或一些, 条件是所述报告通常包括至少足以提供使用者所需要的分析 (例如发育潜力的评估) 的元素。

[0220] 实用

[0221] 如上文所讨论的, 本发明的方法可用于评估胚胎或多潜能细胞以确定它们的发育潜力。发育潜力的这一确定可用于指导临床决策和 / 或行动。例如, 为了增加妊娠率, 临床医师常常将多个胚胎转移至患者中, 可能导致给母亲和胎儿都带来健康风险的多胎妊娠。使用从本发明的方法获得结果, 可在植入之前确定将被转移以发育为胎儿的胚胎的发育潜

力,允许医生决定转移多少胚胎以便将足月妊娠的成功的机会最大化同时将风险最小化。

[0222] 通过下列本发明的方法进行的评估还可在将一组胚胎或多潜能细胞中的胚胎或多潜能细胞按照它们的发育潜力分级中找到用途。例如,在某些实例中,多个胚胎能够发育为胚泡,即将具有良好发育潜力。然而,某些胚胎将更可能达到胚泡阶段或者是比其他质量更高的胚泡,即它们将具有比其他胚胎更好的发育潜力。在这样的情况下,本发明的方法可被用来将组中的胚胎分级。在这样的方法中,测量每个胚胎/多潜能细胞的一个或多个细胞参数以获取每个胚胎/多潜能细胞的细胞参数测量结果。之后来自所述胚胎或多潜能细胞中的每一个的一个或多个细胞参数测量结果被用于确定所述胚胎或多潜能细胞相对于彼此的发育潜力。在一些实施方案中,来自所述胚胎或多潜能细胞中的每一个的细胞参数测量结果通过将它们直接与彼此比较以确定所述胚胎或多潜能细胞的发育潜力来使用。在某些实施方案中,来自所述胚胎或多潜能细胞中的每一个的细胞参数测量结果通过将所述细胞参数测量结果与来自参照胚胎/多潜能细胞的细胞参数测量结果比较以确定每个胚胎或多潜能细胞的发育潜力并且之后比较每个胚胎或多潜能细胞的确定的发育潜力以确定所述胚胎或多潜能细胞相对于彼此的发育潜力来使用。以这样的方式,评估例如多个合子/胚胎的医生可仅选择质量最好的胚胎,即具有最好发育潜力的那些来转移以便将足月妊娠的成功的机会最大化同时将风险最小化。

[0223] 通过下列本发明的方法进行的评估还可用于确定体外成熟的卵母细胞和体外培养的干细胞的发育潜力。通过本发明的方法获得的关于卵母细胞的发育潜力的信息可指导医生对用于受精的卵母细胞的选择,产生从这些卵母细胞得到胚泡的更高的成功可能性。同样,关于干细胞的发育潜力的信息可告知医师对例如在需要其的受治疗者中体内重组或替换组织的程序中使用的干细胞的选择。

[0224] 试剂、设备和试剂盒

[0225] 同样提供的是用于实行上文描述的方法中的一种或多种的其试剂、设备和试剂盒。其主题试剂、设备和试剂盒可变化很大。就测量上文提及的细胞参数中的任一个的方法而言,感兴趣的试剂和设备包括上文所提及的那些,其中这些试剂可包括培养板、培养基、显微镜、成像软件、成像分析软件、核酸引物、核酸探针的阵列、抗体、信号生产系统试剂等等,取决于待进行的具体的测量程序。例如,如上文所描述的,试剂可包括对基因 *Cofillin*、*DIAPH1*、*ECT2*、*MYLC2/MYL5*、*DGCR8*、*Dicer/DICER1*、*TARBP2*、*CPEB1*、*Symplekin/SYMPK*、*YBX2*、*ZAR1*、*CTNBN1*、*DNMT3B*、*TERT*、*YY1*、*IFGR2/IFNGR2*、*BTF3* 和 *NELF* 中的一种或多种具有特异性的 PCR 引物。试剂的其他实例包括包含对感兴趣的基因中的一种或多种具有特异性的引物或由感兴趣的这些基因编码的蛋白的抗体的阵列。

[0226] 除了上文的元件,主题试剂盒将进一步包括用于实行主题方法的说明书。这些说明书将以各种形式存在于主题试剂盒中,其中的一个或多个可存在于试剂盒中。这些说明书可存在于其中的一种形式是作为在适合的介质或基底上的打印的信息,例如信息被打印于其上的一张或几张纸,在试剂盒的包装中,在包装说明书中等。还有另一种方式将是信息已经被记录于其上的计算机可读的介质,例如软盘、CD 等。可存在的还有另一种方式 (means) 是可经由互联网使用在移动站点获得信息的网站地址。任何常规方式可存在于试剂盒中。

[0227] 使用显微镜阵列的自动细胞成像

[0228] 上文描述的方法中的一些需要经由时差成像观察胚胎和干细胞发育的能力。这可使用由可适于标准孵育器内部的微型、多通道显微镜阵列构成的系统获得。这允许将多个样品迅速并且同时成像而不必在物理上移动皿。显示于图 20 中的一种说明性原型由具有暗视野照明的 3 通道显微镜阵列构成, 尽管可使用其他类型的照明。“三通道”意指有将三个不同培养皿同时成像的三个独立的显微镜。用步进电机调整聚焦或获取 3D 图像栈 (image stack) 的焦点位置。白光 LED 被用于照明, 尽管我们已经观察到对于人类胚胎来说红色或近红外 (IR) LED 可提高细胞膜和细胞内部之间的对比度。这一提高的对比度可用手动和自动的成像分析来辅助。此外, 移至红外区可减少对样品的光毒性。由低成本高分辨率摄像头获取图像, 但是可使用其他类型的照相机。

[0229] 如图 22 中所示, 上文描述的原型系统的每个显微镜被用来将可包含 1-30 个不等的胚胎的培养皿成像。显微镜收集来自与帮助消散由 LED 产生的任何热量的散热装置连接的白光 LED 的光, 其对于短的曝光时间来说非常小。光通过挡住直射光的常规暗视野片, 通过聚光透镜到样本标记的“有盖培养皿”上, 其是保留被培养和研究的胚胎的培养皿。培养皿可具有帮助在将皿带入或带出孵育器时保留细胞的次序并且阻止它们移动的孔。孔可以是空间上足够接近在一起以便胚胎可共享同一个培养基滴头。之后散射光通过显微镜物镜, 之后通过消色差双合透镜 (achromat doublet) 并且到 CMOS 传感器上。CMOS 传感器作为数码相机并且与计算机连接以便如上文所述的图像分析和示踪。

[0230] 这一设计容易改变大小以提供多得多的通道和不同的照明技术并且可被修改以适应用于进样的流体设备。此外, 设计可与反馈控制系统整合, 其中将培养条件例如温度、CO₂ (以控制 pH) 和培养基基于反馈并从成像数据实时优化。这一系统被用于获取人类胚胎发育的时差视频, 其在确定用于体外受精 (IVF) 程序的胚胎成活力中具有实用。其他应用包括干细胞治疗、药物筛选和组织工程。

[0231] 在设备的一个实施方案中, 照明由安装在铝散热装置上并且由 BuckPuck 电流调节驱动供能的 Luxeon 白光发射二极管 (LED) 提供。来自 LED 的光通过准直透镜。之后如图 22 中所示准直光通过定制激光加工挡光片并且使用非球面聚光透镜聚焦为中空的光锥。直接透射通过样品的光被物镜拒绝, 而由样品散射的光被收集。在一个实施方案中, 使用具有 20X 放大率的 Olympus 物镜, 尽管可使用更小的放大率以增加视野, 或可使用更大的放大率以增加分辨率。之后将收集的光通过消色差双合透镜 (即镜筒透镜) 以减少染色质和球面相差的影响。可选择地, 从成像物镜收集的光可通过指向相反的方向的作为对镜筒透镜的替代的另一个物镜。在一个实施方案中, 成像物镜可以是 10X 物镜, 而镜筒透镜可以是 4X 物镜。所得到的图像可通过具有 2 兆像素分辨率 (1600x1200 像素) 的 CMOS 传感器捕捉。也可使用不同类型的传感器和分辨率。

[0232] 图 23A 显示具有 3 个相同的显微镜的多通道显微镜阵列的照片。所有光学元件被安装在显微镜筒中。在阵列系统的操作中, 有盖培养皿被装载在安装在手动 2 轴倾斜台的聚丙烯平台上, 其允许相对于光轴调整像平面。这些台被固定在显微镜的底座上并且在初始对准之后没有移动。由 LED、平行光管透镜、挡光片和聚光透镜组成的照明组件被安装手动 xyz 台上以便放置并且聚焦照明光。由物镜、消色差透镜和 CMOS 传感器组成的成像组件同样安装在手动 xyz 台上以便将视野定位并且将物镜聚焦。所有 3 个成像组件被连接至线性滑轨并且由使用步进电机驱动的单杠臂支撑。这允许图像栈的电脑控制的聚焦和自

动捕获。可使用自动聚焦以及驱动 (actuation) 的其他方法。

[0233] 如图 23B 中所示,将显微镜阵列放置在标准孵育器内部。CMOS 图像传感器经过 USB 连接与位于孵育器内部的单个集线器 (hub) 连接,其传递至伴随其它通信和电源线路的外部 PC。所有电子线缆通过用硅酮胶密封的橡皮塞的中心引出孵育器。

[0234] 上文描述的显微镜阵列被用于记录早期人类胚胎发育的时差图像并且证明了从合子开始经过胚泡期的生长。四个不同的实验监测了总共 242 个胚胎。这一组中,将 100 个胚胎成像直到第 5 或 6 天;将其他胚胎在基因表达分析的不同时间点从成像位置移出。图像捕获软件的屏幕截图和所成像的胚胎示于图 24 中。以每张图像大致 1 秒的低曝光每 5 分钟捕获图像。样品接收的光的总量等于 24 分钟的持续曝光,与在处理期间在 IVF 诊所中经历的总水平相似。每张图像 1 秒持续时间的曝光是可以减少的。在用人胚胎操作之前,我们用小鼠植入前胚胎进行了多方面的对照实验以确保胚泡形成速度和基因表达模式不受成像过程的影响。

[0235] 图 25 和 26 显示来自时差序列的选择的图像。显示了第 1 天、第 2.5 天、第 4 天和第 5.5 天的图像。对于图 25 中所示的序列,9 个胚胎中的 3 个发育为胚泡,对于图 26 中显示的序列,12 个胚胎中的 5 个发育为胚泡。随时间关注单个胚胎,即便它们在摄影区内的位置由于胚胎在第 3 天经历培养基更换而转移。需要使用连续培养基来满足发育中胚胎的阶段特异性需求。在培养基更换期间,将胚胎从成像位置移出几分钟并且转移至新的有盖培养皿中。为了在培养基更换期间掌握每个胚胎的身份,将样品从一个皿至其他皿的转移摄影以证实胚胎没有被弄混。在收集用于基因表达分析的样品期间同样使用这一过程。追踪胚胎身份的问题可以通过使用孔以帮助将胚胎以特定顺序排列而解决。

[0236] 具有微孔的有盖培养皿

[0237] 当在不同的位置之间转移有盖培养皿时,胚胎有时可能移位,致使难以掌握胚胎身份。当在一个位置进行时差成像并且随后胚胎被移至用于胚胎选择和转移的第二个位置时提出了挑战。一个方法是在单独的有盖培养皿中培养胚胎。然而,这需要每个胚胎具有其自己的培养基滴头。在典型的 IVF 程序中,通常期望在同一个有盖培养皿中并且用同一个培养基滴头培养患者的全部胚胎。为了解决这一问题,我们已经设计了具有微孔的定制有盖培养皿。这在转移到或移出孵育器或成像位点时防止胚胎移位并且保持它们在有盖培养皿上的排列。此外,孔是足够小并且空间上靠近在一起的以便它们可分享同一个培养基滴头并且所有的由同一个显微镜同时观察。每个微孔的底部表面具有光学品质光洁度。图 27A 显示具有一个实施方案的尺寸的图。在这一视图中,在 1.7x1.7mm 的视野中有 25 个空间上靠近在一起的微孔。图 27B 显示微孔的 3D 视图,其凹入皿表面中约 100 微米。皿上包括基信标记 (包括字母、数字和其他标记),以帮助鉴别。

[0238] 本文引用的所有参考文献通过引用以其整体并入本文。

实施例

[0239] 列出以下实施例以对为本领域那些技术人员提供如何进行和使用本发明的公开内容和描述,并且不意为限制发明人认为是本发明的范围,它们也不意为表示以下实验是进行的所有或仅有的实验。已经努力确保就所使用的数字 (如量、温度等等) 而言的准确性,但应考虑到一些实验误差和偏差。除非另外指明,否则份是重量份,分子量是重量平均

分子量,温度是摄氏度,压力是大气压或接近大气压。

[0240] 样品来源

[0241] 这一研究中所用的所有胚胎是在多年期间的能力收集的并且由多个胚胎学家受精并且冷冻保存。我们的研究中每个患者的平均胚胎数目是 3 并且包括在一般 IVF 中心遇到的所有年龄组。值得注意地,用于这些实验的所有胚胎是 IVF 产生的(与 ICSI 相反),因此胚胎来源于具有相对正常的功能的精子(至少就它们穿透卵丘、透明带和卵膜并且形成前核的能力而言)。刺激程序是标准的长 lupron 方案(cdc.gov/art)。额外的人类胚胎的冷冻保存通过将它们于室温(22±2°C)放置在冷冻培养基(1.5M1, 2 丙二醇+0.2M 蔗糖)上 25 分钟来完成。之后使用缓慢冷冻方案(-1°C/分钟至 -6.5°C;保持 5 分钟;接种;保持 5 分钟;-0.5°C/分钟至 -80°C;投入液氮中)将胚胎冷冻。委员会。没有受保护的健康信息可与胚胎相关联。

[0242] 确认一大组冷冻保存的胚胎并且进行下列观察:1) 胚胎证实指示正常胚胎发育的界标方式的时机,所述界标包括:卵裂为 2 个细胞(在第 2 天早期发生),RNA 降解的开始(在第 1 至 3 天发生),卵裂为 4 和 8 个细胞(分别在第 2 天和第 3 天晚期发生),胚胎基因组的活化(在第 3 天 8 细胞阶段)以及桑椹胚和胚泡的形成(分别在第 4 和 5 天发生)。2) 胚胎证实达到为典型的在临床情况下获得的胚胎的胚泡阶段的效率。这很可能归因于胚胎在 2PN 阶段被冷冻并且代表在 IVF 会诊中遇到的胚胎的阵列这一事实,因为在于 1 细胞阶段(典型的在第 3 天或胚泡阶段较晚冷冻保存的胚胎)冷冻保存之前没有进行将会或者将不会发育这样的“类选法(triage)”。因此,我们的数据证实与在典型的 IVF 诊所中观察到的那些相比这些胚胎表现出相似的胚泡形成速率。3) 之前的研究已经证实与新鲜胚胎相比于 2PN 阶段保存的胚胎表现出发育、移植、临床妊娠和分娩的相似的潜力。其他的研究对于冷冻的卵母细胞同样显示相似的结果,我们的研究同样显示,对于冷冻的卵母细胞相似的结果表明人类胚胎发育的最早事件在冷冻保存后保持适当的时间线。4) 我们关注不取决于受精的时间或者解冻时间的参数。我们测量的第一个参数(第一次胞质分裂的持续时间)具有很短的持续时间(大约 10-15 分钟)并且并不取决于这一研究中的受精的时间(其能够在所有胚胎中被独立测量而不管最终结果)。而且,相对于这一初始测量点测量所有随后的参数并且将在成功发育为胚泡和未能发育为胚泡的胚胎之间进行比较。5) 最终,我们注意到为 3PN 的新鲜(未冷冻的)胚胎已知按照与新鲜正常胚胎相同的时间框架发育;我们比较了我们从斯坦福 IVF 诊所获得的新鲜 3PN 胚胎中的参数并且观察到它们与我们冷冻保存的胚胎或公开的报告的那些没有不同。

[0243] 实验计划

[0244] 在四个实验设置中,我们追踪 242 个前核期胚胎(分别是 61、80、64 和 37 个)的发育。在实验的每个设置中,在第 1 天将人类合子解冻并且以小组培养在多个板上。在不同的成像位置在暗视野照明下用时差显微术独立观察每个板。以大约 24 小时的时间间隔,从成像系统移除一个板的胚胎并且收集为单个的胚胎或单个的细胞(卵裂球)用于高通量实时定量 PCR 基因表达分析。每个板通常包含在收获时达到所期望的发育阶段的胚胎(称为“正常的”)和在较早的发育阶段停滞或延迟或者极大破碎的那些(称为“异常的”)的混合物。将胚胎作为单一的完整胚胎分析或者分离为单一的卵裂球,之后进行基因特异性 RNA 扩增。将一亚组的胚胎(242 个中的 100 个)成像直到第 5 或 6 天以便监测胚泡形成。

[0245] 人类胚胎培养和显微镜

[0246] 通过将冷冻瓶从液氮贮槽移出并且将它们放置于室温将人类胚胎解冻。一旦将小瓶解冻,将其打开并且胚胎在解剖显微镜下可见。之后将小瓶的内容物倒入 3003 培养皿的底部,胚胎被放入滴头并且评估和记录每个胚胎的存活。在室温,将胚胎转移至 3037 培养皿,其包含 1.0M1,2 丙二醇 +0.2M 蔗糖 5 分钟,之后 0.5M1,2 丙二醇 +0.2M 蔗糖 5 分钟和 0.0M1,2 丙二醇 +0.2M 蔗糖 5 分钟。随后,使用油下的微滴,在第 1 至 3 天之间将胚胎在补充了 10% Quinn's Advantage 血清蛋白替代物 (SPS ;CooperSurgical) 的 Quinn's Advantage 卵裂培养基 (CooperSurgical) 中培养并且在第 3 天之后在具有 10% SPS 的 Quinn's Advantage 胚泡培养基 (CooperSurgical) 中培养。所有这些实验使用相同类型的卵裂期培养基,除了在第一个实验中的两个位置,其使用 Global 培养基 (LifeGlobal, Guilford, CT)。在这一个小的亚组 (12 个胚胎) 中,胚胎表现出稍微低的胚泡形成速度 (12 个中的 3 个,或 25%),但是对于这个组我们预测参数的敏感性和特异性都是 100%。

[0247] 在多个系统上进行时差成像以适应多个样品的同时分析并且验证不同平台的数据的一致性。系统由 7 个不同的显微镜组成:(1) 装备了 Tokai Hit 加热台、白光 Luxeon LED 和用于暗视野照明的光圈的两个修改的 Olympus IX-70/71 显微镜;(2) 装备了加热台、白光 Luxeon LED 和霍夫曼 Modulation Contrast illumination (调制相衬照明) 的两个修改的 Olympus IX-70/71 显微镜 (注意:决定暗视野照明对于测量参数来说是优选的之后仅在 4 个实验中的第一个期间使用这些系统);和 (3) 适于标准孵育器内部的定制 3 通道微型显微镜阵列,装备有白光 Luxeon LED 和用于暗视野照明的孔。我们观察到在发育行为、胚泡形成速度或基因表达谱上在这些不同系统上培养的胚胎之间没有显著差别;事实上,我们的用于胚泡预测的参数在多个系统和实验之间是一致的。

[0248] 所有系统的光强度都比辅助生殖显微镜通常使用的光低得多,归因于 LED 的低功率 (相对于通常 100W 的卤素灯泡) 和照相机传感器的高灵敏度。使用光功率计,我们确定在 473nm 的波长典型的辅助生殖显微镜 (Olympus IX-71 霍夫曼调制相衬) 的功率在大约 7 至 10mW 的范围内 (取决于放大率),而我们的成像系统的功率在相同的波长测量在 0.2 和 0.3mW 之间。以 1 秒的曝光时间每 5 分钟捕获图像多达 5 至 6 天,产生约 24 分钟的持续曝光,在 0.3mW 的功率,其等于在典型的辅助生殖显微镜下大约 1 分钟的曝光。

[0249] 为了在相关的成像和基因表达实验期间追踪每个胚胎的身份,我们在立体显微镜上安装了摄像机并且记录培养基更换和样品收集期间样品转移的过程。我们用小鼠植入前胚胎 ($n = 56$) 和一小亚组的人类胚胎 ($n = 22$) 进行对照实验并且在成像的和对照的胚胎之间的胚泡形成速度上没有观察到显著的差异 ($p = 0.96$)。

[0250] 高通量 qRT-PCR 分析

[0251] 对于单个胚胎或单个胚泡 qRT-PCR 分析来说,首先用酸性 Tyrode 溶液处理胚胎以除去透明带。为了收集单个卵裂球,用精密移液将胚胎于 37°C 在具有 HEPES 的 Quinn's Advantage 无 $Ca^{2+}Mg^{2+}$ 的培养基 (CooperSurgical) 中培养 5 至 20 分钟。将样品直接收集至 10 μ l 反应缓冲液中,随后如之前所描述的进行一步逆转录 / 预扩增反应。在逆转录和预扩增反应期间将合并的 20X ABI assay-on-demand qRT-PCR 引物和探针混合物 (Applied Biosystems) 用作基因特异性引物。如之前所描述的,用使用 ABI assay-on-demand

qRT-PCR 探针的 Fluidigm Biomark 96.96 Dynamic Array 进行高通量 qRT-PCR。所有样品以 3 或 4 个技术重复 (technical replicate) 装载。用 qBasePlus (Biogazelle)、Microsoft Excel 和定制软件进行 qRT-PCR 数据分析。某些基因在数据分析中被省略, 归因于不好的数据质量 (例如不好的 PCR 扩增曲线) 或在所评估的胚胎中始终低至无表达。对于卵裂球时期的分析, 所使用的母系转录物小组包括 DAZL、GDF3、IFITM1、STELLAR、SYCP3、VASA、GDF9、PDCD5、ZAR1 和 ZP1, 而胚胎基因小组包括 ATF7IP、CCNA1、EIF1AX、EIF4A3、H2AFZ、HSP70.1、JARID1B、LSM3、PABPC1 和 SERTAD1。使用 geNorm 和 $\Delta\Delta Ct$ 法计算每种基因相对于参照基因 GAPDH 和 RPLP0 以及相对于基因平均值的表达值。经验上基于基因稳定性值和变异系数 (对于 GAPDH, 为 1.18 和 46% 以及对于 RPLP0, 为 1.18 和 34%), 选择 GAPDH 和 RPLP0 作为这一研究的参照基因。这些在我们测试的 10 个管家基因中是最稳定的并且正好在典型的异源样品集合的范围中。第二, 我们观察到在单个卵裂球中, 如所期望的, GAPDH 和 RPLP0 转录物的量在 1 细胞和 8 细胞期之间每次分裂降低约 1Ct 值, 符合在人类发育的头 3 天期间 EGA 之前不存在新的转录物的情况下每个细胞随着每次卵裂分裂遗传约一半 mRNA 池的预期。第三, 我们注意到 EGA 开始之后, 单个卵裂球中这些参照基因的表达水平在 8 细胞至桑椹胚期之间保持稳定。在完整的胚胎水平, RPLP0 和 GAPDH 的 Ct 值在整个发育中直到桑椹胚期在很大程度上保持恒定, 在胚泡期有轻微升高, 可能归因于较大数目的卵裂球存在时增加的转录物水平。在这一研究中进行的基因表达分析中的大部分集中在桑椹胚期之前的发育期, 当参照基因的表达水平非常稳定时。

[0252] 自动细胞跟踪

[0253] 我们的细胞跟踪算法使用以序列蒙特卡洛方法为基础的概率框架, 其在计算机视觉领域中常被称为粒子滤波器。粒子滤波器随时间追踪三个主要变量的增长: 状态、对照和测量。状态变量是胚胎的模型并且表示为椭圆的集合。对照变量是转化状态变量的输入并且由我们的细胞增殖和分裂模型组成。测量变量是对状态的观察并且由通过时差显微术获得的我们的图像组成。我们对在每个时间步骤的现有状态的估计用后验概率分布来表示, 其近似于一组称为粒子的加权样品。我们可相互交替地使用术语粒子和胚胎, 其中粒子是给定时间胚胎模型的一个假设。初始化之后, 粒子滤波器重复应用三个步骤: 预测、测量和更新。

[0254] 预测: 细胞被表示为 2D 空间中的椭圆并且每个细胞具有方向和重叠指数。重叠指数详细说明细胞的相对高度。通常, 我们希望预测两个类型的行为: 细胞运动和细胞分裂。对于细胞运动, 我们的对照输入采用粒子并且随机扰乱每个细胞的每个参数, 包括位置、方向以及长轴和短轴的长度。扰乱是随机地从具有相对小的方差 (初始化的值的 5%) 的正常分布取样。对于细胞分裂, 我们使用下列方法。在时间上给定的点, 对于每个粒子, 我们指定细胞中的一个将要分裂的 50% 的可能性。这一值是经验选择的并且包括大范围的可能的细胞分裂同时保持现有构型的良好覆盖度。如果预期了分裂, 那么将随机选择分裂的细胞。当细胞被选择来分裂, 我们使用沿椭圆的长轴的对称分裂, 产生相同大小和形状的两个子细胞。之后我们随机扰乱子细胞的每个值。最后, 我们随机选择两个子细胞的重叠指数同时保持它们向对于剩下的细胞的正确的重叠。

[0255] 使用对照输入之后, 我们将每个粒子转化为模拟图像。这通过使用重叠指数将每个细胞的椭圆形形状投射在模拟的图像上来完成。相应的像素值被设定为二元值 1 并且扩

大以产生与所观察到的图像数据同等的膜厚度。由于胚胎是部分透明的并且收集离焦光，胚胎底部的细胞膜仅有时可见。相应地，具有 10% 的可能性增加闭合的细胞膜。实际上，我们已经发现，这些闭合的膜点对于正确的形状建模来说是决定性的，但是使得它们足够稀疏以便它们不类似于可见的边缘是重要的。

[0256] 测量：一旦我们生成假定模型的分布，就将相应的模拟图像与真实的显微镜图像相比较。显微镜图像是预先进行的以使用基本曲率为基础的方法以及之后的阈值分析产生细胞膜的二值图像。使用对称截短倒角距离估计比较的准确性，其之后被用于为每个粒子指定重量或者可能性。

[0257] 更新：指定重量之后，与它们的重量成比例地选择粒子以产生用于下一个重复的一组新的粒子。这关注最高可能性区域中的粒子分布。放弃具有低可能性的粒子，而增加具有高可能性的粒子。使用低方差法进行粒子重采样。

[0258] 如正文中所讨论的，一旦胚胎被建模，我们就可以提取动态显像参数，例如胞质分裂的持续时间和有丝分裂之间的时间。我们的细胞追踪软件之前被应用于 Matlab 并且估算时间在每张图像两秒至半分钟的范围内（取决于粒子的数目）。我们现有的软件版本被应用于 C 并且计算时间取决于粒子的数目在 1 至 5 秒的范围内。

[0259] 实施例 1

[0260] 确定胚胎的发育潜力的图像分析。

[0261] 方法

[0262] 将冷冻的 1 细胞人类胚胎，也称为合子，解冻并且放入培养基中并且在培养条件例如在 IVF 程序中使用的条件下培养。如上文更加详细地描述的，当它们在 2PN 期被冷冻并且因此无差别地冷冻保存时，这些胚胎显示是体外受精 (IVF) 群的典型代表。这与通常在被发现在新鲜周期期间具有最高质量的那些胚胎转移之后发育的较晚期冷冻保存的胚胎相反。对于一些实验，胚胎被放置在标准培养皿中。对于其他实验，胚胎在具有光学品质微孔的定制培养皿中培养。

[0263] 之后将生长的胚胎，通常每皿 1 至 30 个，用计算机控制的装配用于数码图像存储和分析的显微镜各自时差成像。在一些实例中，使用装配加热台和孵育箱的倒置显微镜进行时差成像。在其他实例中，使用适于常规孵育器内部的定制的微型显微镜阵列进行时差成像，其使得在同一孵育器中的多皿样品能够同时培养并且大小可变以适应多通道而没有对连续图像捕获之间的最小时间间隔的限制。使用多个显微镜同样消除了对移动样品的需要，其增加了系统准确性和整个系统的可靠性。成像系统使用暗视野照明，其为随后的特征提取和图像分析提供增强的图像对比，虽然已经注意到其他照明已经是足够的。将孵育器中的单个显微镜彼此分离，给每个培养皿提供其自己的受控环境。这允许皿从成像位置转入和转出而不破坏其他样品的环境。

[0264] 收集时差图像用于随后的细胞形态学分析，包括下列细胞参数中的至少一个的测量：第一次胞质分裂的持续时间，第一次和第二次细胞分裂之间的时间间隔以及第二次和第三次细胞分裂之间的时间间隔。图中显示的图像是在多达 5 或 6 天每 5 分钟以 1 秒的曝光时间获取的。如下文更加详细描述，第一次胞质分裂通过常在受精后一天发生并且持续约 14 分钟。第一次和第二次细胞分裂通常间隔平均约 11 小时。第二次和第三次细胞分裂通常间隔平均约 1 小时。因此，成像是受精后持续约 36 小时（加或减几小时）的一段

时间。

[0265] 结果

[0266] 一个六天的时间段中通过时差成像证实了培养中健康人类植入前胚胎的发育时间线（图 2）。观察到正常人类合子在第 2 天早期经历第一次卵裂分裂。随后，在第 4 天紧密结合为桑椹胎之前，胚胎分别在第 2 天和第 3 天分裂为 4 细胞和 8 细胞胚胎。当全能卵裂球分化为产生类似于胎座的胚胎结构的滋养层细胞或者体内发育为胚胎并且体外发育为多能干细胞的内细胞群时，在胚泡形成期间的第 5 天和第 6 天观察到最初的形态学上明显的细胞分化。

[0267] 接下来我们在四个独立的实验设置中追踪 242 个正常受精的胚胎并且证实培养至第 5 天或第 6 天的样品中正常和停滞的胚胎的分布。在 242 个胚胎中，将 100 个胚胎培养至第 5 天或第 6 天并且观察胚泡形成速度在 33% - 53% 之间，与在典型 IVF 诊所的胚泡形成速度相似（图 3）。剩余的胚胎在发育的不同时期停滞，最常在 2 细胞和 8 细胞期之间并且被定义为不正常（图 3）。为了确定预测胚胎成功发育至胚泡阶段的定量成像参数，我们提取并分析了来自时差录像的几个参数，包括卵裂球大小、透明带厚度、破碎的程度、第一个细胞周期的长度、头几次有丝分裂之间的时间间隔和第一次有丝分裂的持续时间。在发育正常和不正常的胚胎的录像图像分析期间，我们观察到在许多停滞的胚胎在第一次细胞分裂期间经历异常的胞质分裂。正常的胚胎在从卵裂沟的出现至子细胞的完全分离的 14.3 ± 6.0 分钟的狭窄的时间窗口中完成胞质分裂，以平稳但是受控的方式。这显示于图 4 顶部。相反，不正常胚胎通常显示两个异常胞质分裂表型中的一个。在温和的表型中，胞质分裂的形态学和机制似乎是正常的，但是完成过程所需要的时间更长，从额外的几分钟到一小时（图 4）。偶尔，经历稍微延长的胞质分裂的胚胎仍然发育为胚泡。在更多的几个表型中，胞质分裂的形态学和机制被扰乱。例如，如图 4 的下组中的实施例所示，胚胎形成单面的卵裂沟并且在最终破碎为较小的部分之前经历一系列不正常的膜边缘波动事件几个小时。同样观察到这些行为的其他变化。另外，证明这些更严重的表型的不正常的胚胎常常变成碎片，提供了胚胎断裂可能是随后导致不正常的胚胎发育的异常胞质分裂的副产物。

[0268] 对我们的图像结果的详细分析表明在胚胎基因活化（EGA）开始之前，在早期分裂期间的胞质分裂和有丝分裂中正常胚胎遵循严格的时间，表明胚胎的发育潜力是由所遗传的母系程序预先决定的。特别地，我们注意到在早期胚胎的细胞周期中被严格调控的三个时态区间或者参数：(1) 第一次胞质分裂的持续期间，(2) 第一次和第二次有丝分裂之间的时间间隔和 (3) 第二次和第三次有丝分裂的同步性。这三个时间间隔和形态学变化之间的关系示于图 5 中，对于正常胚胎，我们测量这些参数分别为大约 14.3 ± 6.0 分钟、 11.1 ± 2.1 小时和 1.0 ± 1.6 小时（本文给定为平均正 / 负标准偏差）。

[0269] 我们同样对新鲜（未冷冻保存）的是从单细胞期开始的 3PN（三倍体）的胚胎的小集合（ $n = 10$ ）进行成像。3PN 胚胎已经显示遵循与正常新鲜胚胎相同的界标事件的时间线直到至少头三个细胞周期。在我们的主要实验之前将这些胚胎成像以便验证成像系统（但是由于技术原因没有对胚泡实行）。这一新鲜胚胎的集合中，3 个胚胎遵循与我们的冷冻保存的 2PN 胚胎相似的事件时间线，具有从 15 至 30 分钟范围的胞质分裂的持续时间，9.6 至 13.8 小时范围内的第一次和第二次有丝分裂之间的时间，0.3 至 1.0 小时范围内的第二次

和第三次有丝分裂之间的时间。然而,在 7 个胚胎中,我们观察到独特的胞质分裂表型,其特征为 3 个卵裂沟同时出现、胞质分裂稍微延长和最终分裂为 3 个子细胞(图 4)。这些胚胎具有从 15 至 70 分钟范围内的胞质分裂持续时间(特征为卵裂沟的起始直到完全分裂为 3 个子细胞之间的时间)、8.7 至 12.7 小时范围内的第一次和第二次有丝分裂(3 细胞至 4 细胞)之间的时间以及 0.3 至 2.6 小时范围内的第二次和第三次有丝分裂(4 细胞至 5 细胞)之间的时间。这一观察与由不正常胚胎表现的胞质分裂表型不同范围一起表明我们的冷冻保存的胚胎发育上没有被冷冻保存过程延迟并且行为与分裂为两个卵裂球的新鲜合子相似。

[0270] 通过具有约 0 至 33 分钟之间的第一次胞质分裂、7.8 至 14.3 小时之间的第一次和第二次有丝分裂之间的时间和 0 至 5.8 小时之间的第二次和第三次有丝分裂之间的时间能够预测达到胚泡期的胚胎,分别具有 94% 和 93% 的敏感性和特异性(图 6)。相反,表现出这些窗口中的一个或多个之外的值的胚胎被预测停滞。所有成功发育为胚泡的正常胚胎在所有三个参数中表现出相似的值。相反,不正常的胚胎在它们完成所述间隔所花费的时间的长度上表现出高量的变化性(图 6)。我们观察到(1)比正常更长的完成第一次胞质分裂的时间段指示不良发育潜力;(2)比正常更长或更短的第一次和第二次细胞分裂之间的间隔表明指示不良发育潜力;和(3)比正常更长或更短的第二和第三次细胞分裂之间的间隔表明指示不良发育潜力。因此,这些参数是对胚胎行进至胚泡形成的能力和胚泡质量的预测。

[0271] 最后,我们注意到尽管每个参数独立地预测胚胎的发育潜力,但所有三个参数的使用提供了都超过 90% 的敏感性和特异性,具有 3 倍于标准偏差的截止点。这些参数的接受者操作表征(ROC)曲线显示于图 7 中。在这一图中的曲线显示不同标准偏差截止的真实阳性率(敏感性)与假阳性率(1-特异性)对比。为了获取这一 ROC,使用了下列数目:真实阳性的数目 = 34(正确预测达到胚泡);真实阴性的数目 = 54(正确预测停滞);假阳性的数目 = 4(不正确预测达到胚泡);假阴性的数目 = 2(不正确预测停滞)。

[0272] 讨论

[0273] 我们的分析显示在头三次卵裂分裂期间的有丝分裂和胞质分裂中遵循严格时间的胚胎有高得多的可能发育到胚泡期并且形成具有扩大的内细胞群(ICM)的高质量胚泡。动态形态学参数可被用来选择用于在 IVF 程序中的转移或冷冻保存的最佳的胚胎。这些参数还可用来分辨胚泡的不同品质,允许将组中胚胎的相对发育潜力分级。ICV 诊所中的标准实践是在 8 细胞期(第 3 天)转移。一些诊所选择将胚胎培养至胚泡期(第 5 天),因为胚泡转移与在第 3 天转移相比最高将植入率加倍。然而,很多诊所避免延长培养,归因于增加的表现遗传疾病的风险。预测成像参数可被用来在 4 细胞期(第 2 天)并且在胚胎基因活化之前预测胚胎成活力。这可允许比通常实行的早整天并且在胚胎经历它们的分子程序上的显著变化之前将胚胎转移或冷冻保存。这还可允许选择最佳的胚胎,用于 PGD 或其他类型的分析。

[0274] 实施例 2

[0275] 通过基因表达分析验证成像参数和基因表达分析确定发育潜力的用途。

[0276] 方法

[0277] 将冷冻的 1 细胞人类胚胎,也称为合子,解冻并且放入培养基中并且在培养条件

例如在 IVF 程序中使用的条件下培养。对于一些实验,胚胎被放置在标准培养皿中。对于其他实验,胚胎在具有光学品质微孔的定制培养皿中培养。

[0278] 将胚胎从培养基和成像系统移出并且收集为用于基因表达分析的单个胚胎或单个细胞(卵裂球)。每个板通常包含胚胎的混合物,一些在收获的时候达到了所期望的发育阶段而其他在较早的发育阶段停滞或者广泛破碎。在收获的时候达到了所期望的发育阶段的那些被分类为“正常的”,而停滞的那些被认为是“不正常的”。例如,当为了收集样品将一个板的胚胎在第二天晚期从成像位置移出,已经达到 4 细胞期并且超过的任何胚胎将被定义为正常的,而没能达到 4 细胞期的那些将被标记为停滞的。将这些停滞的胚胎按照它们开始停滞的发育期分类,以使在第 2 天晚期仅具有 2 个胚泡的胚胎将被分析为停滞的 2 细胞胚胎。在样品收集的时候小心排除形态学上似乎是死亡的并且有孔的胚胎(例如退化的卵裂球)。仅显示活着的胚胎(正常的和停滞的两种)被用于基因表达分析。然而,可能的是收集的时候显示正常的胚胎如果它们被允许生长至较晚期的话可能最终停滞。通过定量 RT-PCR(qRT-PCR) 进行代表这些种类中的每一种的胚胎的基因表达分析。以大约 24 小时的间隔,从单个成像系统收集胚胎用于高通量的 qRT-PCR 基因表达分析,具有对 96 个样品测定的多达 96 个基因的多路反应。使用 Fluidigm Biomark 系统进行基因表达分析,其可以纳升的量实现多达 9216 个同时发生的以 TaqMan 测定为基础的 qRT-PCR 反应。

[0279] 结果

[0280] 为了解释可能成为形态学事件的基础的分子机制,我们对有关的基因表达谱分析。每个样品评估属于不同类别的 96 个不同基因的表达水平,包括管家基因、生殖细胞标记、母体因子、EGA 标记、滋养层标记、内细胞团标记、多潜能标记、表观遗传学调节因子、转录因子、激素受体和其他(表 1,在图 19 中)。在两个不同的实验设定中评估了两个有所不同但是重叠的集合的基因,提供诊断人类胚胎命运的独一无二的基因集合。所述独一无二的基因集合是从关于来自模式生物的胚胎或人类胚胎干细胞的基因表达的数据以及从我们自身未公布的微点阵数据编译的。在这一研究中第一次展示了人类植入前胚胎中这些基因集合的表达状态。

[0281] 使用 geNorm 法(ElToukhy T 等人(2009)Hum Reprod)和 AACt 法(Vanneste E 等人(2009)Nat Med15:577-83)计算每个基因相对于参照基因 GAPDH 和 RPLP0 以及相对于基因平均值的表达值。基因稳定性值和变异系数是 1.18 和 46% (对于 GAPDH) 以及 1.18 和 34% (RPLP0),在我们测试的 10 个管家基因中是最稳定的并且正好在典型的异源样品集合的范围中。在单个的卵裂球中,如所期望的,GAPDH 和 RPLP0 转录物的量在 1 细胞和 8 细胞期之间的每次分裂降低约 1Ct 值,归因于卵裂分裂的减半影响和人类发育的头 3 天内缺少 EGA。单个卵裂球中这些参照基因的表达水平在 8 细胞至桑椹胚期之间保持稳定。在完整的胚胎水平,RPLP0 和 GAPDH 的 Ct 值在整个发育中直到桑椹胚期在很大程度上保持恒定。在胚泡期 RPLP0 和 GAPDH 的表达水平显著升高,最有可能归因于存在增加数目的卵裂球。这些变化没有影响 RPLP0 和 GAPDH 作为参照基因的可靠性。在这一研究中进行的基因表达分析中的大多数聚焦于桑椹胚期之前的发育期,此时参照基因的表达水平非常稳定。

[0282] 正常和不正常胚胎之间的差别基因表达。图 8 显示来自 6 个不正常的 1 至 2 细胞胚胎和 5 个正常的 1 至 2 细胞胚胎的 52 个基因的平均表达水平以对数比例标绘在雷达图中。通常停滞的胚胎显示与正常胚胎相比 mRNA 的减少的量,促进胞质分裂、RNA 加工和

miRNA 生物发生的基因受到最严重的影响。用星号突显的基因表示如曼尼惠特尼测试所确定的在正常和不正常胚胎之间的统计学上的显著差异 ($p < 0.05$)。这 18 种基因是 *Cofilin*、*DIAPH1*、*ECT2*、*MYLC2*、*DGCR8*、*Dicer*、*TARBP2*、*CPEB1*、*Symplekin*、*YBX2*、*ZAR1*、*CTNNB1*、*DNMT3B*、*TERT*、*YY1*、*IGFR2*、*BTF3* 和 *NELF*。每种基因属于如图中所指示的组,即胞质分裂:*Cofilin*、*DIAPH1*、*ECT2* 和 *MYCL2*;miRNA 生物发生:*DGCR8*、*Dicer* 和 *TARBP2*;RNA 加工:*YBX2*;母体因子:*ZAR1*;管家:*CTNNB1*;多潜能:*DNMT3B*、*TERT* 和 *YY1*;受体:*IGFR2* 以及转录因子:*BTF3* 和 *NELF*。在大多数实例中,这些基因的表达水平在正常的 1 和 2 细胞胚胎中比在停滞的 1 和 2 细胞胚胎中更高。

[0283] 有趣的是,某些基因类别在不正常胚胎中比在其他的更受影响。例如,在不正常的胚胎中,大多数的管家基因、激素受体和母体因子在基因表达上一点都不改变,然而胞质分裂和 miRNA 生物发生所涉及的许多基因显示出显著降低的表达。而且,在受影响的基因中,某些基因在正常和不正常胚胎之间显示比其他大得多的差异。例如,miRNA 生物发生通路中涉及的基因,诸如 *DGCR8*、*Dicer* 和 *TARBP2*,在不正常的胚胎中表现出高度减少的表达水平。值得注意的是,*CPEB1* 和 *Symplekin*,受到最严重影响的基因中的两个,属于调节母源 mRNA 储存和通过处理转录物 poly (A) 尾的活化的相同的分子机制 (Bettegowda, A. 等人 (2007) *Front. Biosci.* 12:3713-3726)。这些数据表明胚胎不正常性与胚胎的 mRNA 调节程序中的缺陷有关。

[0284] 将胞质分裂与基因表达谱相关联。用编码关键胞质分裂组分的基因进行基因表达分析。通过在立体显微镜上安装照相机并且将培养基更换和样品收集期间的样品转移过程摄像来追踪每个胚胎的身份。当评估不正常胚胎的基因表达谱时,我们观察到在异常胞质分裂和关键胞质分裂成分的较低基因表达水平中的强烈关联。有趣的是,不正常胚胎的基因表达谱和它们的异常形态学表型一样是不同并且可变的。

[0285] 已发现胞质分裂基因在正常 2 细胞胚胎和不正常 2 细胞胚胎间 (图 9) 以及在正常 4 细胞胚胎和不正常 4 细胞胚胎间 (图 10) 是不同的。图 9 和 10 显示与不同的胞质分裂表型相关的在正常的 2 细胞人类胚胎 (图 9) 和正常的 4 细胞胚胎 (图 10) 中更高表达的基因的相对表达。如在图 9 中所表现的,在第一次胞质分裂期间显示不正常的膜边缘波动的停滞的 2 细胞胚胎对所有所测试的胞质分裂调节基因具有显著降低的表达水平。图 9 中显示差异的基因是 *anillin*、*cofilin*、*DIAPH1*、*DIAPH2*、*DNM2*、*ECT2*、*MKLP2*、*MYCL2* 和 *RhoA*。正常表达水平以右边的柱给出并且可以看出在每个基因中都更高。在图 9 的图表上方的照片中,显示不正常的两个细胞胚胎,比例尺代表 $50 \mu\text{m}$ 。图 10 显示从在第一次分裂期间经历具有单面胞质分裂沟和大大延长的胞质分裂的异常胞质分裂的停滞的 4 细胞胚胎的结果,所述显示胞质分裂调节因子 *Anillin* 和 *ECT2* 的降低的表达。图 10 中的比例尺也代表 $50 \mu\text{m}$ 。

[0286] 胚胎期特异基因表达模式。图 11 显示在对 141 个正常发育的单个胚胎和单个卵裂球的基因表达分析期间鉴定的四个胚胎期特异模式 (ESSP)。分入四个 ESSP 中每一个的基因列在表 2 中 (图 20)。图 11 中的图通过以相似的表达模式为基础将基因分类并且将它们的表达值 (相对于参照基因) 的平均来产生。ESSP 的相对表达水平通过将具有相似表达模式的基因的表达水平平均来计算。将基因表达水平对不同的细胞期做图,即,1c = 一个细胞;M = 桑椹胚,B = 胚泡。在图 11 中,四个 ESSP 的每一个中的基因的相对表达显示为发育的函数,从 1 细胞 (1c) 至桑椹胚和胚泡。ESSP1 显示母系遗传,ESSP2 显示基因转录活化,

ESSP3 显示晚期活化而 ESSP4 显示持久的转录物。如 ESSP2 中所指示的, IVF 诊所中典型的转移点发生在第 3 天, 此时胚胎正在经历归因于胚胎基因活化的显著的发育变化。时差成像数据指示胚胎的发育潜力可通过 4 细胞期来鉴定, 由此允许胚胎在第 2 天并且在这一基因活化之前较早的转移。这一早期转移对于提高 IVF 程序的成功率是有用的。

[0287] 表 2 (图 20) 列出属于所鉴定的四个 ESSP 中的每一个的基因。对参照基因 (GAPDH 和 RPLP0) 并且相对于基因平均值估算每种基因的相对基因表达水平。对照胚胎的发育时间线每种基因的表达模式遵循下列四个 ESSP 中的一个: ESSP 模式 (1) 早期, 开始高, 缓慢降低并且在胚泡之前关闭的基因; ESSP 模式 (2) 中期: 4 细胞期之后开启的基因; ESSP 模式 (3) 晚期: 在桑椹胚或胚泡时开启的基因和 ESSP 模式 (4) 恒定: 具有相对恒定的表达值的基因。

[0288] ESSP1 描述母系遗传的基因的模式。这些转录物以合子期的高表达水平开始并且随后随着胚胎发育为胚泡而降低。这些转录物的半衰期是大约 21 小时。来自其他模式生物的典型的母体因子例如 GDF9 和 ZAR1 以及生殖细胞 (卵母细胞) 特异基因 VASA 和 DAZL 在这一分类中。ESSP2 包括胚胎活化基因, 其在 4 细胞期之后在胚胎中首次转录。这一分类中的一些基因显示表现出两波活化, 第一次并且较小的一次在 5 至 6 细胞期而第二次并且较大的一次在 8 细胞期。来自其他的模式生物的已知的 EGA 基因, 例如 EIF1AX31 和 JARID1B32, 在这一分类中。ESSP3 由直到胚泡期才表达的晚期活化的基因组成, 包括滋养层标记 GCM1。ESSP4 包含在整个发育中相对于参照基因保持稳定表达的持久转录物。这些基因的半衰期是 193 小时, 比 ESSP 长约 9 倍, 这一分类包括管家基因、转录因子、表观遗传调节因子、激素受体和其他的混合物。在使用单个正常胚胎和卵裂球的 61 个样品的另一个实验设定中证实基因表达的这些 4 种模式。

[0289] 在第一次分裂期间表现出异常的细胞动力学和有丝分裂行为的不正常的胚胎与高不稳定的基因表达谱有关, 尤其是涉及胚胎 RNA 管理的基因中。因此, 一种方法可结合这些方法学以提供可被用于预测植入前胚胎成活力的方法。结果表明不正常的胚胎以 RNA 加工和 miRNA 生物发生中的缺陷程序开始生活, 导致母系 mRNA 的过度降解。这些未调节的 RNA 降解的随机性质导致转录物的随机破坏, 引起在不正常胚胎中观察到的各种各样的异常表型。下降水平的 miRNA 引起调节的母系 RNA 降解中的缺陷, 导致在不同时期的发育停滞。

[0290] 单个的卵裂球分析。为了评估人类植入前胚胎中何时开始分子分化, 分析了从处于不同发育期的 17 个胚胎收获的单个卵裂球中 CDX2 表达水平。图 12A 显示两个基因 CTBBN1 (黑柱) 和 CDX2 (浅柱) 的相对表达水平为发育期的函数, 从 2 细胞至胚泡。如可见的, 在来自 4 细胞期之前的胚胎的单个卵裂球中 CDX2 以较低水平偶然被表达 (图 12A)。然而, 从 6 细胞期开始, 每个胚胎包含以显著水平表达 CDX2 的至少一个卵裂球。也显示在图 12A 中的管家基因 CTNNB1 的表达水平在来自相同胚胎的卵裂球中保持恒定, 指示 CDX2 的多样化表达模式不是 qPCR 的人工产物。来自独立实验的数据证实相似的观察。这些结果表明人类植入前胚胎的分子分化可在 4 细胞期之后尽可能早地立即发生。

[0291] 有趣的是, 对单个卵裂球中的基因表达谱的检查显示包含具有相应于不同发育期的基因表达标签的卵裂球的胚胎。任何给定的时间的任何给定的胚胎的基因表达谱等于母系 mRNA 降解和 EGA 的和。早期发育期的较年轻的卵裂球通常含有高量的母系转录物 and 低量的合子基因并且相反的对处于较高等的发育期的较年长的卵裂球适用。在这一实验中,

具体程序被定义为 10 个 ESSP1 标记（母系转录物）的平均表达值而胚胎程序则通过 10 个 ESSP2 标记（胚胎转录物）的平均表达水平。所使用的母系转录物组包括 DAZL、GDF3、IFITM1、STELLAR、SYCP3、VASA、GDF9、PDCD5、ZAR1 和 ZP1，而胚胎基因组包括 ATF7IP、CCNA1、EIF1AX、EIF4A3、H2AFZ、HSP70.1、JARID1B、LSM3、PABPC1 和 SERTAD1。在从这一特定的 8 细胞胚胎中成功收集的 6 个卵裂球中，3 个卵裂球显示出与来自正常的 3 细胞胚胎样品相似的基因表达标签，而其余 3 个卵裂球与来自正常的 8 细胞胚胎的卵裂球相似（图 12B）。这一观察的最可能的解释是胚胎中一个亚群的细胞的停滞。这一部分停滞表型同样在我们测试的样品中的另一个 9 细胞胚胎和 2 个桑椹胚中观察到。母系转录物水平在已经在培养中花费与它们的正常的姐妹细胞相同的时间量的停滞的卵裂球中仍然高的事实，表明母系 RNA 的降解不是随时间简单发生的自发过程而最可能需要特异 RNA 降解机制例如微 RNA (miRNA) 的作用。这些数据同样提供了母系 mRNA 降解是哺乳动物胚胎发生期间保守的发育事件并且是正常的胚胎发育所需要的进一步的证据 (Bettegowda, A. 等人 (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20:45-53)。此外，这些数据表明胚胎中单个的卵裂球是自发的并且可彼此独立地发育。另外，这些结果指示可使用本文描述的基因表达水平测试以在有待被测试的细胞中测试 mRNA 的水平（其指示基因表达水平），其中 RNA 是已知为母系程序的一部分的基因并且在胚胎发育的晚期中这一发育水平的持续与不正常结果的可能性有关，或者是胚胎程序的一部分，其中随时间的缺乏指示不正常结果的可能性。本文检验的母系程序基因是 ZAR1、PDCD5、NLRP5、H5F1、GDF9 和 BNC2。其他的母系影响基因是已知的并且可用的。

[0292] 胚胎基因活化。本方法是至少部分以不正常的发育停滞的胚胎在 EGA（胚胎基因活化）发生之前的头三次分裂期间通常表现出异常胞质分裂和有丝分裂时间的发现为基础的。这表明胚胎发育的命运主要由母系遗传决定，一个与由 Hardy 等人在 200134 中进行的人类植入前发育的数学模型显著一致的发现。而且胞质分裂和有丝分裂的异常与调节 miRNA 生物发生和母系 mRNA 遮蔽、储存和再活化的基因中母系转录物的降低的水平强烈相关。miRNA 通过促进不同生物过程中的 mRNA 降解来调节翻译，包括生物发育和分化 (Blakaj, A. & Lin, H. (2008) *J. Biol. Chem.* 283:9505-9508 ; Stefani, G. & Slack, F. J. (2008) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9:219-230)。来自模式生物的增加的证据显示 miRNA 可以是在早期胚胎中母系转录物降解的关键调节因子 (Bettegowda, A. 等人 (2008) *Reprod. Fertil. Dev.* 20:45-53)。因此，miRNA 生物发生上的缺陷将很可能导致不正常的胚胎发育，另一方面，不能正确管理母系 mRNA 同样导致不良胚胎发生。哺乳动物卵母细胞合成在母亲生产前支持早期胚胎生长所需要的大量母系 RNA 转录物。这些转录物被抑制并且贮存一段延长的时间，直到它们在受精之后被再活化。这一母系 RNA 管理程序中的缺陷将可能影响母系转录物的量和质量并且因此损害成功发育的机会。

[0293] 评估胚胎成活力的模型。图 13 显示以相关的成像和分子分析为基础的人类胚胎发育的模型。所显示的是包括预测成功发育成胚泡的关键的短暂时间的从合子发育至胚泡的时间线和胚胎发育的图解。如所图解的，关键分子数据指示人类胚胎以遗传自母亲的不同集合的卵母细胞 RNA 开始生活。这一集合的 RNA 通过卵中特异 RNA 管理程序保持并且包装。受精之后，对卵特异的一个亚集合的母系 RNA (ESSP1: 胚胎期特异模式 1) 的降解必定随从卵母细胞至胚胎的转变的开始而降低。同时，其他的 RNA 随发育继续 (ESSP4) 而理想上平均地分配给每个卵裂球。RNA 的成功降解和分配随细胞自发形式的胚胎基因组活化

(EGA) 和 ESSP2 的基因的转录而结束。值得注意的是,在卵裂分裂期间,胚胎卵裂球可独立地停滞或进行。胚胎中细胞自发发育的结果是单个卵裂球可停滞或进行并且当 8 细胞进行至桑椹胚期并且超过时,胚泡质量将受到停滞或进行超过 8 细胞的细胞的数目的冲击。成像数据证实有预测成功或失败的发育的关键期:第一次胞质分裂、第二次卵裂分裂以及第二次和第三次卵裂分裂的同步性。这些参数可使用之前描述的细胞追踪算法和软件自动测量。所描述的系统和方法被用于使用关键成像预测因子诊断胚胎结果并且可允许发育中较早的较少胚胎的转移(在 EGA 之前)。

[0294] 实施例 3

[0295] 将卵母细胞成熟和随后的胚胎发育成像。

[0296] 结果

[0297] 现有 IVF 操作的主要限制中的一个为卵母细胞质量和可用性。例如,现有 IVF 方案从小周期池 (small cyclic pool) 补充卵母细胞,提供用于受精的少量的卵母细胞(例如 1-20 个)。而且,IVF 操作期间激素刺激之后获取的约 20% 的卵母细胞被分类为不成熟的并且通常因为在现有培养条件下减少的胚胎发育的潜力而被排除。

[0298] 增加卵母细胞池的一种方法是通过体外成熟。图 14 显示体外成熟期间发育的三个时期,包括生发泡、中期 I 和中期 II。生发泡和中期 I 期被定义为未成熟的卵母细胞而中期 II 因为在体外成熟起始之后 24-28 小时发生的第一极体的存在而被定义为成熟的。图 15 显示已经被体外成熟的卵母细胞的胚胎发育。

[0299] 增加卵母细胞池的另一个方法是从初级和次级池补充卵母细胞,提供多达几千的卵母细胞。在这一操作中,休眠滤泡从卵巢补充并且进行体外程序以产生具有正常染色体组合、表观遗传状态、RNA 表达和形态学的卵母细胞。在另一方面,卵母细胞可来源于体外分化为生殖细胞的多潜能干细胞并且成熟为人类卵母细胞。

[0300] 如图 14 中说明的,卵母细胞的体外成熟过程由可被用于定义在本发明的方法中用于测量和分析的细胞参数的若干细胞变化来标记。这些包括,例如,卵母细胞膜形态学上的变化,诸如从透明带分离的速度和程度;卵母细胞核形态学上的变化,诸如胚泡破裂 (GVBD) 的启动、完成和速度;细胞质和细胞核中颗粒的运动的速度和方向以及第一极体的运动和排出。

[0301] 实施例 4

[0302] 将干细胞分化成像。

[0303] 结果

[0304] 时差成像分析还可被用于评估其他类型的细胞的成活力、发育潜能和结果,诸如干细胞、诱导的多潜能干细胞 (iPSC) 和人类胚胎干细胞 (hESC)。干细胞的发育潜力可通过使用时差图像分析来评估以测量细胞发育和分化期间形态学上的变化(图 17)。之后可分析并且选择用于体内移植或其他用途的分化的细胞。可从时差成像数据提取并分析干细胞的几个参数,例如胞质分裂的持续时间、有丝分裂事件之间的时间、细胞大小和形状、细胞的数目、细胞的运动、分裂模式、分化、不对称分裂(此时一个子细胞保持干细胞而另一个子细胞分化)、对称分裂(此时两个子细胞均保持为干细胞或两个均分化)和命运特定化(当干细胞分化时之前确定的)。

[0305] 干细胞治疗的基本程式是未分化的干细胞可体外培养,分化为特定的细胞类型并

且随后移植至受体以便受伤的组织和 / 或器官再生。时差成像分析可被用作高通量非侵入装置以鉴定形成能够整合到成熟组织中的非致癌的分化的后代的干细胞。可能的应用包括神经疾病例如阿尔茨海默病和帕金森症、血管系统疾病和心脏疾病、肌肉和骨骼疾病诸如关节炎、自身免疫性疾病和癌症的治疗以及通过评估指标的药物开发和新型治疗。

[0306] 在人类中,受损的组织通常通过体内干细胞的持续的补充和分化来代替。然而,身体再生的能力随着年龄而降低。这样的一个实例是由括约肌缺损导致的尿失禁。年龄据信是括约肌缺损的主要成因中的一个,因为肌肉纤维的数目和神经密度随时间而减少。为了治疗患有失禁的患者,iPSC 可来源于从阴道壁组织培养的成纤维细胞以便产生分化的平滑肌细胞。之后这些分化的细胞可被体内移植。在移植之前,时差成像分析可被用于将 iPSC 就多能性、分化、甲基化和致癌性来表征。其他的应用包括来源于患有帕金森症的患者皮肤细胞并且分化为用于移植的神经元的 iPSC 的时差成像(图 18)。

[0307] 实施例 5

[0308] 通过自动分析证实成像参数

[0309] 如我们的时差图像数据所证明的,人类胚胎发育是在同龄的胚胎之间高度变化的过程并且胚胎可在细胞分裂期间表现出各种各样的行为。因此,某些发育事件例如高度不正常的胞质分裂的持续时间(图 4)的手动表征可以被解释。为了证实我们的成像参数和系统地预测胚泡形成的能力,我们开发了用于自动追踪细胞分裂直到 4 细胞期的算法。我们的追踪算法使用以序贯蒙特卡罗方法为基础的概率模型评估技术。这一技术通过产生假定胚胎模型的分布、以简单的光学模型为基础模拟图像并且将这些模拟与观察到的图像数据相比较来运行(图 21a)。

[0310] 将胚胎建模为具有位置、方向和重叠指数的椭圆的集合(以表示细胞的相对高度)。关于这些模型,可提取胞质分裂的持续时间和有丝分裂之间的时间。胞质分裂通常通过胞质分裂沟的首次出现(当两极凹陷沿着卵裂轴形成)至完成子细胞的分离来定义。我们通过将胞质分裂大致估计为 1 细胞至 2 细胞分裂之前的细胞延长的持续时间来将问题简化。如果轴长度上的差距超过 15%(经验地选择)细胞被认为延长。有丝分裂之间的时间直接通过将每个模型中细胞计数来提取。

[0311] 我们在一组 14 个人胚胎上测试了我们的算法(图 21b)并且将自动的测量与手动图像分析相比较(图 21c、图 21d)。在这一数据组中,14 个胚胎中的 8 个达到了具有良好形态学的胚泡阶段(图 21e,上图)。自动测量与手动测量非常吻合并且所有 8 个胚胎被正确预测达到胚泡。14 个胚胎中的两个达到具有不良形态学的胚泡(不良质量的内细胞群,图 21e,下图)。对于这些胚胎,手动评估显示 1 个将达到胚泡而 1 个将停滞,而自动测量预测两者都将停滞。最后,14 个胚胎中的 4 个在胚泡期之前停滞并且所有的两种方法都正确预测停滞。

[0312] 粒子滤波器框架

[0313] 粒子滤波器是以蒙特卡罗模拟为基础的概率模型模拟技术。它被用来通过产生假定的模型的分布并且将这些模型与所观察到的数据比较来模拟未知的或“隐藏的”模型。其适应任意运动动力学和测量不确定性的能力使得其是追踪细胞分裂的理想候选者。

[0314] 粒子滤波器随时间追踪三个主要变量的增值:状态 x 、对照 u 和测量 z 。状态变量 x 是我们希望评估的胚胎的模型并且被表示为椭圆(2D)或椭圆柱体(3D)的集合。对照变量 u

是将状态变量转化的输入并且由我们的细胞增殖和分裂模型构成。测量变量 z 是状态的观察并且由我们通过时差显微术获得的图像构成。在下面部分中更加详细地描述这些参数。

[0315] 用后概率分布表示每个时间步骤 t 的现有的状态 x 的估算。这一后概率通常被称为置信 (the belief) 并且被定义为给定所有的过去的图像测量 $z_{1:t}$ 和过去的对照 $u_{1:t}$ 的现有状态 x_t 的条件概率

$$[0316] \quad \text{bel}(x_t) = p(x_t | u_{1:t}, z_{1:t}).$$

[0317] 粒子滤波器用一组加权的样品或粒子大致估计在后, 表示为:

$$[0318] \quad \mathbf{X}_t = \mathbf{X}_t^{[1]}, \mathbf{X}_t^{[2]}, \dots, \mathbf{X}_t^{[M]},$$

[0319] 其中 M 是粒子的数目。术语粒子和胚胎模型在本文可互换使用。因此, 单个粒子 $x_t^{[m]}$ (其中 $1 \leq m \leq M$) 是时间 t 时的胚胎模型的一个假设。

[0320] 起始之后, 粒子滤波器重复应用三个步骤。第一个步骤是假设, 其中每个粒子使用对照输入来增值:

$$[0321] \quad \mathbf{x}_t^{[m]} \sim p(\mathbf{x}_t | \mathbf{u}_t, \mathbf{x}_{t-1}^{[m]}).$$

[0322] 所获得的粒子的集合是所述先验概率的近似值。第二步是测量更新, 其中每个粒子被指定相应于现有测量的概率的重要性权重:

$$[0323] \quad \mathbf{w}_t^{[m]} = p(\mathbf{z}_t | \mathbf{x}_t^{[m]}).$$

[0324] 所述加权的粒子的集合是在后的 $\text{bel}(x_t)$ 的近似值。

[0325] 粒子滤波器的主要成分在第三步中出现, 其中粒子的集合根据它们的权重重新采样。这一重新采样步骤关注最高概率的区域中的粒子分布。

[0326] 细胞表示

[0327] 将细胞表示为 2D 空间中的椭圆。每个细胞具有主轴、短轴和笛卡儿坐标中的 2 维位置, 通过下列方程给出:

$$[0328] \quad \frac{(x - x_0)^2}{a^2} + \frac{(y - y_0)^2}{b^2} = 1.$$

[0329] 每个椭圆同样具有朝向方向 θ (偏转), 这允许其在 x - y 平面中旋转。由于椭圆几乎总是彼此重叠, 我们同样指示重叠指数 h , 其指定重叠的次序 (或者细胞的相对高度)。时间 t 时的每个胚胎模型的参数因此给定为:

$$[0330] \quad \mathbf{X}_t^{[m]} = \begin{bmatrix} x_{0_1} & y_{0_1} & a_1 & b_1 & \theta_1 & h_1 \\ x_{0_2} & y_{0_2} & a_2 & b_2 & \theta_2 & h_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{0_N} & y_{0_N} & a_N & b_N & \theta_N & h_N \end{bmatrix},$$

[0331] 其中 N 是该模型中的细胞的数目。

[0332] 细胞扰乱和分裂

[0333] 粒子滤波器的第一步是预测, 其中使用对照输入将每个粒子增值。为了我们的应

用,有我们想要建模的两种类型的行为。第一种类型的行为包括细胞运动,其包括平移、关于偏转角的旋转以及主轴和短轴的长度上的变化。第二种类型的行为是细胞分裂,其中一个细胞分裂为两个新细胞。

[0334] 为了将细胞运动建模,我们的对照输入采用粒子并且随机扰乱每个细胞的每个值: x_{0i} 、 y_{0i} 、 a_i 、 b_i 、 θ_i 。所述扰乱是使用相对小的变量从正常分布随即采样的(通常设定为初始化的值的5%)。

[0335] 为了将细胞分裂建模,我们使用了下列方法。在时间上给定的点,对于每个粒子,我们假定细胞中的一个将要分裂的50%概率。该值是经验选择的并且跨越大范围的可能的细胞分裂同时保持对现有构型的良好覆盖。如果分裂是预期的,那么所述分裂的细胞是随机选择的。更加复杂的模型将考虑另外的因素例如粒子中细胞的数目和这些分裂模式的历史并且将可能以所观察到的来自真实数据的行为为基础产生模型。

[0336] 当细胞被选择分裂时,使用沿椭圆的主轴的对称分裂,产生相同尺寸和形状的两个子细胞。之后随机扰乱子细胞的每个值。从正常分布但是用较大的变量对扰乱再次取样(初始值的10%)以适应新细胞形状上大的变化性。最后,两个子细胞的重叠指标被随机选择而保持它们相对于剩余细胞的共同的重叠。

[0337] 图像模拟

[0338] 将对照输入应用至每个粒子之后,粒子表示必须被转化至可与真实图像相比较的模拟的图像中。精确的图像模拟可能是困难的任务并且常常需要使用射线追踪技术和光学模型。本发明的方法关注在图像中容易鉴定的模拟特征而不是试图模拟实际图像。特别地,对细胞膜的图像进行模拟。

[0339] 有必须考虑的两个实体观察。首先,尽管显微镜通过胚胎聚焦在单相上,但是视场的深度非常大并且从几乎整个胚胎收集失焦光线。并且其次,胚胎被部分透明,其意指胚胎底部的细胞的膜有时(但不总是)可通过胚胎顶部的细胞被看到。

[0340] 考虑到这些实体观察,现在所描述的是图像模拟模型。对于每个细胞,使用重叠指数 h 将相应的椭圆形形状投影到模拟的图像上。相应的像素值被设定为1的二元值并且扩大以产生可与所观察到图像数据相比的膜厚度。重叠指数 h 指定细胞位于相互的顶部的次序。由于闭合的细胞膜仅有时可见,如果检测闭合的点,那么它们被放置在具有低概率(通常大约10%)的模拟的图像中。实际上,当这些闭合的膜点对于精确的形状建模来说是必须的时,重要的是使得它们足够稀疏以致它们不会类似于可见边缘。

[0341] 图像预加工

[0342] 现在将描述测量变量 z 。本发明的方法的目的是从显微镜图像提取细胞膜的二进制图像用于与模拟的图像比较。这些膜表现出高曲率和高对比,但是使用密度或颜色基础的阈值化技术并不容易提取。因此,使用了主曲率为基础的检测器。这一方法使用 Hessian 算符:

$$[0343] \quad \mathbf{H}(s, \sigma) = \begin{pmatrix} I_{xx}(s, \sigma) & I_{xy}(s, \sigma) \\ I_{xy}(s, \sigma) & I_{yy}(s, \sigma) \end{pmatrix},$$

[0344] 其中, I_{xx} 、 I_{xy} 和 I_{yy} , 是在像素位点 s 和高斯尺度 σ 估算的二级偏导数。2x2 高斯矩阵的特征值提供关于主曲率的信息,而特征值的符号将“谷”与“脊”区分开来。为

了检测明亮的峰或脊,每个轴的主曲率被计算为

$$[0345] \quad P(s) = |\min(\lambda_2, 0)|,$$

[0346] 其中, λ_2 是最小特征值。为了检测不同厚度的膜,使用了覆盖一定范围的尺度(即 $\sigma_{\min} < \sigma < \sigma_{\max}$) 的 Hessian 算符并且提取了整个这一范围的最大曲率。最终, Hessian 图像被阈值化以产生所提取的细胞膜的二值图像。阈值水平通常被设置为两倍于 Hessian 中的轴像素值的标准方差。

[0347] 粒子权重

[0348] 如题为“粒子滤波器框架”的部分中所描述的,粒子滤波器的第二个主要步骤是测量更新,其中相应于给定粒子模型的现有测量的概率指定粒子的重要性权重。在我们的实例中,重要性权重是通过将上文讨论的预加工的显微镜图像与同样是上文讨论的模拟图像相比较来确定的。

[0349] 之前已经研究过这一问题,其中粒子滤波器权重通过使用正常交互信息将模拟的图像与实际图像相比较来计算。这一方式与占据网格匹配的想法相似,其寻找都被占据(值 1)或都是空的(值 0)的像素位点。这些方法在所述模仿的和实际的图像在形状上相似但是稍微不重合时有麻烦。反而,正在描述的方法是用以倒角距离为基础的可能性函数,其测量从一个点集到另一个的最近距离的平均值。定义两个点集 A(尺寸 m 的真实数目的集合中)和 B(尺寸 n 的真实数目的集合中),分别相应于模拟图像和实际图像中的非零像素。从点集 A 至 B 的向前的倒角距离给定为:

$$[0350] \quad d(A, B) = \frac{1}{m} \sum_{a_i \in A} \min_{b_j \in B} \|a_i - b_j\|.$$

[0351] 相似地定义向后的倒角距离。本发明方法使用对称的倒角距离,其提供对模拟图像与真实图像匹配得多好以及真实图像与模拟图像匹配得多好的量度:

$$[0352] \quad d_{\text{sym}}(A, B) = d(A, B) + d(B, A).$$

[0353] 实际上,单个的距离测量被缩短以减少噪音的影响。为了减少计算时间,距离通过寻找图像的距离转化中的像素位点来确定。

[0354] 倒角距离被用作给定模拟模型的我们的数据测量的可能性测量。也就是说,在时间 t,对于给定的图像测量 z_t 和粒子模型 $x_{t[m]}$,粒子重要性权重被给定为:

$$[0355] \quad w_t^{[m]} \propto \exp[-\lambda \cdot d_{\text{sym}}(z_t, x_t^{[m]})].$$

[0356] 常数 λ 通常设置为 1 并且可变化以控制可能性分布的平面性。

[0357] 粒子重新采样和动态分布

[0358] 粒子滤波器中第三个主要步骤是重新采样,其中将粒子与它们的权重成比例地选择以产生新的粒子的集合。具有低概率的粒子被排除,而具有高概率的粒子被加倍。已经有开发用于重新采样的有效算法的大量前期工作。本方法使用低变量方法。

[0359] 粒子滤波器中的一个重要问题是粒子数目的选择。最简单的选择是使用固定值,称作 $M = 1000$ 。之后对于每个时间步骤, M 粒子的集合被转化至相同大小的另一个集合中。在本申请的上下文中,在细胞是无活性的或仅轻微改变的大小和位置期间可能有相对长的一段时间。利用这一观察的优点以通过根据细胞活性的量动态分配粒子的数目来减少处理

负荷。也就是说,当细胞是活性的并且分裂的时,我们增加粒子的数目而当粒子是无活性的时,我们减少粒子的数目。

[0360] 为了测量细胞活性的程度,计算新图像(通过显微镜获得)和之前的图像之间的像素密度的平方差的和(SSD)。为了减少噪音,首先用高斯滤波器将图像平滑并且随时间用因果移动平均值将 SSD 的值平滑。之后将粒子的数目与这一值成比例地动态调节并且缩短以停留在界线 $100 < M < 1000$ 中。图 30 是显示粒子的数目可如何被分配用于从 1 细胞至 4 细胞期的胚胎分裂的图表。应当注意到的是这一方法仅提供图像中“活性”的量的测量,但是没有区分细胞分裂和胚胎运动(转移和/或旋转),因为没有进行之前的图像配准。在这一情况(确定粒子的数目)下,这是可接受的,因为粒子的数目在任一个事件中都应当增加。实际上,在最可能的胚胎模型中我们同样以细胞的数目为基础调整了粒子的数目。也就是说,当更多的细胞据信存在于图像中时,产生更多的粒子。

[0361] 二维追踪的局限性

[0362] 上文描述的 2D 细胞追踪算法被用于确定胚胎中细胞的数目以及它们的 2D 形状。然而,其被没有潜在的实体表示的事实所局限。这对于自动追踪细胞分裂以便测定胚胎成活力来说可能是或可能不是重要的。例如,某些参数例如胞质分裂的持续时间和细胞分裂之间的时间可使用 2D 细胞追踪算法来测量。在下一个部分中,我们将我们的 2D 模型扩展为 3D。为了处理从 2D 图像模拟 3D 形状所产生的闭合和深度不确定性,使用了对细胞体积浓度的几何约束和约束条件。

[0363] 细胞表示和三维追踪

[0364] 这一部分描述了用于细胞分裂的 3D 追踪的算法。来自 2D 算法的步骤中的许多延续至这一算法中,具有几个关键的例外。有用于 3D 用途的新的细胞表示。细胞现在被表示为 3D 空间中的椭圆柱体,通过下列公式给出:

$$[0365] \quad \frac{(x - x_0)^2}{a^2} + \frac{(y - y_0)^2}{b^2} + \frac{(z - z_0)^2}{c^2} = 1.$$

[0366] 每个椭圆柱体同样具有朝向方向 θ 、螺距 ψ 和滚转 α 。因此,时间 t 的每个细胞模型的表示被给定为:

$$[0367] \quad \mathbf{x}_t^{[m]} = \begin{bmatrix} x_{01} & y_{01} & z_{01} & a_1 & b_1 & c_1 & \theta_1 & \psi_1 & \alpha_1 \\ x_{02} & y_{02} & z_{02} & a_2 & b_2 & c_2 & \theta_2 & \psi_2 & \alpha_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ x_{0N} & y_{0N} & z_{0N} & a_N & b_N & c_N & \theta_N & \psi_N & \alpha_N \end{bmatrix}$$

[0368] 这一修订的模型的一个重要影响是可能有与从 2D 图像推断的 3D 形状有关的不确定性。例如,形状上是球体的细胞将具有与具有较长主轴和较长螺距旋转的细胞相似的外观。这不是主要的重要的事,因为如将在下文所显示的,粒子分布将保持这些多个假设直到可获得足够的信息以产生区别(例如从事件诸如细胞分裂)。

[0369] 椭圆柱体被认为是严密的;也就是说,变形不能被清楚地建模。然而,我们允许相邻

椭圆体之间的少量的重叠并且在这些重叠的区中,我们假设细胞对彼此是平面化的。这是重要原因,因为其通常在胚胎中观察到并且我们在下列部分中解释它。

[0370] 细胞扰乱和分裂

[0371] 我们的 3D 细胞分裂和扰乱模型与部分 4 “细胞扰乱和分裂”中的模型相似,具有少数例外。3D 形状的模拟可被用于迫使体积守恒。这防止细胞生长得任意大,尤其是在 z 方向。体积守恒被用于两种情况。第一,用于细胞扰乱,单轴 a 和 b 是变化的并且计算 c 以便单个细胞的体积被保持。第二,用于细胞分裂,使用下列约束条件:

$$[0372] \quad \frac{4}{3}\pi a_p b_p c_p = \frac{4}{3}\pi(a_{d_1} b_{d_1} c_{d_1} + a_{d_2} b_{d_2} c_{d_2});$$

[0373] 其中下标 p 指示母细胞而下标 d1 和 d2 指示两个子细胞。事实上,我们通过使得胚胎总体积在原始体积的正/负 5% 之间波动而允许轻微违反这些约束条件。这被用于补偿原始体积模拟中的可能的不准确性。

[0374] 当 3D 中细胞被选择分裂时,其分裂以下列方式被建模。首先,对于所选择的单个细胞,使用沿椭圆形的长轴的分裂,其可以是 a、b 或 c,取决于构型。考虑到母细胞的旋转,子细胞被初始化以在尺寸和空间的均匀部分上相等。之后再次使用具有设定为初始值的 10% 的变量的正常分布将它们的参数扰乱以覆盖大范围的可能的构型。

[0375] 几何约束

[0376] 闭合和深度不确定性的问题通过体积的守恒而部分缓和。然而,同样需要关于相邻的椭圆体的空间关系的约束条件。第一个约束条件是细胞不得在直径上重叠超过 20%。对于重叠可接受的量的细胞,做了它们对彼此平面化的假设。所描述的粒子模型通过在图像模拟期间忽略相交椭圆体内部的点表示这一现象。这是经验激发的并且与实体观察行为良好相关。

[0377] 强加了保持细胞非常近似的第二约束条件。这一约束条件直接与人类胚胎的实体行为有关,其中细胞被称为透明带的膜约束。所述带被建模为球壳并且使用其强加边界条件。所述带的半径被设定为比 1 细胞胚胎的半径大 30%。

[0378] 如下文实施这些约束条件。如上文所描述的,对于给定时间的每个粒子,随机对照输入被用于产生新的粒子。如果实体约束条件中的任一个被违反,新的粒子被排除并且使用新的随机对照。如果在一定数目的尝试之后没有产生满意的新的粒子,那么粒子被排除。

[0379] 图像模拟

[0380] 实施例中所用的暗视野照明的优点是细胞膜比细胞内部散射更多光。这一影响在细胞膜与光轴(z-轴)平行的位点最显著。因此,为了模拟图像,在我们的 3D 模型中搜寻这些位点,因为它们的旋转其不是必然定位于在椭圆体的赤道。考虑到可见并且闭合的边缘,如上文讨论的,之后遵循了相似的规则。

[0381] 2D 中的细胞追踪实施例

[0382] 这一实施例与自动细胞显微镜有关并且使用上文描述的用于细胞分裂的 2D 追踪的算法。设计这一模型以追踪图像中细胞的数目以及细胞膜的 2D 轮廓。第一步是图像获取,其激发随后的部分例如图像模拟和图像预加工。用具有 10X 物镜的定制的 Olympus IX-50 倒置显微镜获取用于这一实施例的时差图像序列。显微镜被调整用于暗视野照明,其中中空的光锥通过在光源和聚光透镜之间放置圆孔而聚焦在样品上。物镜收集通过样品散

射的光并且直接反射透射光,在暗背景上产生明亮的图像。暗视野照明的优点是细胞膜往往比细胞内部散射更多的光,由此增加它们的对比。用加热台和定制的孵育箱装备显微镜以允许在多达 5 或 6 天的时间段中培养胚胎。通过架设在 IX-50 侧面的 Olympus SLR 数码相机图像以 5 分钟的间隔捕获图像。

[0383] 胚胎的成像在它们是合子或者具有粗略球形形状的合子时开始。为了将粒子的集合初始化,如第 6 部分“图像预加工”中描述的计算阈值化的 Hessian 并且使用最小二乘法拟合圆。之后使用从均匀分布取样的随机趋向将所有粒子初始化为圆。

[0384] 图 31 显示用于追踪从 1 细胞至 4 细胞期的细胞分裂的 2D 算法的结果。结果显示细胞膜通过所述算法成功提取,甚至是对于朝向底部的部分闭合的细胞。应当注意到的是在大多数粒子滤波器应用中,“单个”最佳模型常常被表示为来自粒子分布的状态参数的加权的和。然而,对于本文中的结果,展示了具有最高概率的粒子。

[0385] 3D 中的细胞追踪实施例

[0386] 图 32 显示上文描述的用于追踪从 1 细胞至 4 细胞期的 3D 算法的两个成功的应用。图 33 是显示粒子在 1 细胞至 2 细胞分裂期间如何分布的实施例(相应于图 32 中显示的第一个实施例)的图表。这一张图显示每个细胞中心的 3D 位置。当细胞开始分裂,预测显示出关于哪个子细胞将位于另一个顶部的不确定性,但是这在一对构架中被解决。

[0387] 提取预测参数

[0388] 一旦使用之前描述的方法将胚胎建模,就可从模型提取某些参数。通常,使用最好或最大可能性的模型。这些参数包括例如第一次胞质分裂的持续时间、第一次和第二次细胞分裂之间的时间以及第二次和第三次细胞分裂之间的时间。通过测量细胞的模型在其分裂为两个细胞之前伸长多长时间来大致估算胞质分裂的持续时间。伸长可通过关注椭圆形的主轴和短轴的比例来测量。可从模型提取的其他参数包括受精和第一次细胞分裂之间的时间、细胞的形状和对称性以及分裂过程、分裂的角度、破碎等等。可使用 2D 细胞追踪算法或 3D 细胞追踪算法提取参数。

[0389] 通过胞质分裂沟首次出现至子细胞完成分离来定义胞质分裂。由于我们的胚胎模型是由不变形的椭圆形组成的,鉴定胞质分裂沟的出现是具有挑战性的任务。一种方法将允许椭圆形变形,但是这导致更复杂的追踪问题。另一种方法将是寻找预加工的显微镜图像中曲率的变化;然而,这破坏了努力直接从胚胎模型测量我们的预测参数的目的。因此,我们通过将第一次胞质分裂的持续时间大致估计为 1 细胞至 2 细胞分裂之前的细胞伸长的持续时间来将问题简化。伸长通过计算椭圆形的主轴与短轴的比例来定量。如果:

[0390] $\frac{a-b}{b} \geq 15\%$ 则细胞被认为是伸长的。

[0391] 15%这一值是经验选择的并且对于这一特定的数据集来说运行良好;然而可使用其他值。一旦胚胎模型分裂为 2 细胞,我们可通过计算 1 细胞模型的伸长的持续时间来提取第一次胞质分裂的大致估计的持续时间。

[0392] 原则上,测量有丝分裂事件之间的时间是简单的。例如,第一次和第二次有丝分裂之间的时间被测量为 2 细胞模型和 3 细胞模型之间的时间。然而,在某些实例中,胚胎可表现出不寻常和随机的行为。这包括例如从 1 细胞进行到 2 细胞,从 2 细胞进行到明显的 3

细胞或 4 细胞以及之后回到 2 细胞的胚胎。所描述的算法能够追踪这一类型的行为,但是它确定有丝分裂事件之间的时间间隔提出了挑战。

[0393] 处理这一行为的一种方式如下:代替测量 2 细胞和 3 细胞模型之间的时间(为了寻找第一次和第二次有丝分裂之间的时间),这可通过简单地计算图像构架(其中 2 细胞模型是最可能的)的数目来大致估计。这在某些实例中运行良好但是不总是代表有丝分裂事件之间的真实时间。可通过在以细胞的数目为基础的模型上强加限制来处理这些事件。也就是说,当从每次迭代的分布选择最好或最可能的模型时,可需要模型中的细胞的数目总是保持相同或增加,但是从不下降。强加这一约束条件后,计算有丝分裂事件之间的时间是简单的。这一约束条件也用于将可能显示少量抖动的追踪结果过滤,例如其可在模型在 1 细胞和 2 细胞模型之间来回切换时偶尔发生。

[0394] 用于追踪预测参数的方法

[0395] 图 35 显示概括了上文描述的方法的流程图。流程图显示可如何分析单个胚胎(尽管这可被用于多个胚胎或其他类型的细胞和干细胞)。在第一步中,用时差显微术获取胚胎的图像(“测量”)。这一图像可被保存至文件并且在后面的时间点重新打开。图像通常被预加工以增强某些特征,尽管这不是必须的。预测可能的胚胎构型的模型并且从这些模型模拟图像(“预测”)。所模拟的图像可包括如上文描述的细胞膜的图像或者更精确地代表预加工之前的显微镜图像的图像。之后将模型与预加工的显微镜图像相比较(“比较”)。使用这一比较,保留最好的预测,同时排除不良预测。之后所得到的预测的集合被用于改善对下一个图像的预测。对多个连续图像进行这一过程之后,直接从最好的一个或多个模型测量形态学参数是可能的,例如胞质分裂的持续时间和有丝分裂事件之间的时间。如之前所讨论的,这些参数可被用于评估胚胎的成活力。

[0396] 实施例 7

[0397] 细胞活性的自动分析

[0398] 上文描述的方法需要经由显微镜追踪细胞发育的能力。对于胚胎,所期望的是追踪在同一个皿中一起培养的多个胚胎。本文所用的分析方法同样需要周期获取的图像(例如对于胚胎每 1-30 分钟一次,持续 1-5 天;不同的时间间隔可被用于其他类型的细胞例如干细胞)。因此设计成像方法以自动追踪胚胎发育。

[0399] 在时差显微术中,细胞在控制的条件下生长并且在延长的一段时间内被成像以监测进程例如活动力(在环境中的运动)、增殖(生长和分裂)和形态学上的变化(大小和形状)。归因于实验的长度和所产生的巨大的图像数据,提取参数例如细胞分裂的持续时间和之间的时间可能是冗长的任务。这对于其中多个样品被同时成像的高通量的应用来说尤其真实。因此,有对能够自动提取所期望的信息的图像分析软件的需要。

[0400] 评估胚胎成活力的一种方式测量图像中“细胞活性”的量。这可简单地通过获取连续成对的图像并且比较它们的像素值来完成。更特别地,为了测量每个新图像的细胞活性的量,计算新图像(标记为 I)和之前的图像(标记为 I')之间的像素密度的差值平方和(SSD),整个所有重叠的像素 i:

$$[0401] \quad SSD = \sum_i [I'(x'_i, y'_i) - I(x_i, y_i)]^2 = \sum_i e_i^2.$$

[0402] 为了减少噪音,图像可首先用高斯滤波器来平滑。图 28 显示单个胚胎第 1 天至第

3 天的细胞活性的曲线图。如所显示的,有相应于人类胚胎中 1 细胞至 2 细胞分裂、2 细胞至 4 细胞分裂和 4 细胞质 8 细胞分裂的尖锐的峰。峰的宽度代表细胞分裂的持续时间。

[0403] 该方法的局限性之一是 SSD 度量仅测量图像中的活性的量并且事件例如胚胎运动(诸如移位或旋转)看上去可与细胞分裂非常相似。对于这一问题的一种解决方法是在计算 SSD 之前进行图像配准。图像配准是寻找两个图像之间的几何关系以便将它们在相同的坐标系中校准的过程并且可使用多种不同的技术完成。例如,可使用 Levenberg-Marquardt 迭代非线性程序的一种变型,其通过将重叠的像素密度的 SSD 最小化将图像配准。LM 算法使用 3x3 单应性矩阵转化像素位点:

$$[0404] \quad \begin{bmatrix} \tilde{x}' \\ \tilde{y}' \\ \tilde{w}' \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} h_0 & h_1 & h_2 \\ h_3 & h_4 & h_5 \\ h_6 & h_7 & 1 \end{bmatrix} \begin{bmatrix} x \\ y \\ 1 \end{bmatrix},$$

[0405] 其中目的像素位点 x' 和 y' 被标准化为:

$$[0406] \quad x' = \frac{\tilde{x}'}{\tilde{w}'}, y' = \frac{\tilde{y}'}{\tilde{w}'},$$

[0407] 因此

$$[0408] \quad x' = \frac{h_0x + h_1y + h_2}{h_6x + h_7y + h_8},$$

$$[0409] \quad y' = \frac{h_3x + h_4y + h_5}{h_6x + h_7y + h_8}.$$

[0410] 单应性矩阵可被用于多种图像转化并且这一应用中的合理的选择将是刚体(欧几里德)转化。这将转移和平面旋转(沿照相机轴)中的胚胎的图像校准。然而,稍微一般化并且使用仿射变换是可能的,其允许图像相位差。该一般化取决于努力测量的信号而可能是或可能不是预期的。因此运动公式是:

$$[0411] \quad x' = h_0x + h_1y + h_2$$

$$[0412] \quad y' = h_3x + h_4y + h_5.$$

[0413] LM 算法首先使用链式法则计算 e 对于未知运动参数 h_k 的偏导数:

$$[0414] \quad \frac{\delta e}{\delta h_k} = \frac{\delta I'}{\delta x'} \frac{\delta x'}{\delta h_k} + \frac{\delta I'}{\delta y'} \frac{\delta y'}{\delta h_k}.$$

[0415] 对于仿射运动参数,这些偏导数是:

$$[0416] \quad \frac{\delta e}{\delta h_0} = x \frac{\delta I'}{\delta x'},$$

$$[0417] \quad \frac{\delta e}{\delta h_1} = y \frac{\delta I'}{\delta x'},$$

$$[0418] \quad \frac{\delta e}{\delta h_2} = \frac{\delta I'}{\delta x'},$$

$$[0419] \quad \frac{\delta e}{\delta h_3} = x \frac{\delta I'}{\delta y'}$$

$$[0420] \quad \frac{\delta e}{\delta h_4} = y \frac{\delta I'}{\delta y'}$$

$$[0421] \quad \frac{\delta e}{\delta h_5} = \frac{\delta I'}{\delta y'}$$

[0422] 随后,使用这些偏导数,LM 算法通过加上来自每个像素的贡献来计算近似的 Hessian 矩阵 A (在大小 6×6 的真实数目的集合中) 和加权的梯度矢量 b (在大小 6×1 的真实数目的集合中):

$$[0423] \quad a_{kl} = \sum_i \frac{\delta e_i}{\delta h_k} \frac{\delta e_i}{\delta h_l}$$

$$[0424] \quad b_k = - \sum_i \frac{\delta e_i}{\delta h_k}$$

[0425] 最后,通过加入增加的运动更新运动参数:

$$[0426] \quad \Delta H = (A + \lambda I)^{-1} b,$$

[0427] 其中常量 λ 调节运动更新的步长并且 I 是单位矩阵。

[0428] 在算法的每次迭代中,根据所更新的运动评估将第一图像扭曲并且通过计算重叠区域中的像素密度的 SSD 与第二图像比较。本应用假设连续图像之间的胚胎运动是非常小的并且因此仅进行小的固定量的迭代。图 28 显示没有 (28A) 和有 (28B) 对每对图像进行图像配准的细胞活性的曲线图。由于 Levenberg-Marquardt 程序的方差公式是 SSD,简单地将每次校准的残差绘图。图 29 比较了正常和不正常胚胎发育的细胞活性的曲线图。在第 3 天,在胚胎学家通常评估形态学的点,胚胎看起来相似并且可能地都被认为是有活力的。然而,它们的细胞活性曲线图却大大不同,因为胚胎中的一个胚胎经历典型的一系列细胞分裂而其他胚胎从 1 细胞胚胎分裂为多细胞并且破碎。如所期望的,具有正常活性曲线图的胚胎最终在第 5.5 天前达到胚泡。

[0429] 在计算像素密度中的 SSD 之前可使用其他类型图像配准。这包括例如交互相关、标准化交互相关、交互相位相关、交互信息、特征检测和追踪、尺度不变特征变换 (SIFT)、光流法和梯度下降。在配准之前,图像预加工例如特征或对比增强可以是或者可以不是所预期的。

[0430] 用于评估胚胎成活力的模型

[0431] 图 13 显示以相关的成像和分子分析为基础的人类胚胎发育的模型。所显示的是从合子发育至胚泡的时间线,包括用于预测成功发育至胚泡的关键的短暂时间和胚胎发育的图表。如图解的,主要分子数据表明人类胚胎用遗传自母亲的不同集合的卵母细胞 RNA 开始生活。这一 RNA 的集合在卵中通过特异的 RNA 管理程序被保持并且正确地包装。受精之后,对卵特异性的亚集合母系 RNA (ESSP1:胚胎期特异性模式 1) 的降解必须随卵母细胞向胚胎的转换开始而降解。同时,其他 RNA 随发育继续被理想地平均分配给每个卵裂球 (ESSP4)。RNA 的成功降解和分配随细胞自主方式的胚胎基因组活化 (EGA) 和 ESSP2 基因的转录而结束。值得注意的是,在卵裂分裂期间,胚胎卵裂球可独立地停滞或进行。胚胎中细

胞自主发育的结果是单个的卵裂球可停滞或前进并且随着 8 细胞胚胎前进至桑椹胚期, 胚胎质量将受到停滞或前进超过 8 细胞的细胞数目的影响。成像数据证实有预测成功或失败的发育的关键时期: 第一次胞质分裂、第二次卵裂分裂以及第二次和第三次卵裂分裂的同步性。这些参数可使用之前描述的细胞追踪算法和软件自动测量。所描述的系统和方法可用于用关键成像预测因子诊断胚胎结果并且可允许转移发育中较早 (EGA 之前) 的较少的胚胎。自动与手动图像分析的比较。

[0432] 图 34 显示 14 个胚胎的集合的自动图像分析与手动图像分析的比较。胚胎 1 至 10 (如曲线图上所标记的) 达到胚泡期, 具有不同的形态学。胚胎 11 至 14 停滞并且没有达到胚泡期。图 34A 显示测量第一次胞质分裂的持续时间的比较, 而图 34B 显示测量第一次和第二次有丝分裂之间的时间的比较。如所示的, 两个方法通常显示出良好的一致性。第一次胞质分裂的持续时间的少量的偏差是预期的, 因为如之前所讨论的, 它们可归因于我们的自动分析通过测量延长而产生近似值。在几个实例中, 胞质分裂的持续时间以及第一次和第二次有丝分裂之间的时间两者的自动和手动分析之间有较大的一致。这出现在几个不正常的胚胎上并且由手动难以表征而且难以自动追踪的异常行为所导致。对于这一组胚胎和仅使用头两个标准 (第一次胞质分裂的持续时间和第一次和第二次有丝分裂之间的时间), 自动算法具有零假阳性。这在假阳性必须被避免的 IVF 程序中将是非常重要的。手动图像分析具有一个假阴性 (胚胎 9) 而自动算法具有两个假阴性 (胚胎 9 和 10)。然而, 尽管胚胎 9 和 10 技术上达到胚胎期, 但是它们与其他的胚泡相比显示不良形态学并且将是转移的较不佳的候选者。对于手动图像分析, 胚胎 14 将是这两个标准为基础的假阳性并且需要第二次和第三次有丝分裂之间的持续时间的第三参数以给出真正的阴性。然而, 自动算法仅使用头两个标准就做出了正确的预测。这些结果表明我们的自动算法可成功地预测胚泡与非胚泡以及不同质量的胚泡之间的区别。因此, 对于多个胚胎被确定具有良好发育潜力的情况, IVF 程序期间计算它们相对质量的等级以便选择最好的 1 或 2 个胚胎用于转移是可能的。

[0433] 前述的仅仅是说明本发明的原则。应当理解的是, 本领域技术人员能够设计各种方案, 其虽然没有在本文明确地描述或显示, 但实现了本发明的原理并被包括在本发明的精神和范围之内。此外, 在本文叙述的所有实施例和条件性语言原则上旨在帮助读者理解本发明的原理和发明人为改进现有技术所贡献的概念而不被视为限制到这些特别叙述的实施例和条件。此外, 本文叙述本发明的原理、方面和实施方案以及其特定的实施例的所有陈述预期涵盖其结构和功能等同物。另外, 预期这些等同物包括当前已知的等同物和将来开发的等同物, 即, 不考虑结构而实现相同的功能所开发的任何元件。因而, 本发明的范围并非预期限制于在本文显示和描述的示例性实施方案。而是, 本发明的范围和精神由所附的权利要求书体现。

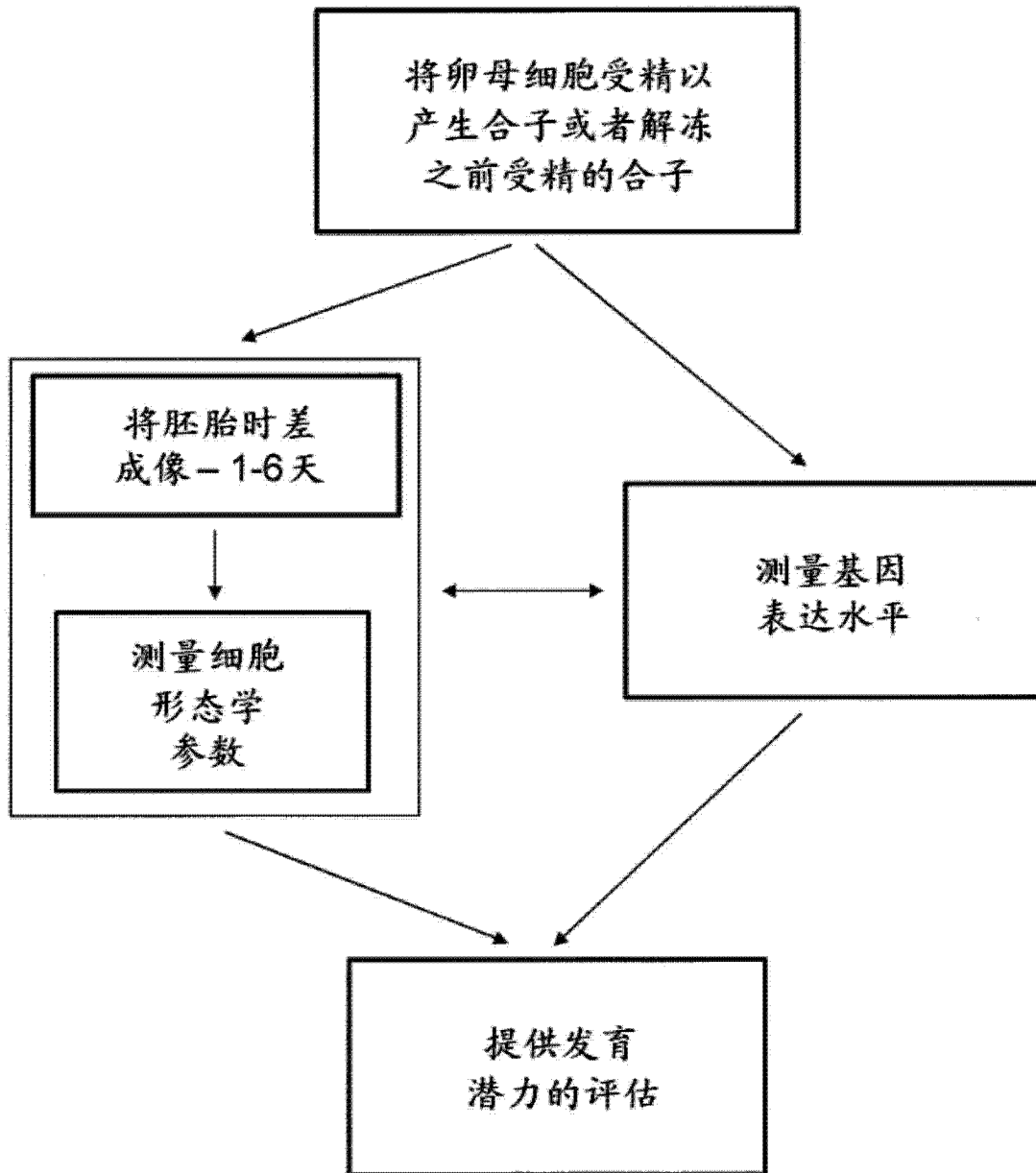


图 1

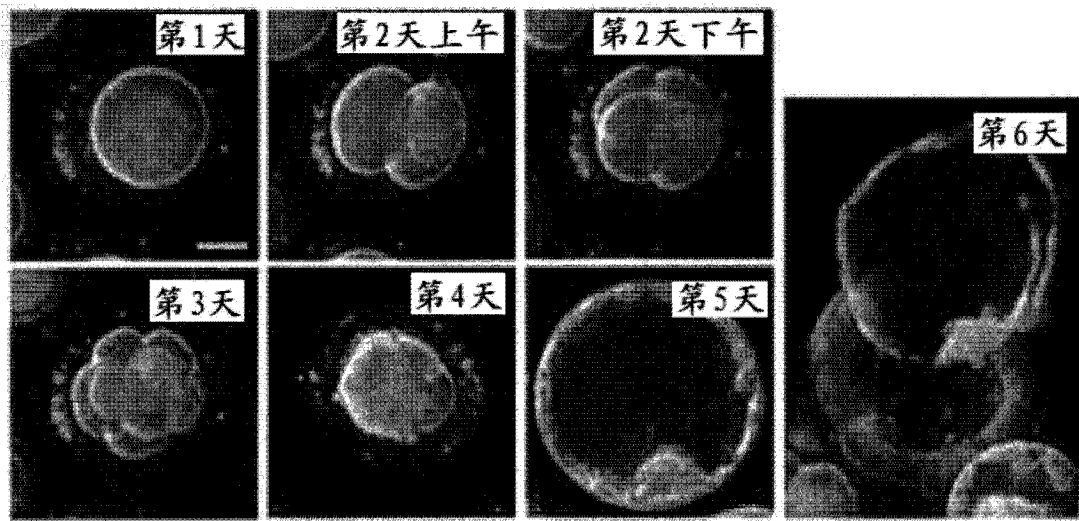


图 2

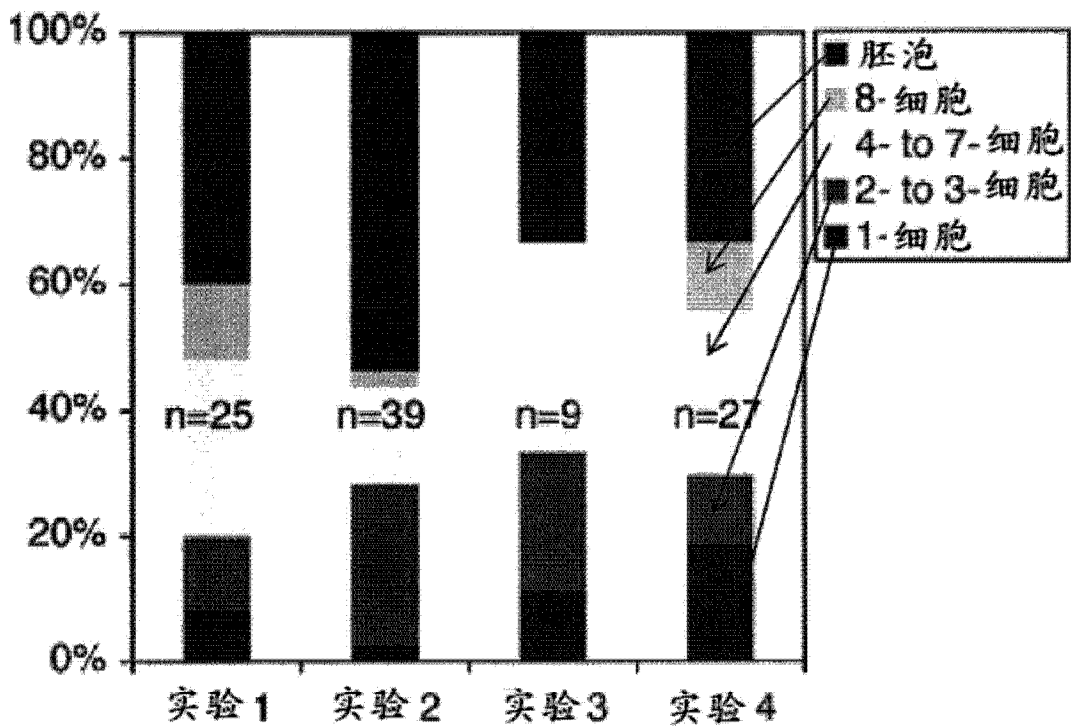


图 3

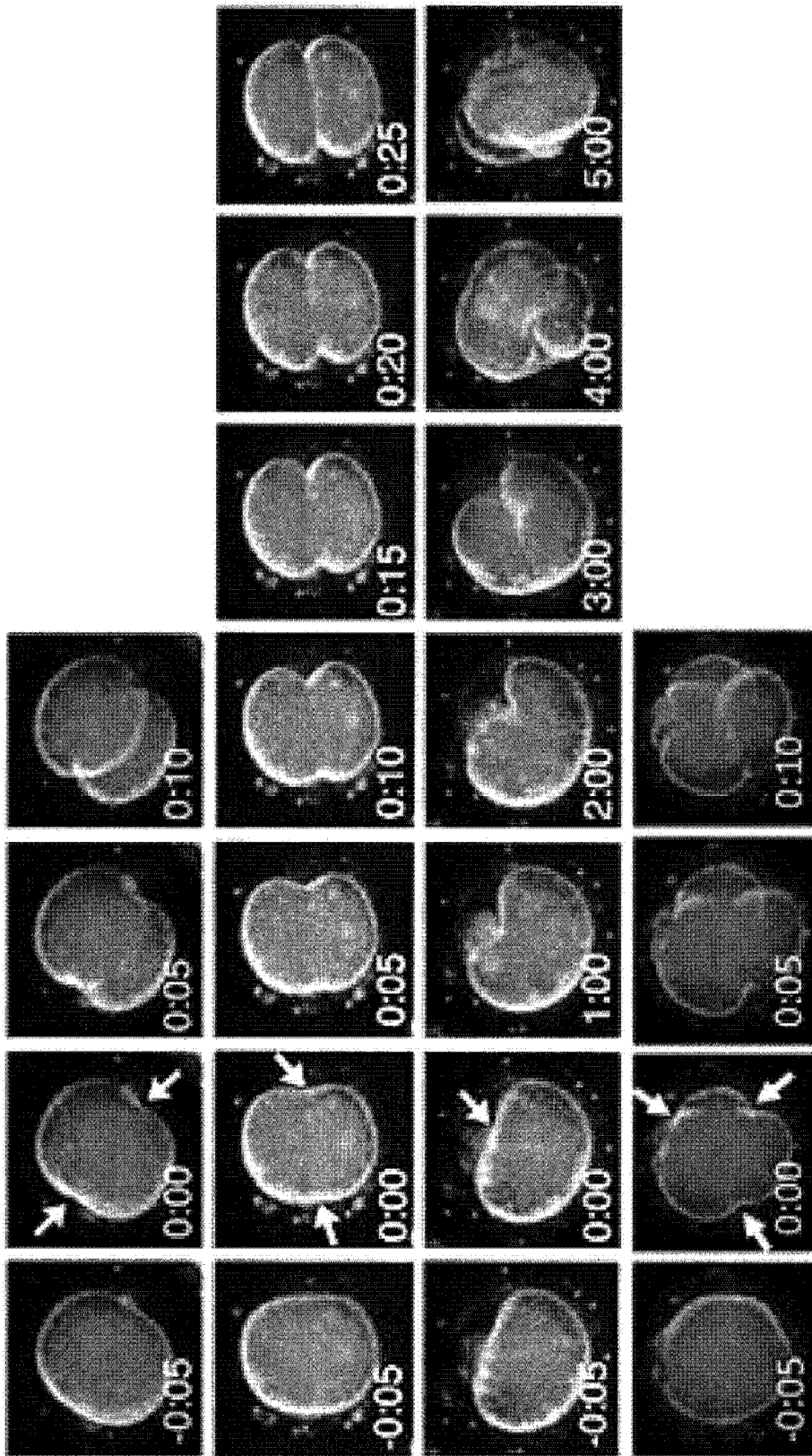


图 4

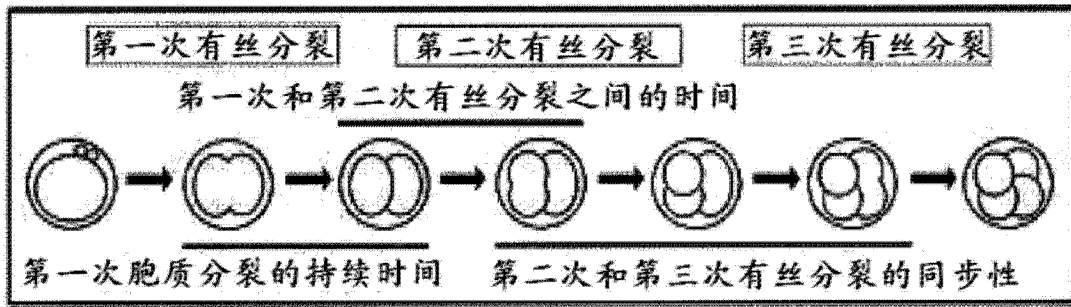


图 5

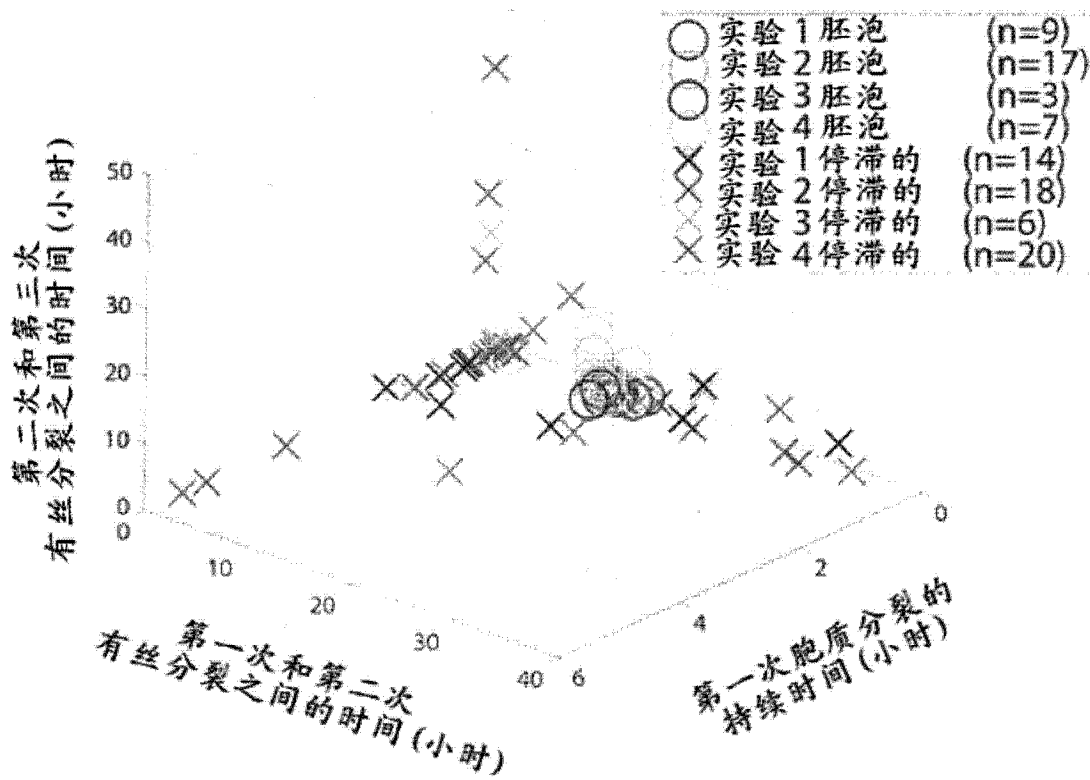


图 6

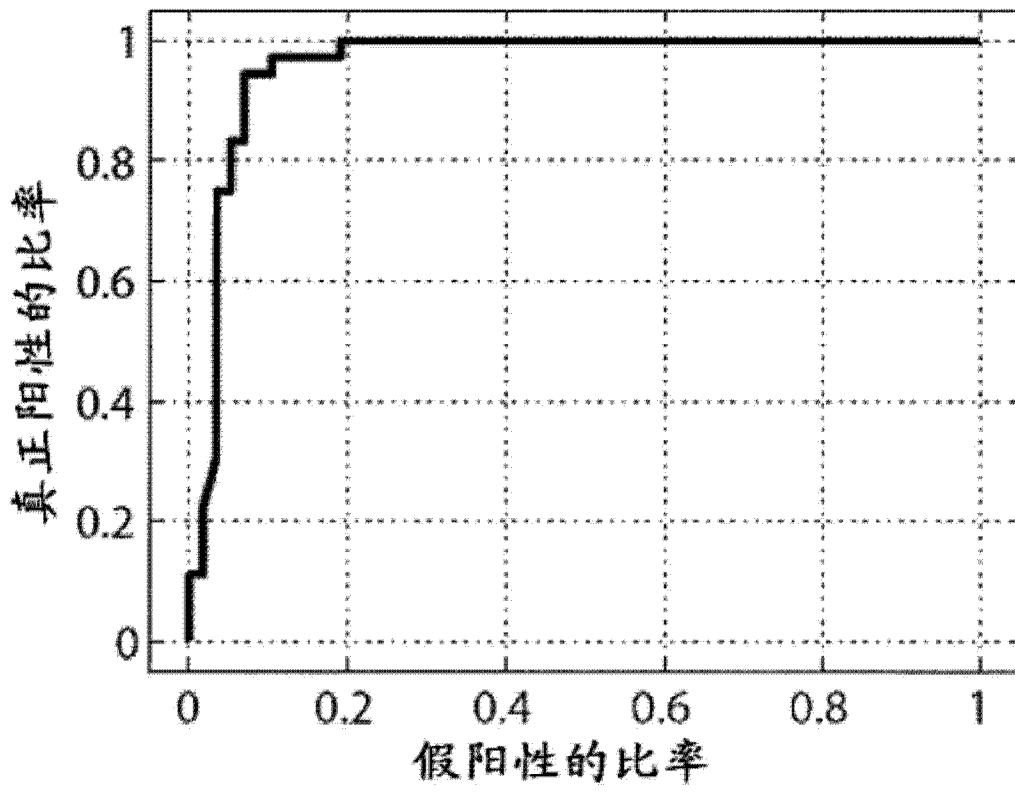


图 7

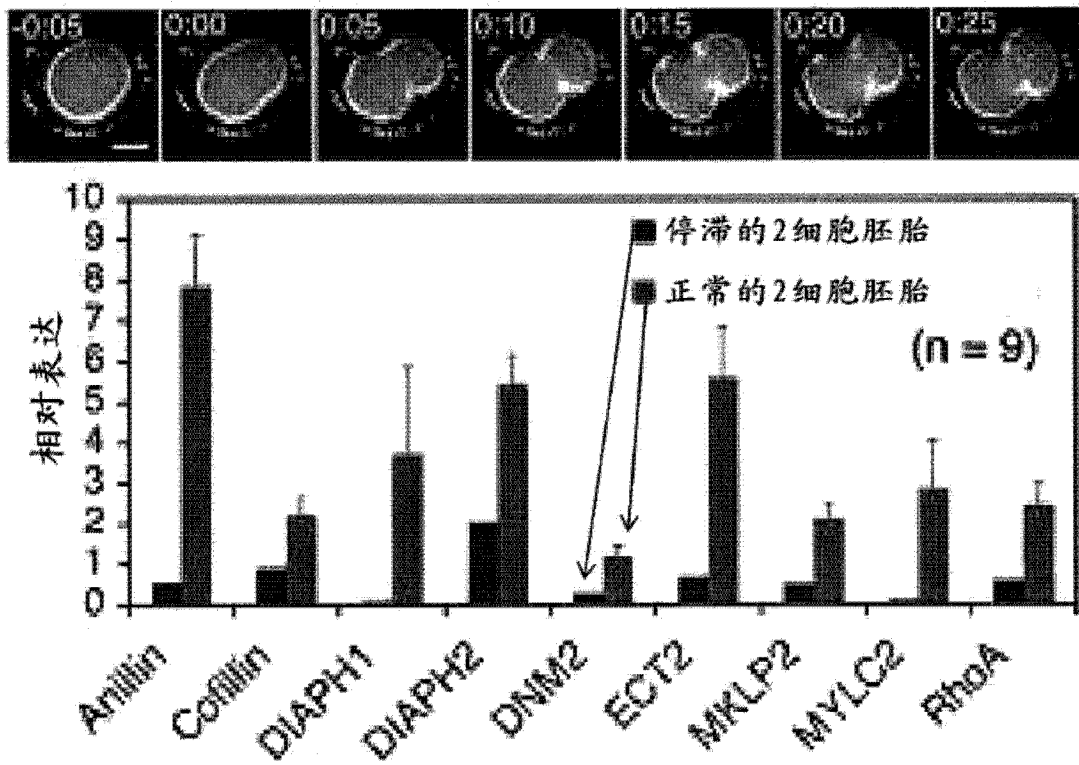


图 9

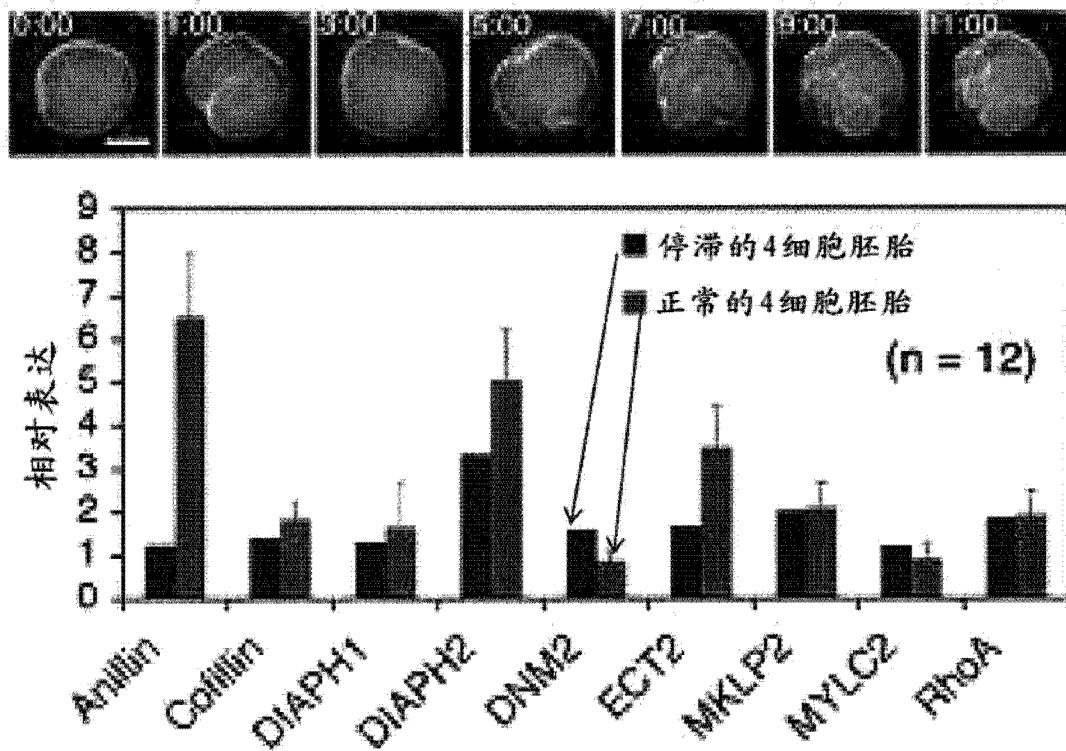


图 10

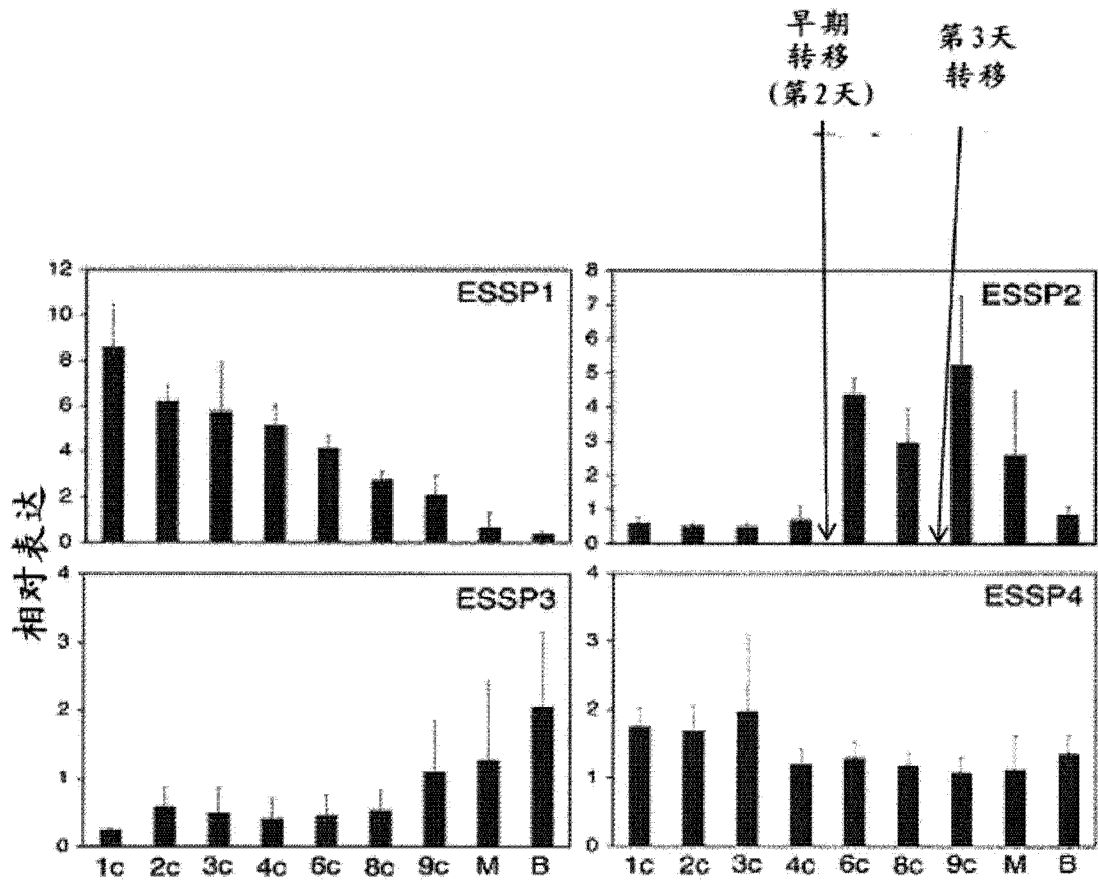


图 11

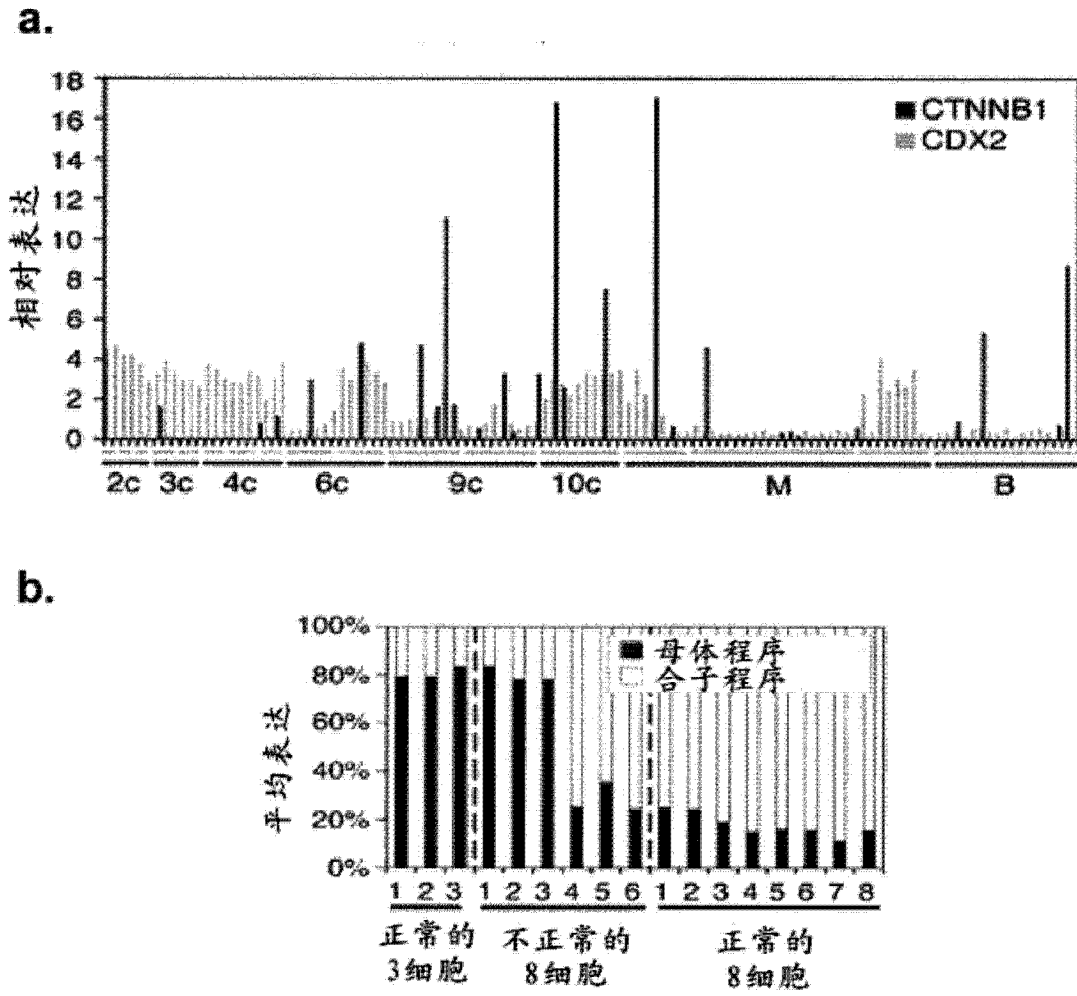


图 12

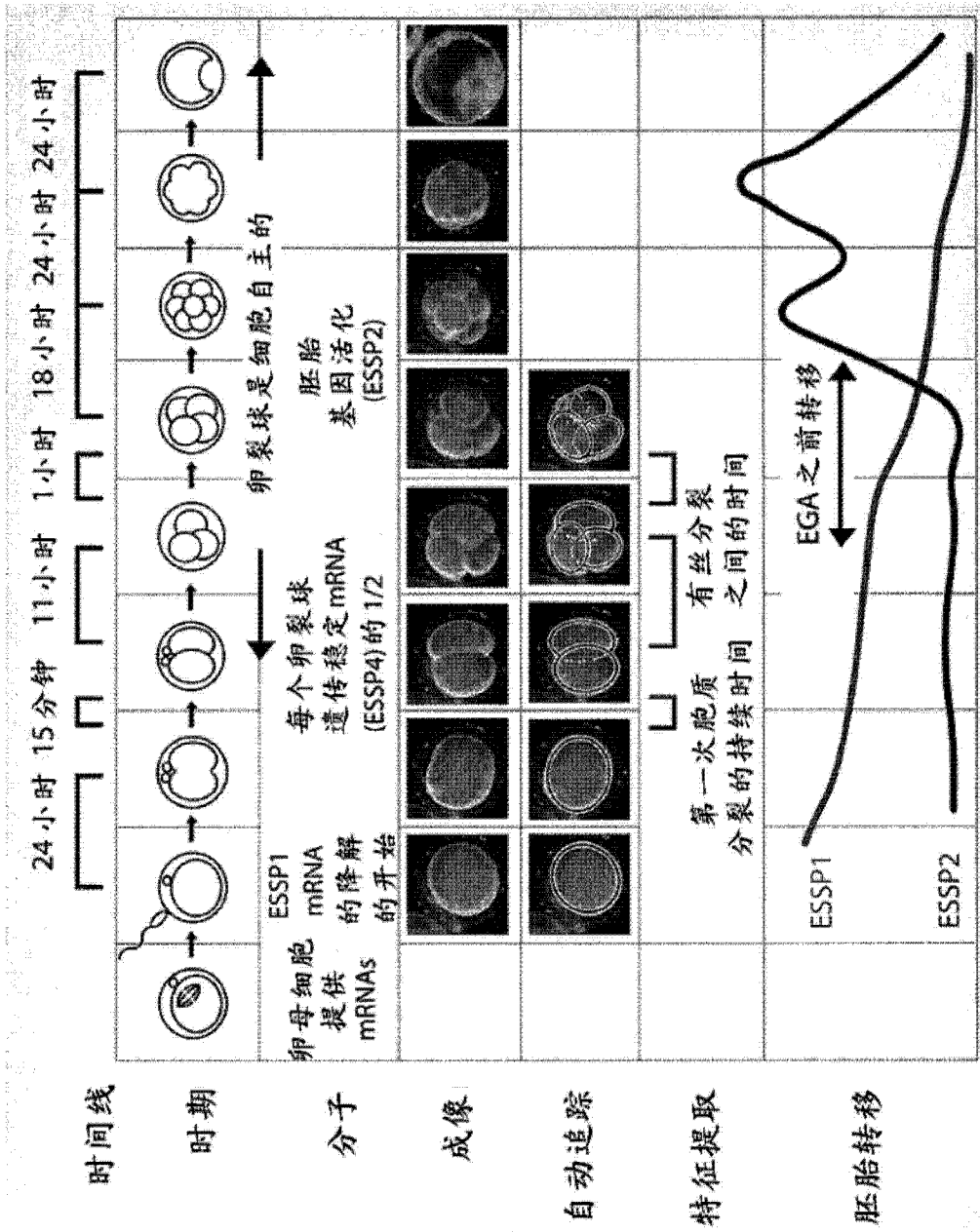


图 13

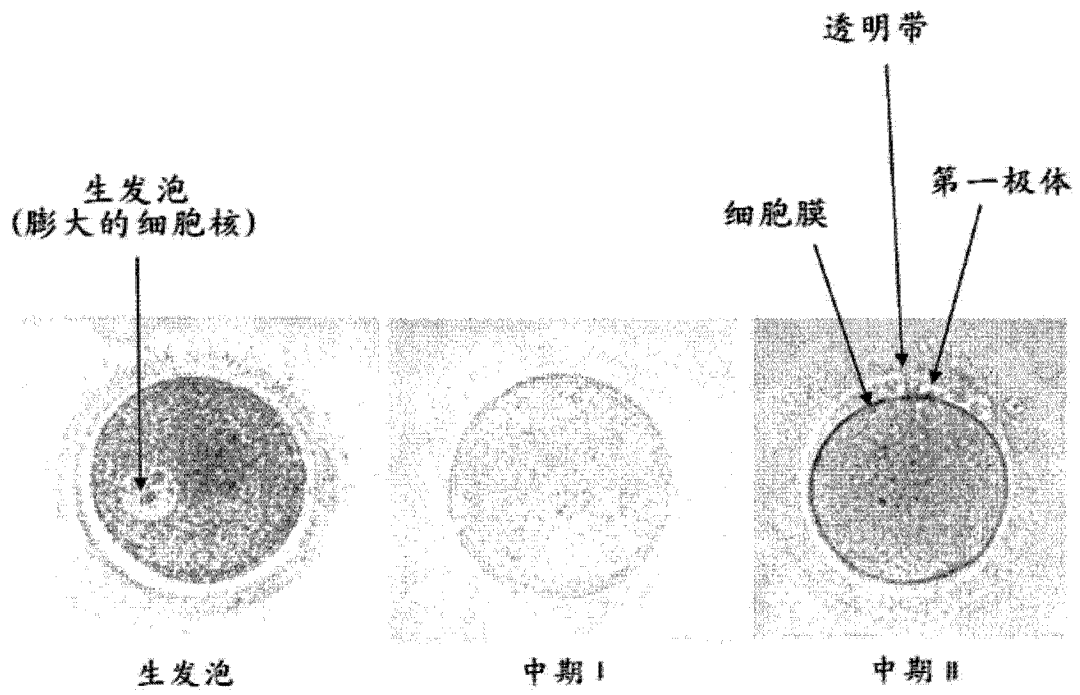


图 14

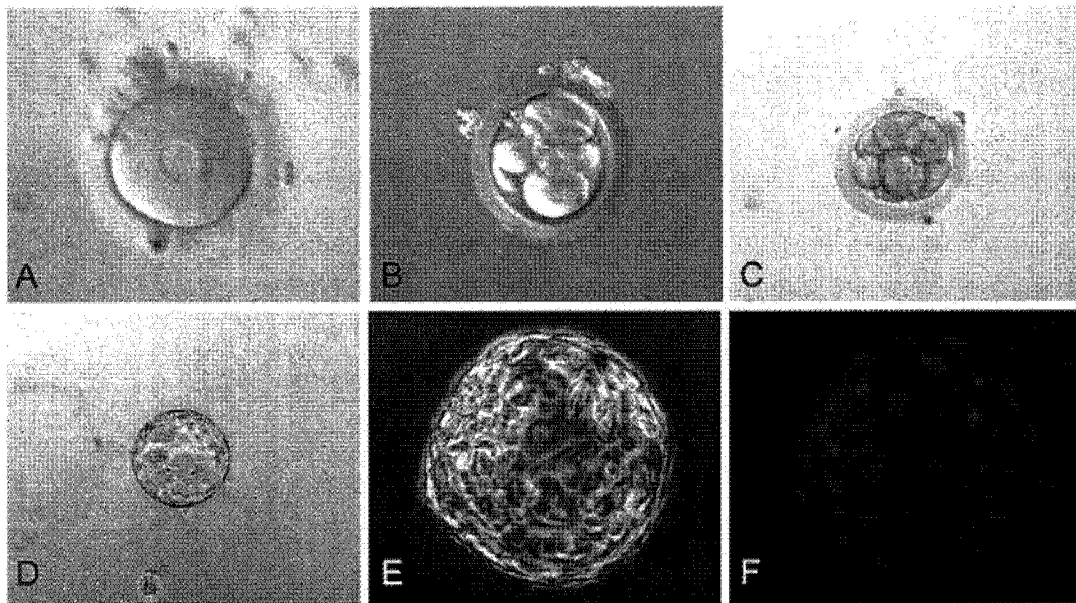


图 15

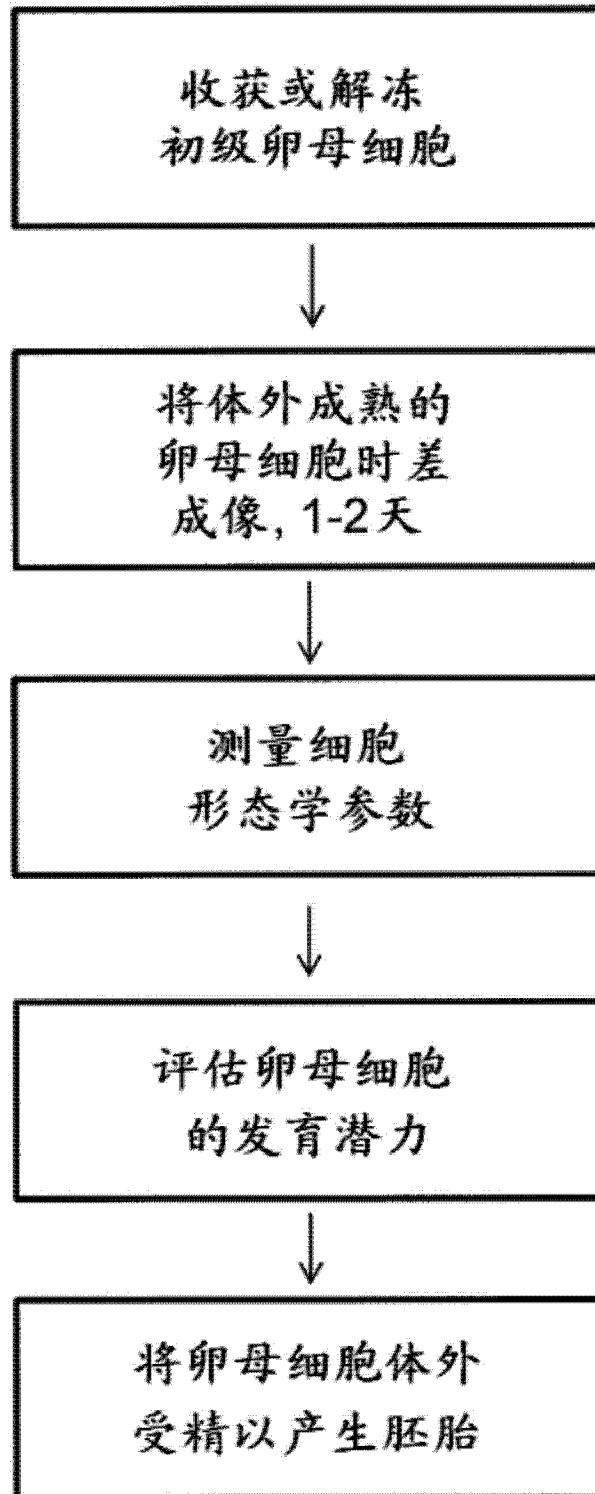


图 16

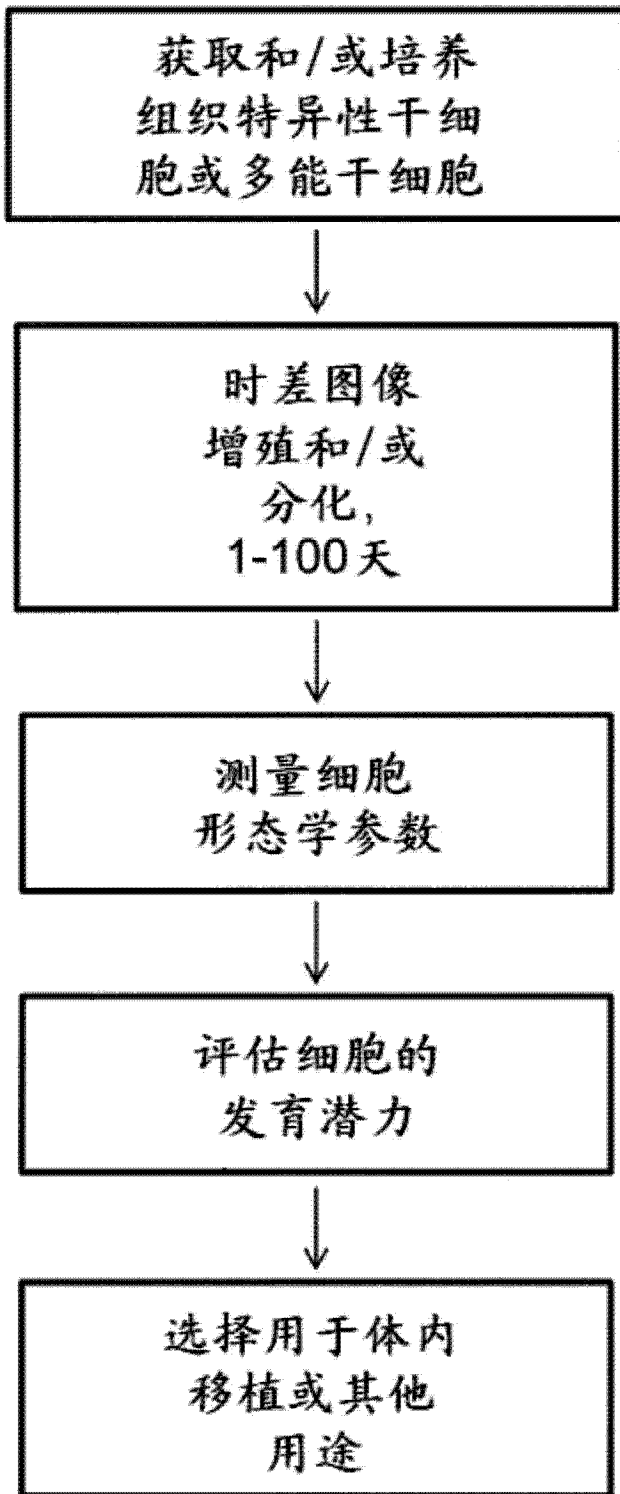


图 17

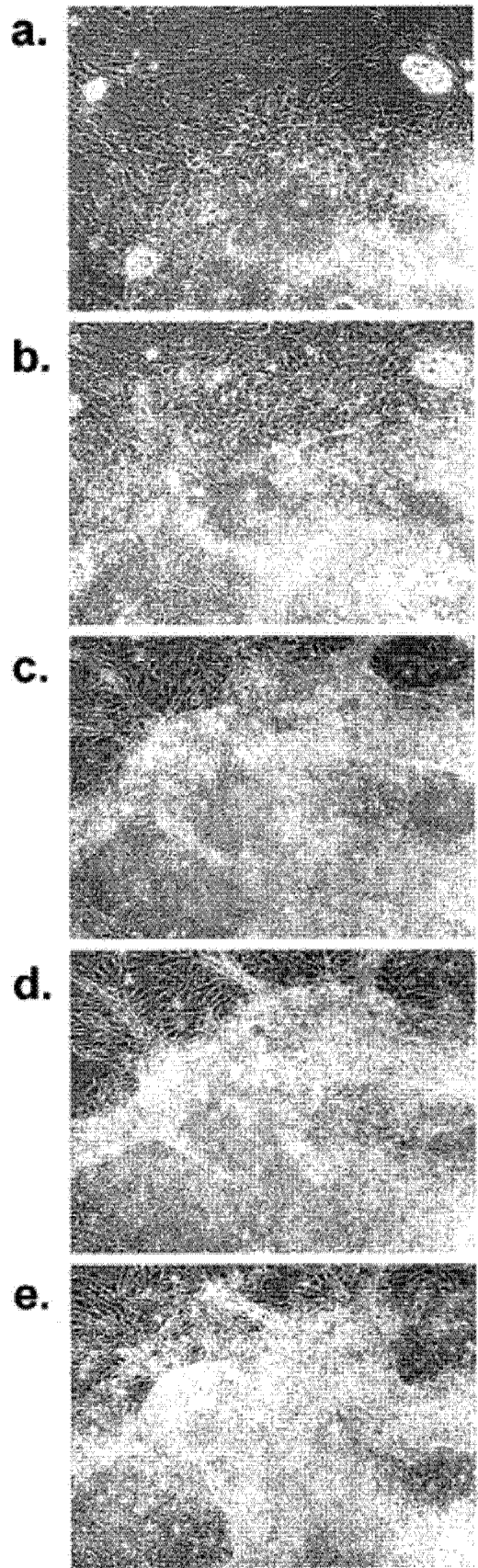


图 18

表 1

分类	基因的 #
细胞凋亡	5
胞质分裂	10
分化	9
胚胎基因活化	10
表观遗传	5
生殖细胞	9
管家	10
配体/受体	11
母体效应	8
miRNA	5
多潜能性	7
RNA 加工	7
性别特异性	2
TE / ICM	14
转录因子	11

图 19

模式 1	模式 2	模式 3	模式 4
Anillin	CCNA1	B-肌动蛋白	CTK7
ATG5	CCR4	Bcl2	FABP5
ATP2C1	DNM2	GCM1	FGFR2
Aurora A	EIF1AX	HDAC7A	GAPDH
Bclaf1	EIF4A3	IFITM1	HMOX2
Cofilin	EOMES	POU5F1	Hsp70
CPEB1	GDF3	SALF	IGF2R
DAZL	GTF2A1	TGFBR2	LSM3
Dqcr8	H2AFZ		PABPC1
DIAPH1	JARID1B		PRMT5
DIAPH2	Nanog		RPLPO
Dicer	NES		YY1
DNAJ44	Prdm14		未定义的
DNMT3B	PTMA		ATF4
Drosha	RUNX2		ATF7IP
ECT2	SERPINA1		ATF7IP2
EHMT2	SERTAD1		B2M
EGFR1	SOX2		BNC2
FYN	STELLAR		BTB3
GABPB2	YY1		CDX2
GDF9			CTNNB1
HMOX2			Dby
HPRT1			Hsp70.1
HSF1			PRDM1
IGF1R			Symplekin
IGF2R			TARBP2
LAMB1			Xist
MKLP2			
MYL2			
NLRP5			
PARN			
POCD5			
PVR			
RhoA			
Sycp3			
TACC3			
TAF4			
TBP			
TERT			
VASA			
XPO5			
YBX2			
Zar1			
ZP1			

图 20

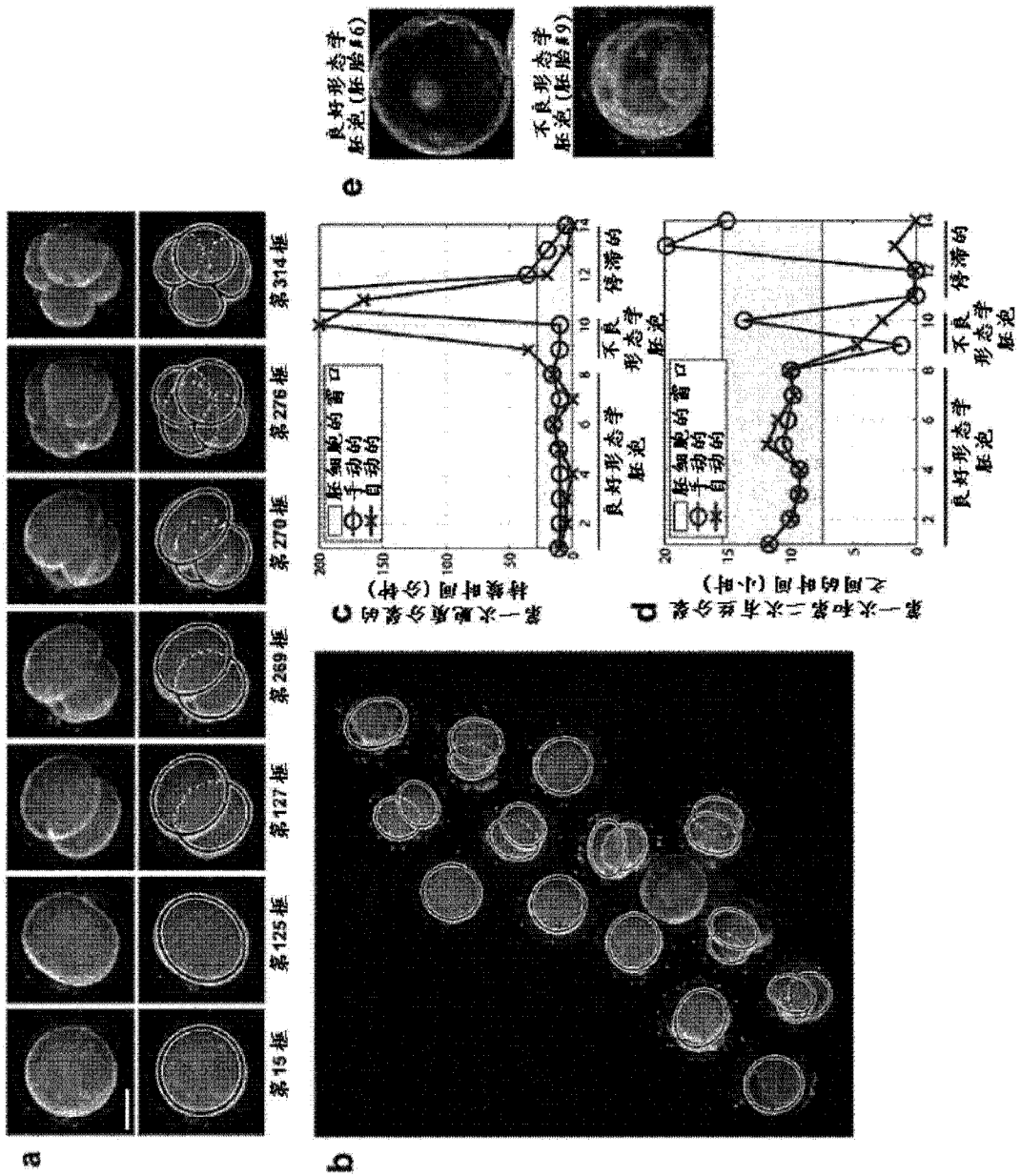


图 21

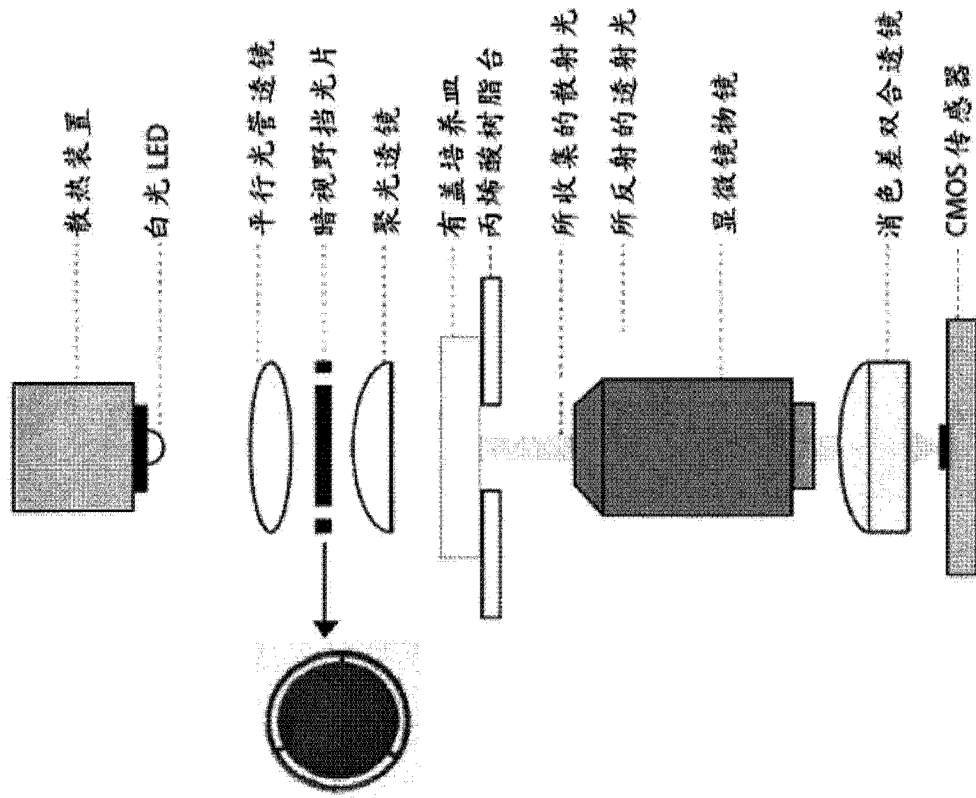
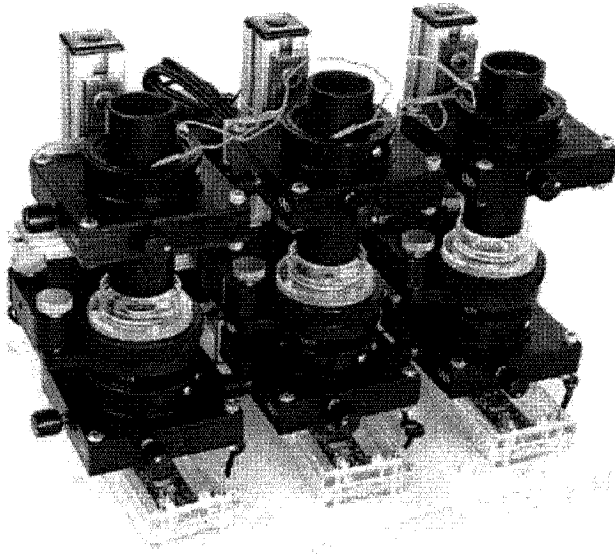


图 22

23A



23B

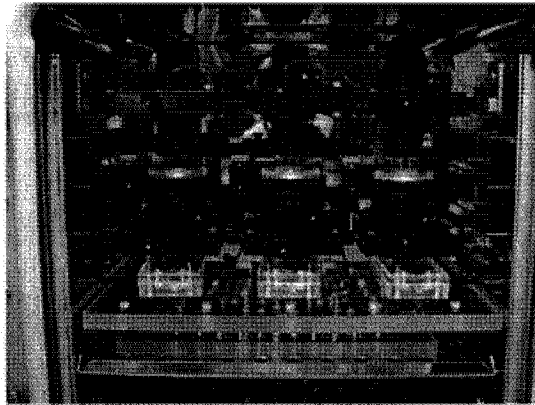


图 23

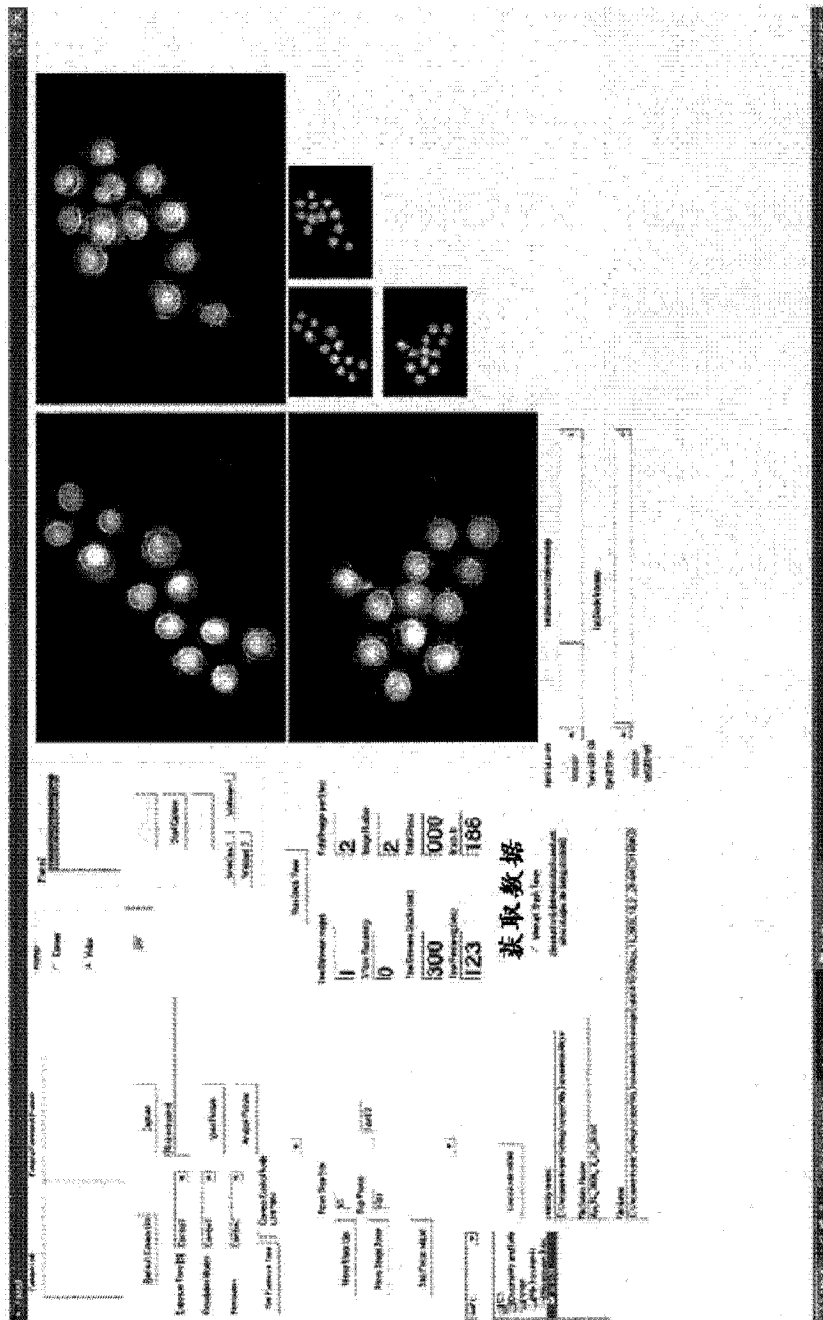


图 24

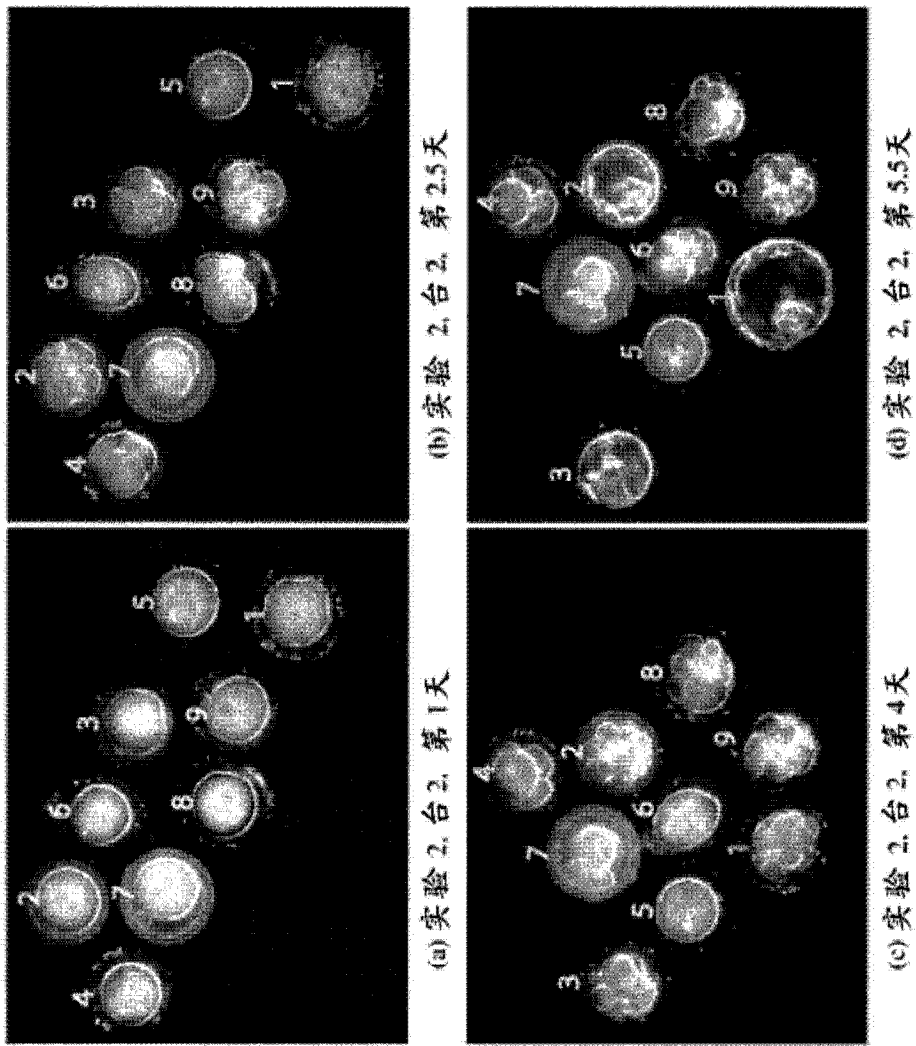


图 25

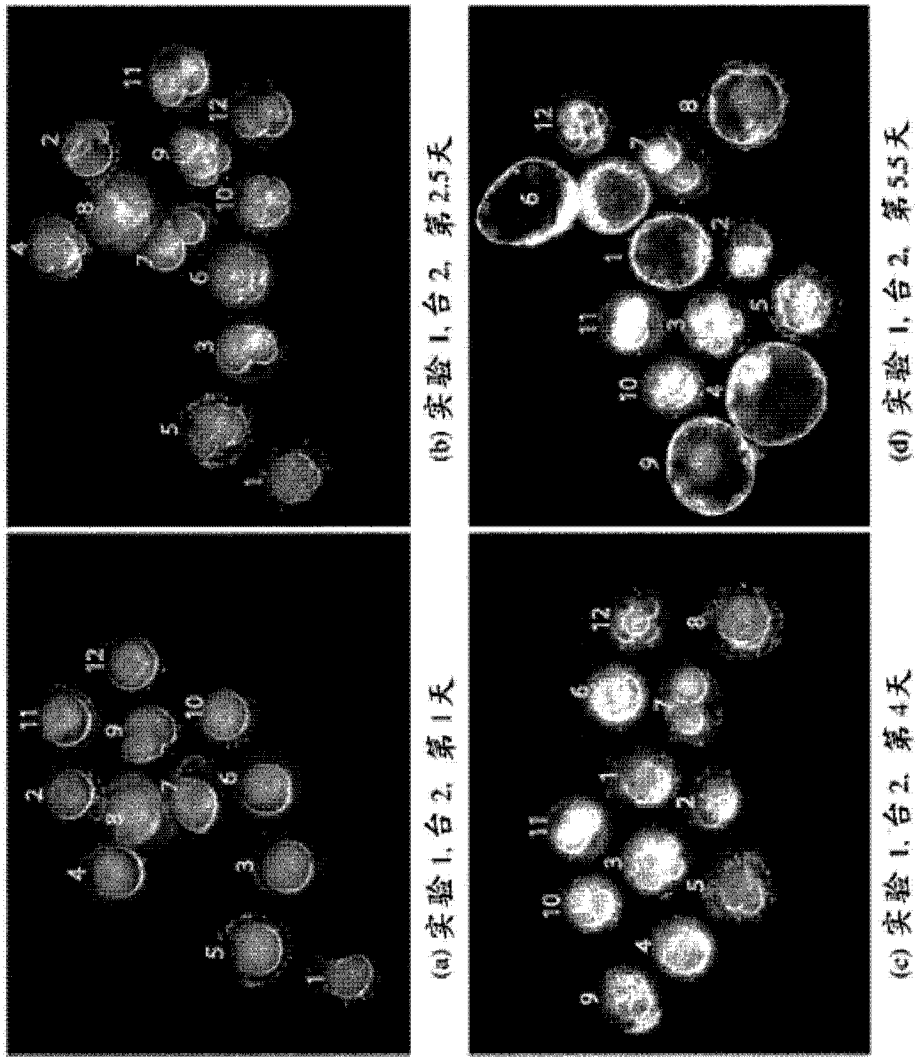


图 26

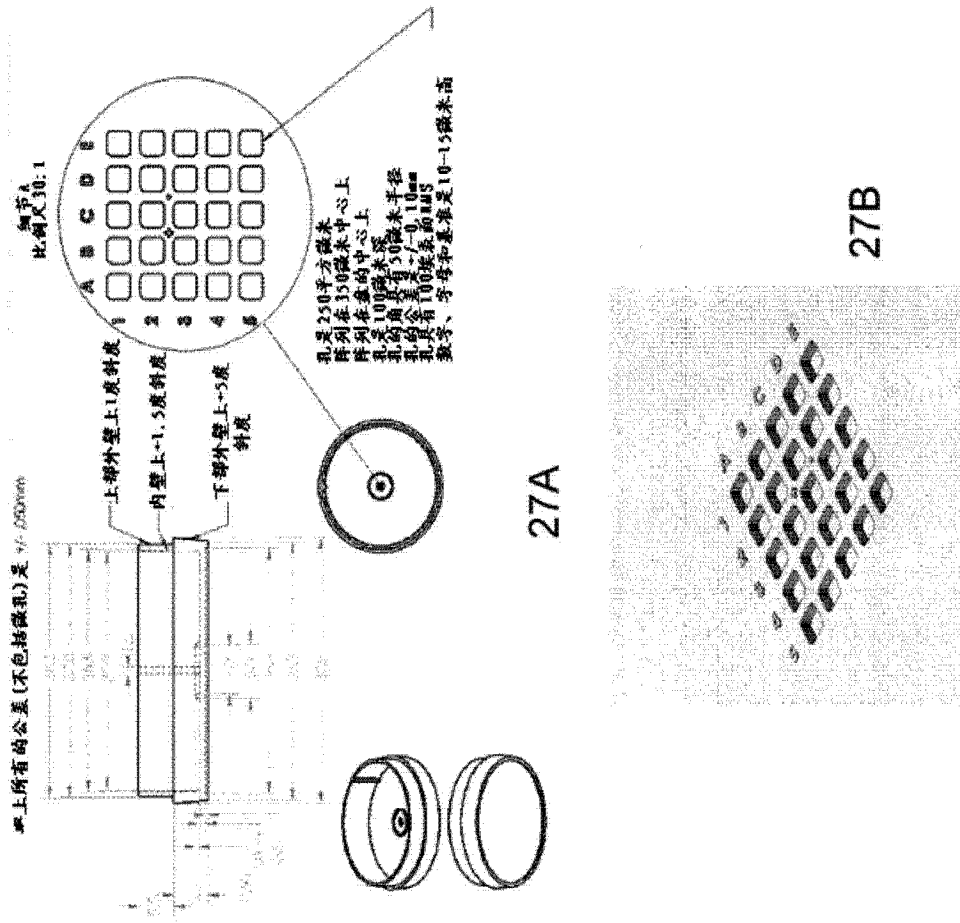


图 27

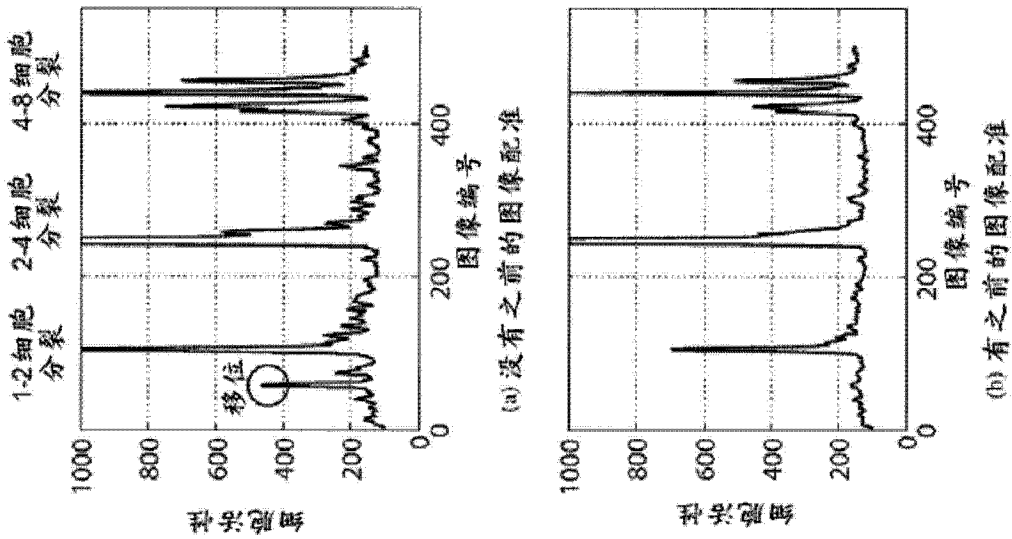


图 28

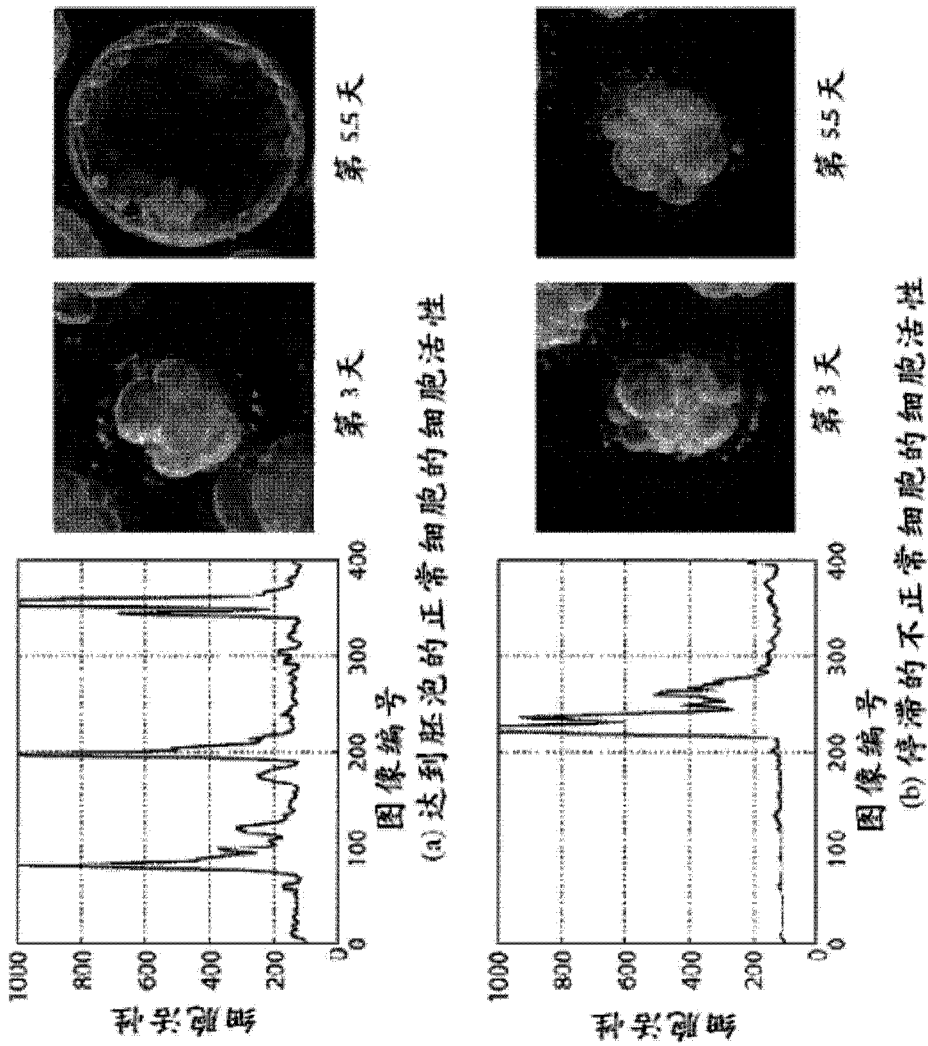


图 29

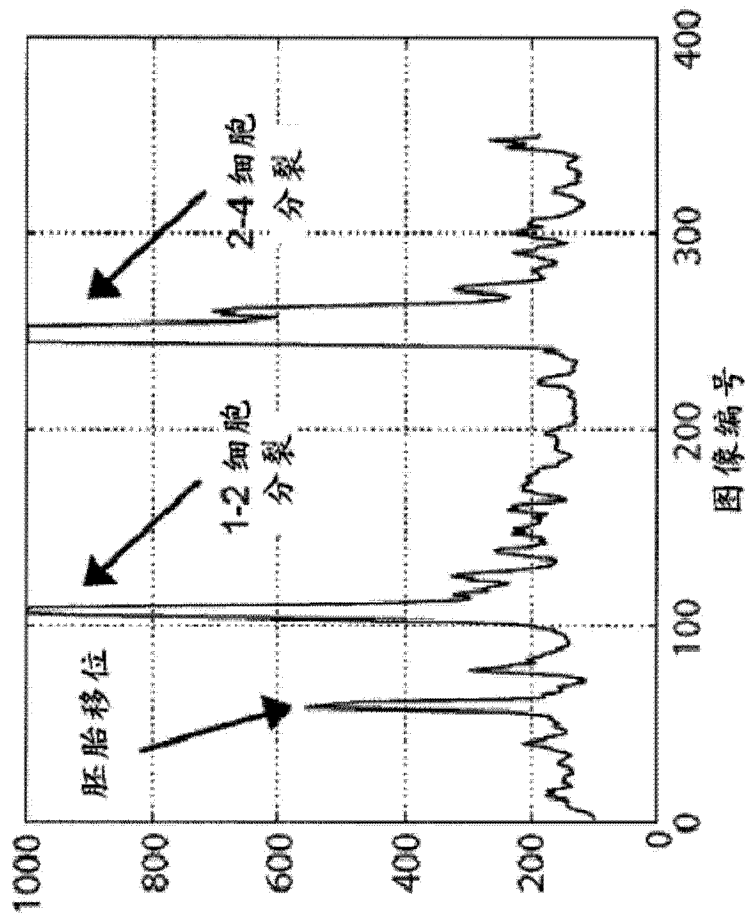


图 30

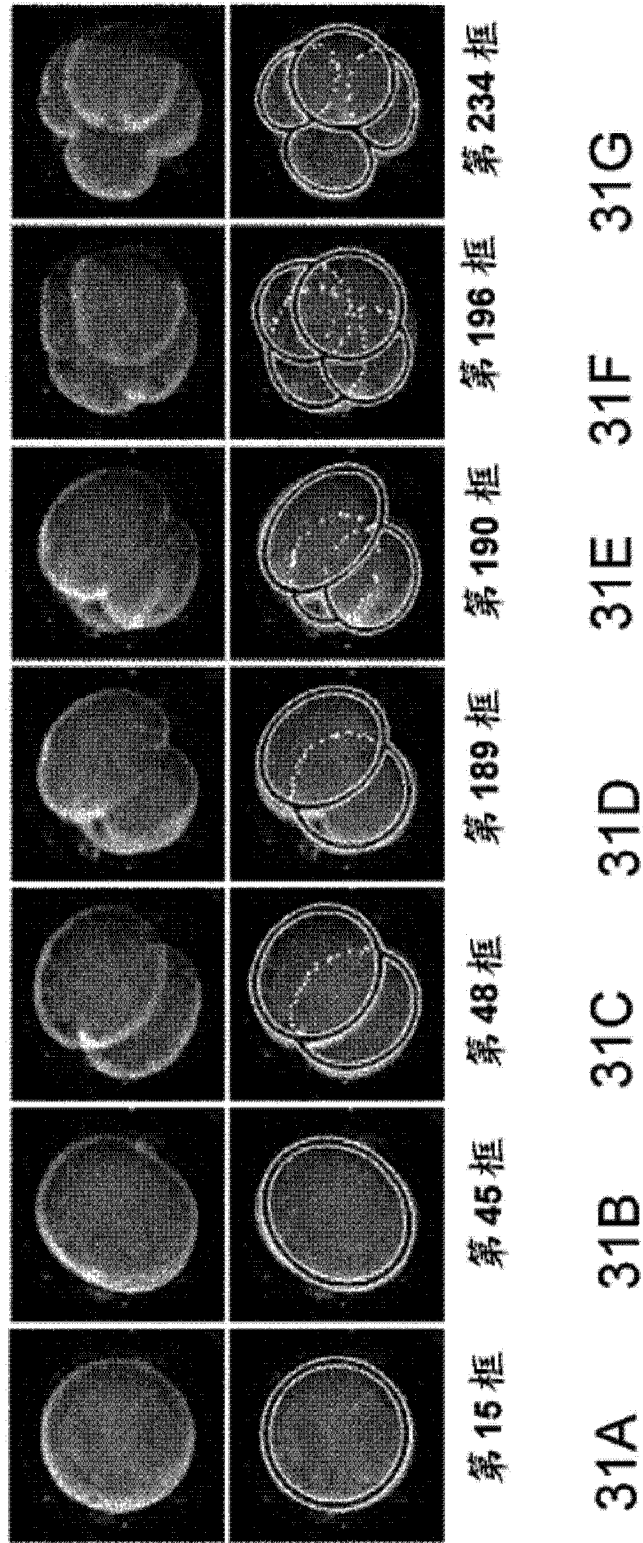


图 31

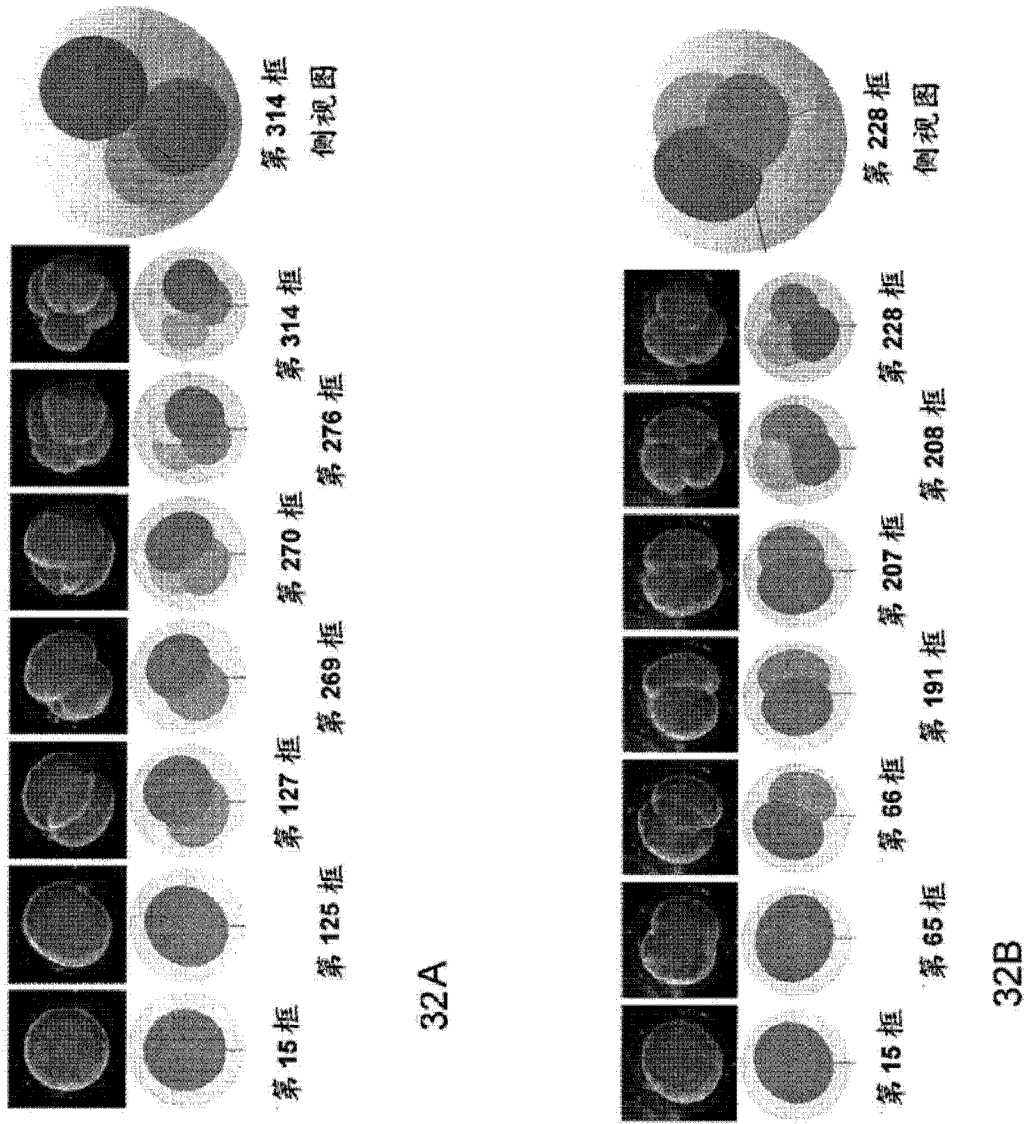


图 32

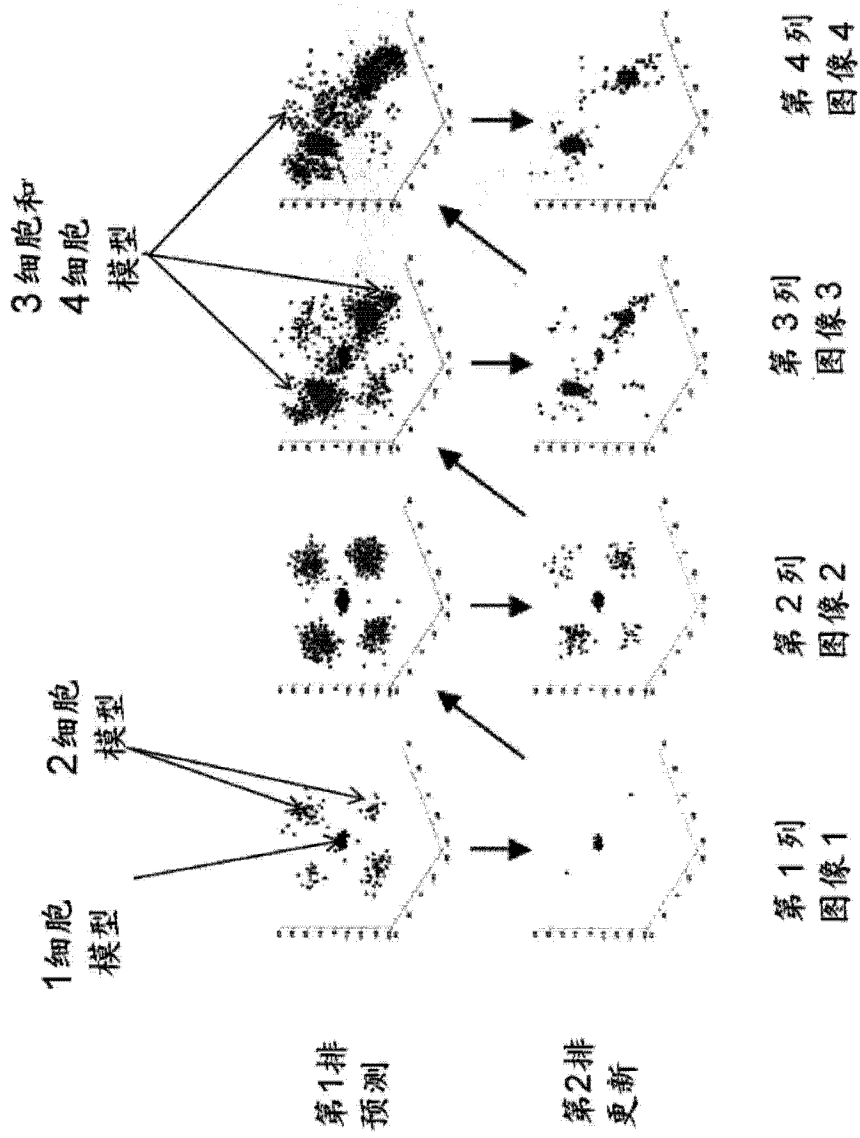
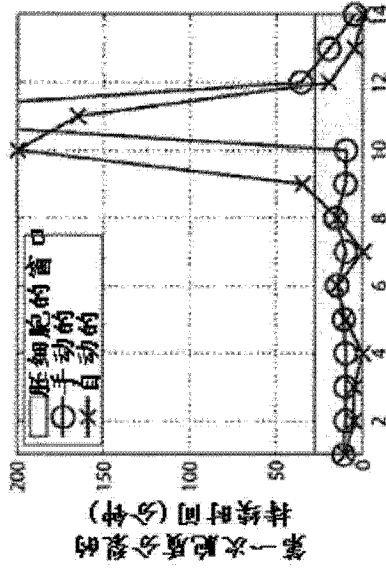
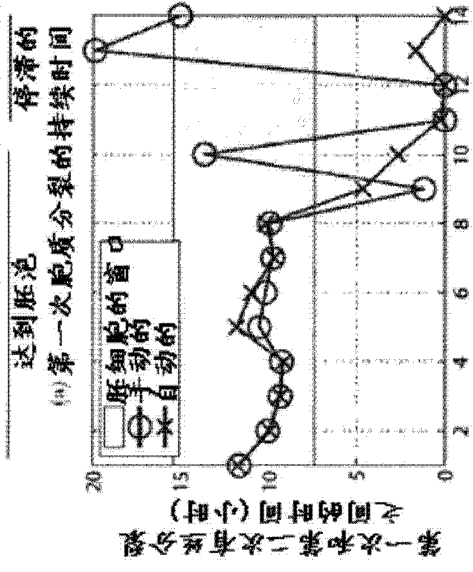


图 33



34A



34B

图 34

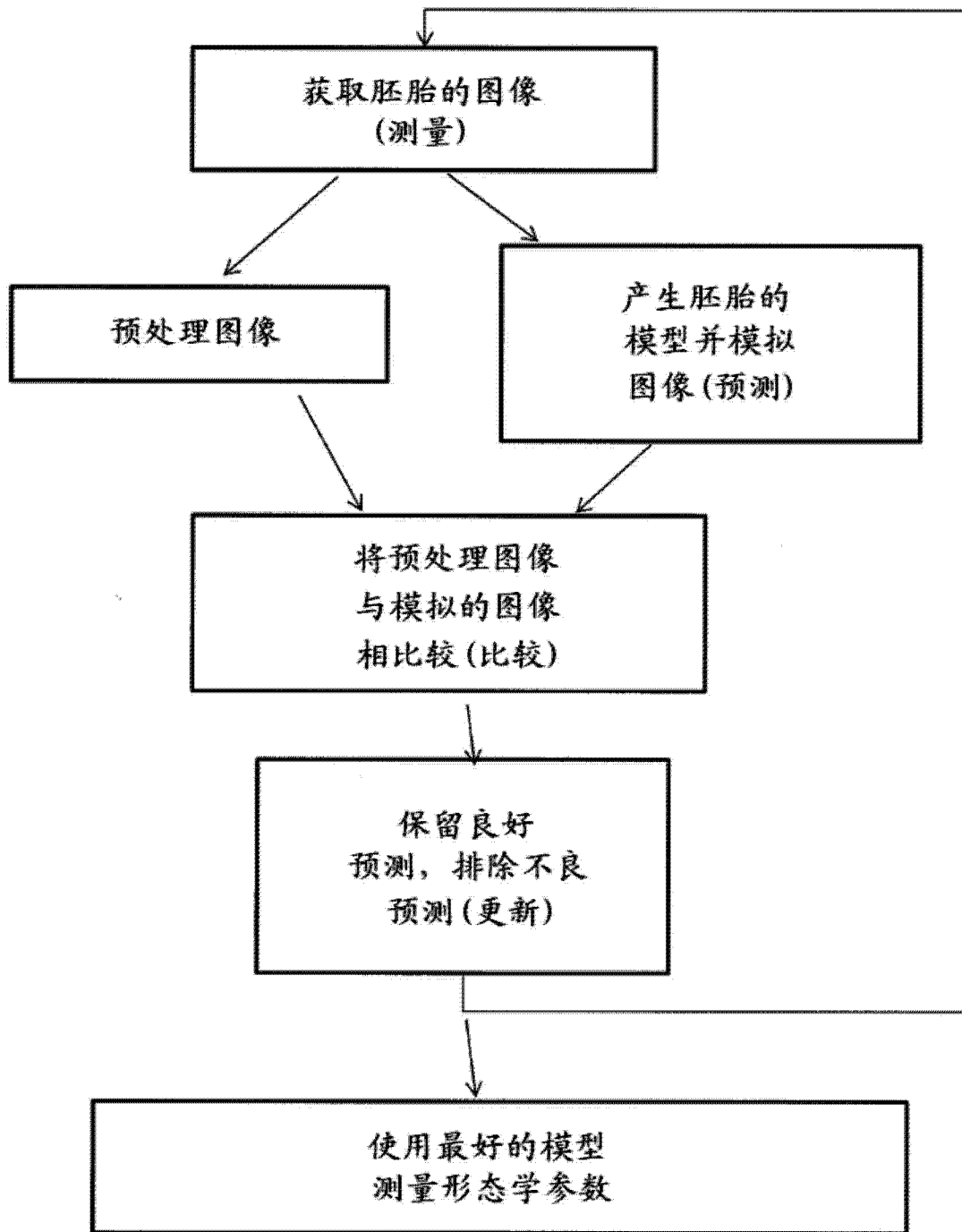


图 35