



(10) 授权公告号 CN 112638529 B

(45) 授权公告日 2023. 05. 30

(21) 申请号 201980053558.7

(22) 申请日 2019.06.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112638529 A

(43) 申请公布日 2021.04.09

(30) 优先权数据
62/684,612 2018.06.13 US
62/701,395 2018.07.20 US
62/804,560 2019.02.12 US
62/848,478 2019.05.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.02.09

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/036849 2019.06.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/241443 EN 2019.12.19

(73) 专利权人 新克赛特株式会社
地址 日本东京都
专利权人 国立大学法人东京大学

国立大学法人大阪大学

(72) 发明人 太田禎生 堀崎辽一 河村洋子
鹈川昌士 佐藤一诚

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
专利代理师 刘晓杰 贺淑东

(51) Int.Cl.
B01L 3/00 (2006.01)
G01N 15/10 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2012122084 A1,2012.05.17
FR 2956207 A1,2011.08.12
Hauck.《Deciphering Membrane-
Associated Molecular Processes in Target
Tissue of Autoimmune Uveitis by Label-
Free Quantitative Mass Spectrometry》.
《MOLECULAR and CELLULAR PROTEOMICS》
.2010,第2292-2305页.

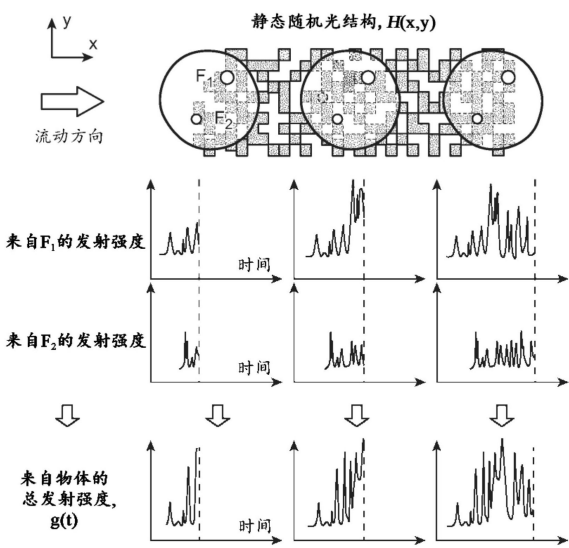
审查员 袁涛

权利要求书3页 说明书41页 附图41页

(54) 发明名称
细胞计数的方法和系统

(57) 摘要
本公开内容提供了用于鬼影细胞术 (GC) 的方法和系统,其可以用于产生物体的图像,而无需使用空间分辨检测器。其可以用于进行无图像超快荧光成像细胞术,例如,基于单像素检测器。从细胞相对于图案化的光学结构的运动获得的空间信息可以被压缩地转换为按顺序到达单像素检测器的信号。时域波形与随机或伪随机模式的强度分布的组合使用可以允许细胞形态的计算重构。机器学习方法可以直接应用于压缩波形,而无需图像重构,以实现有效的无图像的基于形态的细胞术。无图像GC可以实现准确且高通量的细胞分类,以及基于细胞形态无需特定的生物标志物进行选择性的分选,而使用传统流式细胞

仪则具有挑战性。



1. 一种用于无标记粒子处理或分析的方法,包括:

(a) 通过使光通过图案化的光学结构聚焦产生结构化照明,并将所述结构化照明聚焦在流动池的通道上,使得所述结构化照明产生离开所述通道并朝向检测器的透射散斑图案;

(b) 使多个无标记粒子中的至少一个无标记粒子通过所述结构化照明聚焦于其上的所述流动池的所述通道,其中在所述至少一个无标记粒子通过所述结构化照明聚焦于其上的所述流动池的所述通道时,调制所述透射散斑图案以生成调制的透射散斑图案;

(c) 使用所述检测器收集所述调制的透射散斑图案的至少一部分;

(d) 将所述调制的透射散斑图案的所述至少所述部分转换为一个或多个时域波形,其中所述一个或多个时域波形包括当所述至少一个无标记粒子通过所述结构化照明时由所述调制的透射散斑图案赋予的一个或多个强度分布;

(e) 将一个或多个机器学习分类器应用于所述一个或多个时域波形以从所述多个无标记粒子直接识别无标记粒子的子集;以及

(f) 从所述多个无标记粒子中分离或隔离所述无标记粒子的子集,从而实现所述多个无标记粒子的无标记分选。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述光是相干光。

3. 根据权利要求1所述的方法,其中所述光包括紫外光或可见光。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述无标记粒子的子集包括一个或多个生物粒子。

5. 根据权利要求1所述的方法,其中所述无标记粒子的子集包括一个或多个细胞。

6. 根据权利要求1所述的方法,其中所述无标记粒子的子集包括一个或多个治疗性细胞。

7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述无标记粒子的子集包括选自以下的一个或多个成员:干细胞、间充质干细胞、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、从诱导多能干(iPS)细胞分化的细胞、从胚胎干细胞分化的细胞、基因工程细胞、血细胞、红细胞、白细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、嵌合抗原受体T细胞、嵌合抗原受体自然杀伤细胞、癌细胞和胚细胞。

8. 根据权利要求1所述的方法,其中所述无标记粒子的子集包括选自以下的一个或多个白血细胞:嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞。

9. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个无标记粒子包括一个或多个稀有细胞、癌细胞或循环肿瘤细胞。

10. 根据权利要求5所述的方法,还包括基于所述无标记粒子的子集的功能、类型或特征对所述无标记粒子的子集进行分类,其中所述功能、类型或特征对应于所述无标记粒子的子集的活力、表达状态、纯度、分化、未分化、葡萄糖水平或糖酵解水平。

11. 根据权利要求1所述的方法,其中使用与一个或多个染色的粒子相关的波形训练所述一个或多个机器学习分类器。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中使用支持向量机、随机森林、人工神经网络、卷积神经网络、深度学习、超深度学习、梯度提升、AdaBoosting、决策树、线性回归或逻辑回归创建所述一个或多个机器学习分类器。

13. 根据权利要求1所述的方法,其中无需图像重构就可以分选所述多个无标记粒子。

14. 根据权利要求1所述的方法,其中所述检测器包括单像素检测器。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述单像素检测器包括光电倍增管。
16. 根据权利要求1所述的方法,还包括重构所述无标记粒子的子集的一个或多个图像。
17. 根据权利要求1所述的方法,其中所述多个无标记粒子相对于所述图案化的光学结构以至少1m/s的速率移动。
18. 根据权利要求1所述的方法,其中所述从所述多个无标记粒子中分离或隔离所述无标记粒子的子集以至少每秒10个粒子的速率发生。
19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述速率为每秒至少100个粒子或每秒至少1000个粒子。
20. 根据权利要求1所述的方法,还包括基于所述多个无标记粒子的形态将所述多个无标记粒子分选为一组或多组分选的粒子。
21. 根据权利要求1所述的方法,其中 (f) 还包括将一个或多个所述分离的或隔离的所述无标记粒子的子集收集为一个或多个组的收集的粒子以产生富集的粒子混合物。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述一个或多个组的收集的粒子具有至少70%的纯度。
23. 根据权利要求1所述的方法,还包括,在 (f) 之后,对所述无标记粒子的子集进行一种或多种测定。
24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述一种或多种测定选自:裂解、核酸提取、核酸扩增、核酸测序和蛋白质测序。
25. 根据权利要求1所述的方法,还包括在 (b) 之前,使所述多个无标记粒子经受流体动力流聚焦。
26. 根据权利要求1所述的方法,其中所述调制的透射散斑图案的所述至少所述部分对应于与所述多个无标记粒子有关的特征、特性或信息。
27. 根据权利要求1所述的方法,其中所述方法还包括为所述聚焦所述结构化照明使用物镜。
28. 根据权利要求1所述的方法,其中所述图案化的光学结构包括有序图案化的光学结构、无序图案化的光学结构、非周期性图案化的光学结构、随机或伪随机图案化的光学结构或静态光学结构。
29. 根据权利要求1所述的方法,其中所述图案化的光学结构包括多个具有不同的光学特征的区域,其中所述光学特征包括透射率、吸收率或反射率中的至少一项。
30. 一种用于无标记粒子处理或分析的系统,包括:
 - 被配置为引导多个无标记粒子的流体流动路径;
 - 与所述流体流动路径的至少一部分感测连通的检测器;以及
 - 可操作地耦合至所述检测器的一个或多个计算机处理器,其中所述一个或多个计算机处理器被单独或共同编程以:
 - (a) 通过使光通过图案化的光学结构聚焦产生结构化照明,并将所述结构化照明聚焦在所述流体流动路径上,使得所述结构化照明产生离开通道并朝向所述检测器的透射散斑图案;
 - (b) 使多个无标记粒子中的至少一个无标记粒子通过所述结构化照明聚焦于其上的所

述流体流动路径,其中在所述至少一个无标记粒子通过所述结构化照明聚焦于其上的所述流体流动路径时,调制所述透射散斑图案以生成调制的透射散斑图案;

(c) 使用所述检测器收集所述调制的透射散斑图案的至少一部分;

(d) 将所述调制的透射散斑图案的所述至少所述部分转换为一个或多个时域波形,其中所述一个或多个时域波形包括当所述至少一个无标记粒子通过所述结构化照明时由所述调制的透射散斑图案赋予的一个或多个强度分布;

(e) 将一个或多个机器学习分类器应用于所述一个或多个时域波形以从所述多个无标记粒子直接识别无标记粒子的子集;以及

(f) 从所述多个无标记粒子中分离或隔离所述无标记粒子的子集,从而实现所述多个无标记粒子的无标记分选。

31. 一种包括机器可执行代码的非暂时性计算机可读介质,在由一个或多个计算机处理器执行时,实现用于无标记粒子分析的方法,其中所述方法包括:

(a) 通过使光通过图案化的光学结构聚焦产生结构化照明,并将所述结构化照明聚焦在流动池的通道上,使得所述结构化照明产生离开所述通道并朝向检测器的透射散斑图案;

(b) 使多个无标记粒子中的至少一个无标记粒子通过所述结构化照明聚焦于其上的所述流动池的所述通道,其中在所述至少一个无标记粒子通过所述结构化照明聚焦于其上的所述流动池的所述通道时,调制所述透射散斑图案以生成调制的透射散斑图案;

(c) 使用所述检测器收集所述调制的透射散斑图案的至少一部分;

(d) 将所述调制的透射散斑图案的所述至少所述部分转换为一个或多个时域波形,其中所述一个或多个时域波形包括当所述至少一个无标记粒子通过所述结构化照明时由所述调制的透射散斑图案赋予的一个或多个强度分布;

(e) 将一个或多个机器学习分类器应用于所述一个或多个时域波形以从所述多个无标记粒子直接识别无标记粒子的子集;以及

(f) 从所述多个无标记粒子中分离或隔离所述无标记粒子的子集,从而实现所述多个无标记粒子的无标记分选。

细胞计数的方法和系统

[0001] 交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年6月13日提交的发明名称为“细胞计数的方法和系统”的美国临时专利申请号62/684,612,于2018年7月20日提交的发明名称为“细胞计数的方法和系统”的美国临时专利申请号62/701,395,于2019年2月12日提交的发明名称为“细胞计数的方法和系统”的美国临时专利申请号62/804,560,以及于2019年5月15日提交的发明名称为“细胞计数的方法和系统”的美国临时专利申请号62/848,478的权益,出于所有目的的每一项专利申请均通过引用整体并入本文。

背景技术

[0003] 流式细胞术是可以用于细胞计数、细胞分选、生物标志物检测和蛋白质工程的技术。流式细胞术可以通过将细胞悬浮在流体流中并使得细胞流过电子检测装置来进行。流式细胞仪可以允许对粒子的物理和化学特性同时进行多参数分析。

发明内容

[0004] 本公开内容提供了使用称为幻影细胞术(ghost cytometry,GC)的过程进行基于形态学的细胞分类(classification)和分选(sorting)的方法和系统。本公开内容的方法和系统可用于在不获取图像的情况下实现了高准确度和吞吐量的基于形态学的细胞分类和分选。

[0005] 在一方面,本公开内容提供了一种粒子(particle)处理或分析的方法,包括:(a)在粒子相对于图案化的光学结构的运动期间获得空间信息;(b)将所述空间信息压缩地转换为按顺序到达检测器的信号,(c)使用所述信号以至少70%的任意准确度识别所述粒子的至少一个子集,以及(d)将(c)中识别出的所述粒子的所述至少一个子集以至少每秒10个粒子的速率分选为一个或多个组。在一些实施方案中,(a)包括:(i)将来自光源的光引导通过随机或伪随机图案化的光学结构,(ii)将来自所述图案化的光学结构的光引导至所述粒子,以及(iii)将来自所述粒子的光引导至所述检测器。在一些实施方案中,(a)包括:(i)将来自光源的光引导至所述粒子,(ii)将来自所述粒子的光引导通过所述图案化的光学结构,以及(iii)将来自所述图案化的光学结构的光引导至所述检测器。在一些实施方案中,所述光包括紫外光或可见光。在一些实施方案中,(b)包括应用两步迭代收缩/阈值(two-step iterative shrinkage/thresholding,TwIST)程序。在一些实施方案中,(c)包括至少部分地通过时域波形的组合使用来计算重构(computationally reconstructing)所述粒子的形态,所述时域波形包括由所述图案化的光学结构赋予的一个或多个强度分布。在一些实施方案中,所述粒子包括一个或多个生物粒子。在一些实施方案中,所述粒子包括一个或多个细胞。在一些实施方案中,所述粒子包括一个或多个稀有细胞。在一些实施方案中,所述粒子包括一个或多个癌细胞。在一些实施方案中,所述粒子包括一个或多个循环肿瘤细胞。在一些实施方案中,(c)包括在与所述信号相对应的压缩波形上应用一个或多个机器学习分类器,以识别粒子的所述至少一个子集。在一些实施方案中,所述一个或多个机器学习

习分类器选自：支持向量机、随机森林、人工神经网络、卷积神经网络、深度学习、超深度学习、梯度提升、AdaBoosting、决策树、线性回归和逻辑回归。在一些实施方案中，无需图像重构就可以分析所述粒子。在一些实施方案中，所述检测器包括单像素检测器。在一些实施方案中，所述单像素检测器包括光电倍增管。在一些实施方案中，所述方法还包括重构所述粒子的一个或多个图像。在一些实施方案中，所述一个或多个图像包括荧光图像。在一些实施方案中，所述方法还包括重构所述粒子的多个图像，所述多个图像中的每个图像包括不同的波长或波长范围。在一些实施方案中，所述一个或多个图像没有模糊伪影。在一些实施方案中，所述粒子相对于所述图案化的光学结构以至少1m/s的速率移动。在一些实施方案中，所述方法还包括基于所述粒子的形态将所述粒子分选为一个组或多个组的分选的粒子。在一些实施方案中，所述速率为每秒至少100个粒子。在一些实施方案中，所述速率为每秒至少1,000个粒子。在一些实施方案中，(d) 包括收集一个或多个所述组以产生富集的粒子混合物。在一些实施方案中，所述一个或多个组具有至少70%的纯度。在一些实施方案中，所述方法还包括对所述一个或多个组的一个或多个粒子进行一种或多种测定。在一些实施方案中，所述一种或多种测定选自：裂解、核酸提取、核酸扩增、核酸测序和蛋白质测序。在一些实施方案中，所述方法包括，在 (a) 之前，使所述粒子经受流体动力流聚焦。在一些实施方案中，所述方法包括当所述粒子相对于所述图案化的光学结构移动时，收集所述粒子的部分透射散斑图案。在一些实施方案中，所述图案化的光学结构包括有序图案化的光学结构。在一些实施方案中，所述图案化的光学结构包括无序图案化的光学结构。在一些实施方案中，所述无序光学结构包括非周期性图案化的光学结构。在一些实施方案中，所述无序光学结构包括随机或伪随机图案化的光学结构。在一些实施方案中，所述光学结构包括静态光学结构。

[0006] 在另一方面，本公开内容提供了一种至少部分基于所述粒子的形态对粒子进行分类或分选，而无需使用非天然标记的无图像方法，其准确度至少为70%。在一些实施方案中，所述粒子包括一个或多个生物粒子。在一些实施方案中，所述粒子包括一个或多个细胞。在一些实施方案中，所述粒子包括一个或多个稀有细胞。在一些实施方案中，所述粒子包括一个或多个癌细胞。在一些实施方案中，所述粒子包括一个或多个循环肿瘤细胞。

[0007] 在另一方面，本公开内容提供了一种用于粒子处理或分析的系统，包括：被配置为引导粒子的流体流动路径；与所述流体流动路径的至少一部分感测连通的检测器；以及可操作地耦合至所述检测器的一个或多个计算机处理器，其中所述一个或多个计算机处理器被单独或共同编程以：(a) 在粒子相对于随机或伪随机图案化的光学结构的运动期间获得空间信息，(b) 将所述空间信息压缩转换为按顺序到达所述检测器的信号，(c) 使用所述信号以至少70%的任何准确度识别所述粒子的至少一个子集，以及 (d) 以每秒至少10个粒子的速率将 (c) 中识别的粒子的所述至少一个子集分选为一个或多个组。在一些实施方案中，所述检测器是单像素检测器。

[0008] 在另一方面，本公开内容提供了一种包括机器可执行代码的非暂时性计算机可读介质，在由一个或多个计算机处理器执行时，实现用于粒子分析的方法，所述方法包括 (a) 在粒子相对于随机图案化的光学结构的运动期间获得空间信息，(b) 将所述空间信息压缩转换为按顺序到达单像素检测器的信号，(c) 使用所述信号以至少70%的准确度识别所述粒子的至少一个子集；以及 (d) 以每秒至少10个粒子的速率将 (c) 中识别的粒子的所述至少

一个子集分选为一个或多个组。

[0009] 在另一方面,本公开内容提供一种用于细胞处理或分析的方法,所述方法包括(a)在细胞相对于图案化的光学结构的运动期间获得空间信息,(b)将所述空间信息压缩转换为按顺序到达检测器的信号,(c)使用所述信号识别所述细胞的至少一个子集为癌细胞,以及(d)将(c)中识别的所述细胞的所述至少一个子集分选为一组或多组癌细胞和一组或多组非癌细胞。

[0010] 在另一方面,本公开内容提供一种用于细胞处理或分析的方法,所述方法包括(a)在细胞相对于图案化的光学结构的运动期间获得空间信息,(b)将所述空间信息压缩转换为按顺序到达检测器的信号,(c)使用所述信号识别所述细胞的至少一个子集为治疗性细胞,以及(d)将(c)中识别的所述细胞的所述至少一个子集分选为一组或多组治疗性细胞和一组或多组非治疗性细胞。

[0011] 在另一方面,本公开内容提供一种用于从多个细胞识别一个或多个靶细胞的方法,包括(a)在所述多个细胞相对于图案化的光学结构的运动期间获得空间信息,以及(b)将所述空间信息输入到训练的机器学习算法中,以从所述多个细胞中识别所述一个或多个靶细胞。

[0012] 在另一方面,本公开内容提供一种用于细胞处理的方法,包括:(a)获得多个细胞的空间信息,以及(b)使用至少所述空间信息以每秒至少1,000个细胞的速率从所述多个细胞中分离或隔离所述多个细胞的子集。

[0013] 在另一方面,本公开内容提供一种用于从多个细胞处理一个或多个靶细胞的方法,包括:(a)在所述多个细胞相对于图案化的光学结构的运动期间获得空间信息;(b)使用所述空间信息从所述多个细胞中识别所述一个或多个靶细胞;以及(c)至少部分基于(b)中识别的所述一个或多个靶细胞,以每秒至少10个细胞的速率从所述多个细胞中分离或隔离所述一个或多个靶细胞。在一些实施方案中,(a)包括:(i)将来自光源的光引导通过所述图案化的光学结构,(ii)将来自所述图案化的光学结构的光引导至所述多个细胞,以及(iii)将来自所述多个细胞的光引导至所述检测器。在一些实施方案中,(a)包括:(i)将来自光源的光引导至所述多个细胞,(ii)将来自所述多个细胞的光引导通过所述图案化的光学结构,以及(iii)将来自所述图案化的光学结构的光引导至所述检测器。在一些实施方案中,所述图案化的光学结构包括无序图案化的光学结构。在一些实施方案中,(c)包括至少部分地通过组合使用一个或多个时域波形来计算重构所述细胞的形态,所述时域波形包括由所述图案化的光学结构赋予的一个或多个强度分布。在一些实施方案中,所述靶细胞包括一个或多个癌细胞或循环肿瘤细胞。在一些实施方案中,所述靶细胞包括一个或多个治疗性细胞。在一些实施方案中,所述靶细胞包括选自以下的一个或多个成员:干细胞、间充质干细胞、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、从诱导多能干细胞分化的细胞、从胚胎干细胞分化的细胞、基因工程细胞、血细胞、红细胞、白细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、嵌合抗原受体T细胞、嵌合抗原受体自然杀伤细胞、癌细胞和胚细胞。在一些实施方案中,(b)包括在与所述空间信息相对应的压缩波形上应用一个或多个机器学习分类器以识别所述一个或多个靶细胞。在一些实施方案中,所述一个或多个机器学习分类器达到至少70%的灵敏度、特异性和准确度中的一项或多项。在一些实施方案中,所述一个或多个机器学习分类器选自:支持向量机、随机森林、人工神经网络、卷积神经网络、深度学习、超深度学习、梯度提升、

AdaBoosting、决策树、线性回归和逻辑回归。在一些实施方案中,在没有图像重构的情况下处理所述多个细胞。在一些实施方案中,所述检测器包括单像素检测器。在一些实施方案中,所述单像素检测器包括光电倍增管。在一些实施方案中,所述方法还包括重构所述多个细胞的一个或多个图像。在一些实施方案中,所述方法还包括重构所述多个细胞的多个图像,所述多个图像中的每个图像包括不同的波长或波长范围。在一些实施方案中,所述一个或多个图像没有模糊伪影。在一些实施方案中,所述多个细胞相对于所述图案化的光学结构以至少1m/s的速率移动。在一些实施方案中,(c)包括:(i)基于分析所述多个细胞的结果将所述多个细胞分选为一组或多组分选的细胞;以及(ii)从所述一组或多组分选的细胞中收集所述一个或多个靶细胞。在一些实施方案中,(c)包括基于所述多个细胞的形态将所述多个细胞分选为一组或多组分选的细胞。在一些实施方案中,以每秒至少10个细胞的速率实现所述分选。在一些实施方案中,所述方法还包括收集所述一组或多组分选的细胞以生成富集的细胞混合物。在一些实施方案中,所述一组或多组分选的细胞具有至少70%的纯度。在一些实施方案中,所述方法还包括对所述一组或多组分选的细胞中的一个或多个细胞进行一种或多种测定。在一些实施方案中,所述一种或多种测定选自:裂解、核酸提取、核酸扩增、核酸测序和蛋白质测序。在一些实施方案中,所述方法还包括,在(a)之前,对所述细胞进行流体动力流聚焦。在一些实施方案中,所述方法还包括当所述多个细胞相对于所述图案化的光学结构移动时,收集所述多个细胞的部分透射散斑图案。在一些实施方案中,所述空间信息对应于与所述多个细胞有关的特征、特性或信息。在一些实施方案中,所述空间信息和与所述多个细胞有关的所述特征、特性或信息一一对应。在一些实施方案中,与所述多个细胞有关的所述特征、特性或信息包括一个或多个选自以下的成员:代谢状态、增殖状态、分化状态、成熟状态、标志物蛋白的表达、标志物基因的表达、细胞的形态、细胞器的形态、细胞器的位置、细胞器的大小或范围、细胞质的形态、细胞质的位置、细胞质的大小或范围、细胞核的形态、细胞核的位置、细胞核的大小或范围、线粒体的形态、线粒体的位置、线粒体的大小或范围、溶酶体的形态、溶菌酶的位置、溶菌酶的大小或范围、细胞内分子的分布、细胞内肽、多肽或蛋白质的分布、细胞内核酸的分布、细胞内聚糖或多糖的分布,以及细胞内脂质的分布。

[0014] 本公开内容的另一方面提供了一种包括机器可执行代码的非暂时性计算机可读介质,所述机器可执行代码在被一个或多个计算机处理器执行时,实现以上或本文其他地方的任何所述方法。

[0015] 本公开内容的另一方面提供了一种包括一个或多个计算机处理器和与其耦合的计算机存储器的系统。所述计算机存储器包括机器可执行代码,所述机器可执行代码在由所述一个或多个计算机处理器执行时,实现以上或本文其他地方的任何所述方法。

[0016] 通过以下详细描述,本公开内容的其他方面和优点对于本领域技术人员将变得明显,其中仅示出和描述本公开内容的说明性实施方案。正如将要认识到的,本公开内容能够具有其他和不同的实施方案,并且其若干细节能够在各种明显的方面进行修改,所有这些都不脱离本公开内容。因此,附图和描述本质上应被认为是说明性的,而非限制性的。

[0017] 援引并入

[0018] 在本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,其程度如同每个单独的出版物、专利或专利申请被特别地和单独地指出通过引用并入。

附图说明

[0019] 在所附的权利要求书中具体阐述本发明的新颖特征。通过参考以下阐述了利用了本发明的原理的说明性实施方式的详细说明及其附图(在此也称为“图”),可以更好地理解本发明的特征和优点,在附图中:

[0020] 图1A示出了在鬼影细胞术(GC)过程中使用的光学压缩感测过程的示意图。

[0021] 图1B示出了粒子分析方法的一个示例的流程图。

[0022] 图1C示出了用于对粒子进行分类或分选的光学方法的一个示例的流程图。

[0023] 图2A示出了包括结构化照明(SI)元件的用于基于运动的压缩荧光成像的光学设置的示例。

[0024] 图2B示出了用于包括结构化检测(SD)元件的基于运动的压缩荧光成像的光学设置的示例。

[0025] 图2C示出了与移动荧光珠相关的时域波形的示例,该波形已使用包括SI元件的光学系统获取。

[0026] 图2D示出了移动荧光珠的二维(2D)荧光图像的示例,该二维荧光图像已由包括SI元件的光学系统获取的时域波形计算重构。

[0027] 图2E示出了与移动荧光珠相关的时域波形的示例,该波形已使用包括SD元件的光学系统获取。

[0028] 图2F示出了移动荧光珠的2D荧光图像的示例,该2D荧光图像已由包括SD元件的光学系统获取的时域波形计算重构。

[0029] 图2G示出了使用阵列像素相机获得的移动荧光珠的荧光图像的示例。

[0030] 图3A示出了包括SD元件的用于基于多色运动的压缩荧光成像的光学装置。

[0031] 图3B示出了与移动荧光细胞相关的时域波形的示例,该时域波形已使用用于基于多色运动的压缩荧光成像的光学设置获取。

[0032] 图3C示出了移动荧光细胞的2D荧光图像的示例,所述图像已被由基于多色运动的压缩荧光成像的光学设置获取的时域波形计算重构。

[0033] 图3D示出了以大于10,000个细胞/秒的吞吐速率流动的细胞的多色亚毫秒荧光成像的示例。

[0034] 图4A示出了用于训练要应用于GC信号的分类器模型的过程。

[0035] 图4B示出了用于测试分类器模型的过程的示例。

[0036] 图4C示出了各种样品中MCF-7细胞的浓度比的示例。

[0037] 图4D示出了与分类器模型相关的真阳性率与假阳性率之间的相关性的示例。

[0038] 图4E示出了基于分类模型癌症(MCF-7)细胞相对于外周血单核细胞复杂混合物的能力,与分类器模型相关的真阳性率与假阳性率之间的相关性的示例。

[0039] 图5A示出了与本公开内容的系统和方法一起使用的微流体装置的示例。

[0040] 图5B示出了使用本公开内容的系统和方法针对形态相似的MCF-7细胞准确分离MIA PaCa-2细胞。

[0041] 图5C示出了使用本公开内容的系统和方法针对外周血单核细胞(PBMC)的复杂混合物准确分离模型癌(MIA PaCa-2)细胞的示例。

[0042] 图6示出了用于估计诸如SI元件或SD元件的光学编码器图案的强度分布的光学系统的示例。

[0043] 图7示出了用于证明基于GC的细胞多色荧光成像的光学编码器的光学设置和校准强度分布的示例。

[0044] 图8示出了用于通过GC进行超快多色荧光成像和无图像成像细胞计数的光学编码器的光学设置和校准强度分布的示例。

[0045] 图9A示出了用于与本文所述的系统和方法一起使用的流体的流体动力学三维(3D)聚焦的流动池示例的几何形状示例。

[0046] 图9B示出了松散和紧密聚焦流动的示例。

[0047] 图9C示出了当使用以20 μ L/min流速获得的GC信号训练分类器时,使用以20 μ L/min流速获得的GC信号对细胞进行分类的机器学习分类器准确度的示例。

[0048] 图9D示出了当使用以30 μ L/min流速获得的GC信号训练分类器时,使用以30 μ L/min流速获得的GC信号对细胞进行分类的机器学习分类器准确度的示例。

[0049] 图9E示出了当使用以20 μ L/min流速获得的GC信号训练分类器时,使用以30 μ L/min流速获得的GC信号对细胞进行分类的机器学习分类器准确度的示例。

[0050] 图9F示出了当使用以20 μ L/min流速和30 μ L/min流速获得的GC信号训练分类器时,使用以20 μ L/min流速获得的GC信号对细胞进行分类的机器学习分类器准确度的示例。

[0051] 图10A示出了MCF-7细胞的总蓝色荧光强度直方图的示例。

[0052] 图10B示出了MIA PaCa-2细胞的总蓝色荧光强度直方图的示例。

[0053] 图10C示出了MCF-7和MIA PaCa-2细胞混合物示例的总蓝色荧光强度直方图的示例。

[0054] 图10D示出了MCF-7和MIA PaCa-2细胞混合物示例的总绿色荧光强度直方图的示例。

[0055] 图11示出了在宽范围的浓度比上使用基于支持向量机(SVM)的机器学习分类器确认分类的一致准确度的示例。

[0056] 图12A示出了包括使用软光刻技术制造的流聚焦段和细胞分选段的细胞分选芯片的示例。

[0057] 图12B示出了流聚焦段的显微图像的示例。

[0058] 图12C示出了细胞分选段的显微图像的示例。

[0059] 图12D示出了与本公开内容的系统和方法一起使用的实时分类和电控制系统的过程流程的示例。

[0060] 图13示出了被编程或以其他方式配置为实现本公开内容的方法和系统的计算机系统的示例。

[0061] 图14示出了利用GC的无标记细胞分选仪的示例。

[0062] 图15示出了用于无标记细胞分选仪的运动驱动的压缩GC的示例。

[0063] 图16A示出了使用无标记细胞分选仪对Jurkat和MIA PaCa-2细胞进行分选的示例。

[0064] 图16B示出了细胞分选之前和之后的Jurkat和MIA PaCa-2细胞群体直方图的示例。

[0065] 图17A示出了碘化丙锭 (PI) 和膜联蛋白V的荧光强度的散布图的示例,用于将诱导多能干细胞 (iPSC) 分类为活的、早期凋亡的或死亡的。

[0066] 图17B示出了IPSC的前向散射 (FSC) 和侧向散射 (SSC) 的散布图的示例。

[0067] 图17C示出了用于活细胞和死细胞分类的接收器工作特性 (ROC) 曲线和SVM得分直方图的示例。

[0068] 图17D示出了用于活细胞和早期凋亡细胞分类的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。

[0069] 图17E示出了用于对死细胞和早期凋亡细胞进行分类的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。

[0070] 图18A示出了用于训练机器学习分类器的神经祖细胞 (NPC) 和iPSC混合物的钙黄绿素AM和rBC2LCN-635强度的散布图的示例。

[0071] 图18B示出了用于对NPC和iPSC进行分类的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。

[0072] 图18C示出了用于训练机器学习分类器的肝母细胞 (hepatoblasts) 和iPSC混合物的钙黄绿素AM和rBC2LCN-635强度的散布图的示例。

[0073] 图18D示出了用于对肝母细胞和iPSC进行分类的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。

[0074] 图19A示出了T细胞的fab FITC强度直方图的示例。

[0075] 图19B示出了用于分类细胞周期中不同状态的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。

[0076] 图19C示出了raji细胞的2- (N- (7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基) 氨基) -2-脱氧葡萄糖 (2-NBDG) 强度的直方图的示例。

[0077] 图19D示出了用于分类具有高葡萄糖水平和低葡萄糖水平的细胞的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。

[0078] 图20A示出了包括嗜中性粒细胞群体的训练数据集。

[0079] 图20B示出了对应于嗜中性粒细胞和非嗜中性粒细胞的无标记光信号的示例。

[0080] 图20C示出了用于对嗜中性粒细胞和非嗜中性粒细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。

[0081] 图20D示出了包括嗜酸性粒细胞群体的训练数据集。

[0082] 图20E示出了对应于嗜酸性粒细胞和非嗜酸性粒细胞的无标记光信号的示例。

[0083] 图20F示出了用于对嗜酸性粒细胞和非嗜酸性粒细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。

[0084] 图20G示出了包括嗜碱性粒细胞群体的训练数据集。

[0085] 图20H示出了对应于嗜碱性粒细胞和非嗜碱性粒细胞的无标记光信号的示例。

[0086] 图20I示出了用于对嗜碱性粒细胞和非嗜碱性粒细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。

[0087] 图21A示出了用于对颊细胞和HeLa细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。

[0088] 图21B示出了用于对BM1细胞和K562细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。

[0089] 图22A示出了由第一类型的粒子产生的信号、由第二类型的粒子产生的信号以及由第一和第二类型的粒子同时存在产生的信号的示例。

[0090] 图22B示出了用于区分同时存在于本公开内容的检测区域中的不同类型粒子的混

淆矩阵的示例。

具体实施方式

[0091] 尽管本文已经示出和描述了本发明的各个实施方案,但对于本领域技术人员容易理解的是,这样的实施方案仅以示例的方式提供。本领域技术人员可以在不偏离本发明的情况下想到许多更改、改变和替代。应当理解,可以采用对本文所描述的本发明实施方案的各种替代方案。

[0092] 每当术语“至少”、“大于”或“大于或等于”在一系列两个或多个数值中的第一数值之前时,术语“至少”、“大于”或“大于或等于”适用于该系列数值中的每个数值。例如,大于或等于1、2或3等同于大于或等于1、大于或等于2或大于或等于3。

[0093] 每当术语“不超过”、“小于”、“小于或等于”或“至多”在一系列两个或多个数值中的第一数值之前时,术语“不超过”、“小于”、“小于或等于”或“至多”适用于该系列数值中的每个数值。例如,小于或等于3、2或1等同于小于或等于3、小于或等于2或小于或等于1。

[0094] 如本文所用,术语“光学空间信息”通常是指从光学感测过程获得的,与物体部件或组件的空间布置有关的信息。例如,“光学空间信息”可以指细胞内细胞成分(如细胞器、细胞膜或细胞质)的空间布置或分配,也可以指组织内细胞的空间布置或分配,也可以指材料内部微结构的空间布置或分配等。

[0095] 如本文所用,术语“压缩感测”(“compressive sensing”、“compressed sensing”)、“压缩采样”(“compressive sampling”、“compressed sampling”)、“稀疏感测”和“稀疏采样”通常是指信号处理技术,该技术通过从比Nyquist-Shannon采样定理所要求的少的信号样品中恢复光学空间信息来有效地获取和重构含有光学空间信息的信号。压缩采样可以在一些域中利用光学空间信息的稀疏性,所述域如时域、时间频域、空间域、空间频域、小波变换域、离散余弦变换域或离散正弦变换域。

[0096] 如本文所用,术语“随机”通常是指缺乏模式或可预测性的过程,或这种过程的产物。随机过程可以没有可辨别的顺序和/或可以不遵循易于理解的模式。随机过程可以包括一系列事件,其结果未遵循确定性模式。随机过程可以包括一系列事件,其结果遵循概率性的或猜测的模式。

[0097] 如本文所用,术语“伪随机”通常是指确定性或部分确定性过程,其产生几乎随机的产物,或这种过程的产物。

[0098] 本公开内容提供了生物分析的方法和系统。这些方法和系统可以用于分析粒子(如细胞),或生物材料(如蛋白质或核酸)。

[0099] 使用本文描述的方法分析和/或处理的粒子可以是生物粒子,如细胞。细胞可以是任何类型,并具有任何特征。细胞可以具有任何尺寸和体积。细胞可以源自任何可能的来源。例如,细胞可以是人细胞、动物细胞、非人灵长类细胞、马科细胞、猪细胞、犬科细胞、猫科细胞、鼠科细胞、植物细胞、细菌细胞或其他细胞。细胞可以来自组织或器官。例如,细胞可以来自心脏、动脉、静脉、大脑、神经、肺、脊柱、脊髓、骨骼、结缔组织、气管、食道、胃、小肠或大肠、膀胱、肝脏、肾脏、脾脏、尿道、输尿管、前列腺、输精管、阴茎、卵巢、子宫、子宫内膜、输卵管或阴道,或与前述任何相关的任何组织。细胞可以是或可以疑似是癌性的(例如,肿瘤细胞)。例如,细胞可以源自肿瘤组织。细胞可以包括天然或非天然组分。例如,细胞可以

包括核酸,如脱氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)、蛋白质或碳水化合物。细胞可以包括一种或多种光学可检测元素,如一个或多个荧光团。荧光团可以对细胞来说是天然或非天然的。例如,荧光团可以是已经通过诸如一种或多种细胞染色或标记技术引入细胞的非天然荧光团。

[0100] 在一些情况下,可以使用本文描述的方法分析多个粒子。多个粒子中的粒子可以源自相同的来源或源自不同的来源。粒子可以具有相同或不同的特征。例如,第一粒子可以具有第一大小,并且第二粒子可以具有第二大小,其中第一大小和第二大小不相同。本文描述的方法和系统可以用于表征和/或识别多个粒子。例如,所述方法和系统可以表征第一粒子和第二粒子并提供关于粒子的大小和形态的信息,从而将第一粒子识别为与第二粒子不同。

[0101] 对许多单细胞进行成像和分析对于大幅提高对涉及免疫学(1)、癌症(2)、神经科学(3)、血液学(4)和发育(5)的异质系统的理解具有潜力。这些领域中的许多关键应用都需要根据高内涵图像中包括的信息,对特定细胞群体进行准确且高通量的分离。这带来一些挑战。首先,尽管有最近的发展(6-10),但是同时满足高灵敏度、多色性、高快门速率、高帧速率、连续采集和低成本的需求仍然是困难的。其次,超快和连续的图像采集随后需要计算图像的重构和分析,这在时间和金钱方面都是昂贵的(11)。由于这些挑战,在本文公开的方法和系统之前尚未实现荧光成像激活细胞分选(FiCS)。本文公开了可以将机器学习方法应用于使用单像素检测器测量的压缩成像信号,以实现超快、敏感和准确的基于形态学的细胞分析的方法和系统。所述方法和系统可以是无图像的(不需要图像产生),但如果需要,所述方法和系统可以并入图像产生。所述方法和系统可以进一步被配置为实时对粒子分选。这样的方法和系统可以被称为“鬼影细胞术”(GC)。

[0102] 图1A示出了将在GC过程中使用的光学压缩感测过程的一个示例的示意图。物体在图案化的光学结构上的相对运动可以用于将物体的空间信息压缩映射到一系列时域信号中。图案化的光学结构可以由矩阵 $H(x, y)$ 限定,该矩阵包括在光学结构内的每个区域的光学性质(如透射率、吸收率、反射率或其表示)的值。如图1所示, F_1 和 F_2 可以描绘物体的代表性特征(如荧光特征)。基于物体的运动, $H(x, y)$ 的空间变化光学性质可以被编码为荧光团 F_1 和 F_2 的光强度(如荧光发射强度)的时间调制(在图1A中分别表示为“来自 F_1 的发射强度”和“来自 F_2 的发射强度”)。它们的总和 $g(t)$ 可以使用单像素检测器来记录,如图1A的底部所示。在成像模式下,物体的二维(2D)图像可以通过组合使用复用时域波形 $g(t)$ 和光学结构 $H(x, y)$ 的强度分布计算重构。在无图像模式下,将机器学习方法直接应用于压缩时域波形可以产生高通量、高准确度、无图像的基于形态学的细胞分类。图1A描绘的示意图未按比例绘制。

[0103] 在GC中,当物体穿过图案化的光学结构时,结构中的每个排列的散斑可以顺序地处于物体的不同位置。例如,结构中的每个排列的散斑可以在物体的不同位置顺序地激发荧光团。来自每个位置的编码强度可以被复用并压缩地和连续地被测定为使用检测器(例如,单像素检测器,如光电倍增管(PMT))测量的单个时域波形。假设物体以速率 v 进行恒定的单向运动,则信号采集可以在数学上描述为:

$$[0104] \quad g(t) = \int \int H(x, y) I(x - vt, y) dx dy \quad (1)$$

[0105] 其中 $g(t)$ 为复用的时域波形, $H(x, y)$ 为光学结构的强度分布,并且 $I(x, y)$ 为运动

物体的强度分布。注意,作为空间编码算符的 $H(x,y)$ 可以是静态的,因此在GC中可以不需要扫描或顺序光投射。本文描述了用于光学结构的二进制随机模式作为简单的实施方式。在GC的测量过程中,可以沿 x 方向将物体与光学结构卷积,并且可以沿 y 方向对所得信号积分。在压缩感测文献中,随机卷积可以被视为成像模态(12)。假定方程式(1)为正向模型,则图像重构过程可相当于求解反问题。可以通过最小化目标函数来迭代估计解决方案,该目标函数可以通过组合使用复用时域波形 $g(t)$ 和光学结构 $H(x,y)$ 的强度分布来计算。对于正则化域中的稀疏事件,可以通过采用压缩感测算法,如两步迭代收缩/阈值(TwIST)(13),根据测量信号 $g(t)$ 合理地估计运动物体。这种重构过程可以与鬼影成像共享其概念,其中在将多个随机光学图案顺序投影到物体上并使用单像素检测器(14-19)记录所得信号之后,通过计算恢复原始图像。尽管鬼影成像在科学界引起了极大的关注,但光学图案的顺序投影使其变慢,并且阻碍了其实际使用。即使采用压缩感测来减少光投射所需的时间,该方法仍比传统的阵列像素相机(18)慢。相反,GC可以不需要任何装置移动,并且图像采集的速率可以随物体的运动而增加。GC中图像采集的速率可以仅受单像素检测器带宽的限制。这种带宽可以非常高,如至少约1兆赫兹(MHz)、10MHz、100MHz、1千兆赫兹(GHz)或更高。因此,在GC中运动的使用可以将缓慢的鬼影成像转换为实用、超快且连续的成像过程。例如,GC可以达到比以前的荧光鬼影成像方法快至少一万倍的采集速率。

[0106] 在一方面,本公开内容提供了一种用于粒子分析的方法。该方法可以包括从粒子相对于图案化的光学结构的运动获得空间信息。接下来,可以将空间信息压缩转换为顺序到达检测器的信号。然后这些信号可以用于分析粒子。

[0107] 图1B示出了粒子分析方法100的流程图。在第一操作110中,方法100可以包括从粒子相对于图案化的光学结构的运动获得空间信息。空间信息可以包括光学空间信息,其可以通过光学感测方法获得的空间信息。备选地或组合地,空间信息可以包括非光学空间信息,其可以通过非光学感测方法获得,如阻抗测量。

[0108] 粒子可以包括一个或多个生物粒子。粒子可包括一个或多个细胞。

[0109] 粒子可以包括一个或多个稀有细胞。稀有细胞(与分析中的其他细胞相比)可以以至多约10分之一、20分之一、30分之一、40分之一、50分之一、60分之一、70分之一、80分之一、90分之一、100分之一、200分之一、300分之一、400分之一、500分之一、600分之一、700分之一、800分之一、900分之一、1,000分之一、2,000分之一、3,000分之一、4,000分之一、5,000分之一、6,000分之一、7,000分之一、8,000分之一、9,000分之一、10,000分之一、20,000分之一、30,000分之一、40,000分之一、50,000分之一、60,000分之一、70,000分之一、80,000分之一、90,000分之一、100,000分之一、200,000分之一、300,000分之一、400,000分之一、500,000分之一、600,000分之一、700,000分之一、800,000分之一、900,000分之一、1,000,000分之一、2,000,000分之一、3,000,000分之一、4,000,000分之一、5,000,000分之一、6,000,000分之一、7,000,000分之一、8,000,000分之一、9,000,000分之一、10,000,000分之一、20,000,000分之一、30,000,000分之一、40,000,000分之一、50,000,000分之一、60,000,000分之一、70,000,000分之一、80,000,000分之一、90,000,000分之一、100,000,000分之一、200,000,000分之一、300,000,000分之一、400,000,000分之一、500,000,000分之一、600,000,000分之一、700,000,000分之一、800,000,000分之一、900,000,000分之一、1,000,000,000或更低的浓度存在。稀有细胞可以以至少约1,000,000,000分之一、900,

000,000分之一、800,000,000分之一、700,000,000分之一、600,000,000分之一、500,000,000分之一、400,000,000分之一、300,000,000分之一、200,000,000分之一、100,000,000分之一、90,000,000分之一、80,000,000分之一、70,000,000分之一、60,000,000分之一、50,000,000分之一、40,000,000分之一、30,000,000分之一、20,000,000分之一、10,000,000分之一、9,000,000分之一、8,000,000分之一、7,000,000分之一、6,000,000分之一、5,000,000分之一、4,000,000分之一、3,000,000分之一、2,000,000分之一、1,000,000分之一、900,000分之一、800,000分之一、700,000分之一、600,000分之一、500,000分之一、400,000分之一、300,000分之一、200,000分之一、100,000分之一、90,000分之一、80,000分之一、70,000分之一、60,000分之一、50,000分之一、40,000分之一、30,000分之一、20,000分之一、10,000分之一、9,000分之一、8,000分之一、7,000分之一、6,000分之一、5,000分之一、4,000分之一、3,000分之一、2,000分之一、1,000分之一、900分之一、800分之一、700分之一、600分之一、500分之一、400分之一、300分之一、200分之一、100分之一、90分之一、80分之一、70分之一、60分之一、50分之一、40分之一、30分之一、20分之一、10分之一或更高的浓度存在。稀有细胞可以以在前述任何两个值定义的范围内的浓度存在。

[0110] 粒子可以包括一个或多个癌细胞。粒子可以包括一个或多个循环肿瘤细胞。粒子可以包括本文所述的任何细胞。细胞可以源自本文所述的任何来源。细胞可以包括本文所述的任何天然或非天然组分。

[0111] 图案化的光学结构可以包括多个区域。例如,图案化的光学结构可以包括至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000或更多个区域。图案化的光学结构可以包括至多约1,000,000、900,000、800,000、700,000、600,000、500,000、400,000、300,000、200,000、100,000、90,000、80,000、70,000、60,000、50,000、40,000、30,000、20,000、10,000、9,000、8,000、7,000、6,000、5,000、4,000、3,000、2,000、1,000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个区域。图案化的光学结构可以包括在前述任何两个值定义的范围内的多个区域。

[0112] 多个区域中的每个区域可以包括一个或多个特定的光学特征,如一个或多个透射率、吸收率或反射率。例如,每个区域可以包括至少约0%、1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的透射率、吸收率或反射率。每个区域可以包括至多约100%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、20%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%或0%的透射率、吸收率或反射率。每个区域可以包括在前述任何两个值定义的范围内的透射率、吸收率或反射率。

[0113] 不同区域的光学特征可以不同。例如,任何两个区域可以包括相同或不同的透射率、吸收率或反射率。光学特征可以因区域而异。

[0114] 图案化的光学结构可以包括空间光调制器(SLM)、数字微镜装置(DMD)、液晶(LC)装置或光掩模。

[0115] 可以使用微加工或纳米加工技术来制造图案化的光学结构。例如,可以使用以下

技术中的任何一种或多种来制造图案化的光学结构:溶剂清洗、白骨化洗涤、RCA清洗、离子注入、紫外光刻、深紫外光刻、极紫外光刻、电子束光刻、纳米压印光刻、湿化学蚀刻、干化学蚀刻、等离子蚀刻、反应离子蚀刻、深反应离子蚀刻、电子束铣削、热退火、热氧化、薄膜沉积、化学气相沉积、分子有机化学沉积、低压化学气相沉积、等离子增强化学气相沉积、物理气相沉积、溅射、原子层沉积、分子束外延、电化学沉积、晶片键合、引线键合、倒装芯片键合、热超声键合、晶片切割或任何其他微加工或纳米加工制造技术。

[0116] 图案化的光学结构可以包括有序图案化的光学结构。有序图案化的光学结构可以包括具有不同光学特性的区域的周期性或其他有序排列。图案化的光学结构可以包括无序图案化的光学结构。无序图案化的光学结构可以包括具有不同光学特性的区域的无序排列。图案化的光学结构可以包括非周期性图案化的光学结构。非周期性图案化的光学结构可以包括具有不同光学特性的区域的非周期性排列。图案化的光学结构可以包括随机或伪随机的图案化的光学结构。随机或伪随机图案化的光学结构可以包括具有不同光学特性的区域的随机或伪随机排列。

[0117] 无序或非周期性的光学结构,如随机或伪随机图案化的光学结构,可以允许例如通过降低整个频(或傅立叶)域的衰减以更高的保真度采集所研究物体的光学空间信息(如对应于该物体的图像的更精确重构)。使用本公开内容的系统和方法测量的信号可以被认为是图案化的光学结构和研究物体的一维卷积。当测量结果在频域中解释时,由于卷积定理,这可对应于图案化的光学结构的傅立叶变换与研究物体的傅立叶变换的乘积。因此,为了在不衰减的情况下测量与研究物体相对应的光学空间信息,获得接近均匀分布的图案化的光学结构的傅里叶变换可能是有益的。无序或非周期性函数的傅立叶变换是均匀分布的。因此,无序或非周期性的图案化的光学结构,如随机或伪随机图案化的光学结构,可以允许以更高的保真度来获取所研究物体的光学空间信息。

[0118] 在第二操作120中,方法100可以包括将空间信息压缩转换为顺序到达检测器的信号。检测器可以包括一个或多个单像素检测器。检测器可以包括一个或多个多像素检测器。检测器可以包括至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000、10,000、20,000、30,000、40,000、50,000、60,000、70,000、80,000、90,000、100,000、200,000、300,000、400,000、500,000、600,000、700,000、800,000、900,000、1,000,000或更多个像素。检测器可以包括至多约1,000,000、900,000、800,000、700,000、600,000、500,000、400,000、300,000、200,000、100,000、90,000、80,000、70,000、60,000、50,000、40,000、30,000、20,000、10,000、9,000、8,000、7,000、6,000、5,000、4,000、3,000、2,000、1,000、900、800、700、600、500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个像素。检测器可以包括在所述任何两个值定义的范围内的多个像素。

[0119] 检测器可以包括一个或多个光电倍增管(PMT)、光电二极管、雪崩式光电二极管、光电晶体管、反向偏置发光二极管(LED)、电荷耦合器件(CCD)或互补金属氧化物半导体(CMOS)相机。

[0120] 检测器可以被配置为检测光。光可以包括红外(IR)、可见光或紫外(UV)光。光可以包括多个波长。光可以包括至少约200nm、210nm、220nm、230nm、240nm、250nm、260nm、270nm、280nm、290nm、300nm、310nm、320nm、330nm、340nm、350nm、360nm、370nm、380nm、390nm、

400nm、410nm、420nm、430nm、440nm、450nm、460nm、470nm、480nm、490nm、500nm、510nm、520nm、530nm、540nm、550nm、560nm、570nm、580nm、590nm、600nm、610nm、620nm、630nm、640nm、650nm、660nm、670nm、680nm、690nm、700nm、710nm、720nm、730nm、740nm、750nm、760nm、770nm、780nm、790nm、800nm、810nm、820nm、830nm、840nm、850nm、860nm、870nm、880nm、890nm、900nm、910nm、920nm、930nm、940nm、950nm、960nm、970nm、980nm、990nm、1,000nm或更大的一个或多个波长。

[0121] 光可以包括至多约1,000nm、990nm、980nm、970nm、960nm、950nm、940nm、930nm、920nm、910nm、900nm、890nm、880nm、870nm、860nm、850nm、840nm、830nm、820nm、810nm、800nm、790nm、780nm、770nm、760nm、750nm、740nm、730nm、720nm、710nm、700nm、690nm、680nm、670nm、660nm、650nm、640nm、630nm、620nm、610nm、600nm、590nm、580nm、570nm、560nm、550nm、540nm、530nm、520nm、510nm、500nm、490nm、480nm、470nm、460nm、450nm、440nm、430nm、420nm、410nm、400nm、390nm、380nm、370nm、360nm、350nm、340nm、330nm、320nm、310nm、300nm、290nm、280nm、270nm、260nm、250nm、240nm、230nm、220nm、210nm、200nm或更小的一个或多个波长。光可以包括在前述任何两个值定义的范围内的一个或多个波长。

[0122] 光可以具有至少约0.001nm、0.002nm、0.003nm、0.004nm、0.005nm、0.006nm、0.007nm、0.008nm、0.009nm、0.01nm、0.02nm、0.03nm、0.04nm、0.05nm、0.06nm、0.07nm、0.08nm、0.09nm、0.1nm、0.2nm、0.3nm、0.4nm、0.5nm、0.6nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm或更大的带宽。光可以具有至多约100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm、0.9nm、0.8nm、0.7nm、0.6nm、0.5nm、0.4nm、0.3nm、0.2nm、0.1nm、0.09nm、0.08nm、0.07nm、0.06nm、0.05nm、0.04nm、0.03nm、0.02nm、0.01nm、0.009nm、0.008nm、0.007nm、0.006nm、0.005nm、0.004nm、0.003nm、0.002nm、0.001nm或更小的带宽。光可以具有在前述任何两个值定义的范围内的带宽。

[0123] 检测器可以具有至少约1MHz、2MHz、3MHz、4MHz、5MHz、6MHz、7MHz、8MHz、9MHz、10MHz、20MHz、30MHz、40MHz、50MHz、60MHz、70MHz、80MHz、90MHz、100MHz、200MHz、300MHz、400MHz、500MHz、600MHz、700MHz、800MHz、900MHz、1GHz、2GHz、3GHz、4GHz、5GHz、6GHz、7GHz、8GHz、9GHz、10GHz、20GHz、30GHz、40GHz、50GHz、60GHz、70GHz、80GHz、90GHz、100GHz、200GHz、300GHz、400GHz、500GHz、600GHz、700GHz、800GHz、900GHz、1,000GHz或更高的刷新率。

[0124] 检测器可以具有至多约1,000GHz、900GHz、800GHz、700GHz、600GHz、500GHz、400GHz、300GHz、200GHz、100GHz、90GHz、80GHz、70GHz、60GHz、50GHz、40GHz、30GHz、20GHz、10GHz、9GHz、8GHz、7GHz、6GHz、5GHz、4GHz、3GHz、2GHz、1GHz、900MHz、80MHz、700MHz、600MHz、500MHz、400MHz、300MHz、200MHz、100MHz、90MHz、80MHz、70MHz、60MHz、50MHz、40MHz、30MHz、20MHz、10MHz、9MHz、8MHz、7MHz、6MHz、5MHz、4MHz、3MHz、2MHz、1MHz或更小的刷新率。检测器可以具有在前述任何两个值定义的范围内的刷新率。

[0125] 第二操作120可以包括应用两步迭代收缩/阈值 (TwIST) 过程。

[0126] 在第三操作130中,方法100可以包括使用信号来识别粒子的至少一个子集。第三操作130可以包括如本文所述(例如,关于图1A)至少部分地通过组合使用一个或多个时域

波形来计算重构粒子的形态,所述时域波形包括由图案化的光学结构赋予的一个或多个光强度分布。

[0127] 第一操作110可以包括:(i)将来自光源的光引导通过图案化的光学结构,(ii)将来自图案化的光学结构的光引导至粒子,以及(iii)将来自粒子的光引导至检测器。在这种场景下,图案化的光学结构可以在光与粒子相互作用之前将光学编码赋予来自光源的光。这样的场景可以被称为结构化照明(SI)。

[0128] 备选地或组合地,第一操作110可以包括:(i)将来自光源的光引导至粒子,(ii)将来自粒子的光引导通过图案化的光学结构,以及(iii)将来自图案化的光学结构的光引导至检测器。在这种场景下,图案化的光学结构可以在光与粒子相互作用之后将光学编码赋予来自光源的光。这样的场景可以被称为结构化检测(SD)。

[0129] 光源可以包括激光器。例如,光源可以包括连续波激光器。光源可以包括脉冲激光器。光源可以包括气体激光器,如氦氖(HeNe)激光器、氩(Ar)激光器、氪(Kr)激光器、氙(Xe)离子激光器、氮(N₂)激光器、二氧化碳(CO₂)激光器、一氧化碳(CO)激光器、横向受激大气(TEA)激光器或准分子激光器。例如,光源可以包括氩二聚体(Ar₂)准分子激光器、氪二聚体(Kr₂)准分子激光器、氟二聚体(F₂)准分子激光器、氙二聚体(Xe₂)准分子激光器、氟化氩(ArF)准分子激光器、氯化氪(KrCl)准分子激光器、氟化氪(KrF)准分子激光器、溴化氙(XeBr)准分子激光器、氯化氙(XeCl)准分子激光器或氟化氙(XeF)准分子激光器。光源可以包括染料激光器。

[0130] 光源可以包括金属蒸气激光器,如氦镉(HeCd)金属蒸气激光器、氦汞(HeHg)金属蒸气激光器、氦硒(HeSe)金属蒸气激光器、氦银(HeAg)金属蒸气激光器、铯(Sr)金属蒸气激光器、铕铜(NeCu)金属蒸气激光器、铜(Cu)金属蒸气激光器、金(Au)金属蒸气激光器、锰(Mn)金属蒸气或氯化锰(MnCl₂)金属蒸气激光器。

[0131] 光源可以包括固态激光器,如红宝石激光器、金属掺杂的晶体激光器或金属掺杂的光纤激光器。例如,光源可以包括掺钕钇铝石榴石(Nd:YAG)激光器、掺钕/铬钇铝石榴石(Nd/Cr:YAG)激光器、掺铒钇铝石榴石(Er:YAG)激光器、掺钕钇氟化锂(Nd:YLF)激光器、掺钕正钒酸钇(Nd:YVO₄)激光器、掺钕氧硼酸钇钙(Nd:YCOB)激光器、钕玻璃(Nd:玻璃)激光器、钛蓝宝石(Ti:蓝宝石)激光器、掺铈钇铝石榴石(Tm:YAG)激光器、掺铈钇铝石榴石(Yb:YAG)激光器、掺铈玻璃(Yt:玻璃)激光器、钬钇铝石榴石(Ho:YAG)激光器、掺铬硒化锌(Cr:ZnSe)激光器、掺铈铈氟化铝(Ce:LiSAF)激光器、掺铈铈氟化铝(Ce:LiCAF)激光器、掺铈玻璃(Er:玻璃)、铈共掺玻璃(Er/Yt:玻璃)激光器、掺铈氟化钙(U:CaF₂)激光器或掺铈氟化钙(Sm:CaF₂)激光器。

[0132] 光源可以包括半导体激光器或二极管激光器,如氮化镓(GaN)激光器、氮化镓铟(InGaN)激光器、磷化铝镓铟(AlGaInP)激光器、砷化铝镓(AlGaAs)激光器、磷化铟镓砷(InGaAsP)激光器、垂直腔表面发射激光器(VCSEL)或量子级联激光器。

[0133] 光源可以被配置为发射光。光可以包括红外(IR)光、可见光或紫外(UV)光。光可以包括多个波长。光可以包括至少约200nm、210nm、220nm、230nm、240nm、250nm、260nm、270nm、280nm、290nm、300nm、310nm、320nm、330nm、340nm、350nm、360nm、370nm、380nm、390nm、400nm、410nm、420nm、430nm、440nm、450nm、460nm、470nm、480nm、490nm、500nm、510nm、520nm、530nm、540nm、550nm、560nm、570nm、580nm、590nm、600nm、610nm、620nm、630nm、

640nm、650nm、660nm、670nm、680nm、690nm、700nm、710nm、720nm、730nm、740nm、750nm、760nm、770nm、780nm、790nm、800nm、810nm、820nm、830nm、840nm、850nm、860nm、870nm、880nm、890nm、900nm、910nm、920nm、930nm、940nm、950nm、960nm、970nm、980nm、990nm、1,000nm或更大的一个或多个波长。

[0134] 光可以包括至多约1,000nm、990nm、980nm、970nm、960nm、950nm、940nm、930nm、920nm、910nm、900nm、890nm、880nm、870nm、860nm、850nm、840nm、830nm、820nm、810nm、800nm、790nm、780nm、770nm、760nm、750nm、740nm、730nm、720nm、710nm、700nm、690nm、680nm、670nm、660nm、650nm、640nm、630nm、620nm、610nm、600nm、590nm、580nm、570nm、560nm、550nm、540nm、530nm、520nm、510nm、500nm、490nm、480nm、470nm、460nm、450nm、440nm、430nm、420nm、410nm、400nm、390nm、380nm、370nm、360nm、350nm、340nm、330nm、320nm、310nm、300nm、290nm、280nm、270nm、260nm、250nm、240nm、230nm、220nm、210nm、200nm或更小的一个或多个波长。光可以包括在前述任何两个值定义的范围内的一个或多个波长。

[0135] 光可以具有至少约0.001nm、0.002nm、0.003nm、0.004nm、0.005nm、0.006nm、0.007nm、0.008nm、0.009nm、0.01nm、0.02nm、0.03nm、0.04nm、0.05nm、0.06nm、0.07nm、0.08nm、0.09nm、0.1nm、0.2nm、0.3nm、0.4nm、0.5nm、0.6nm、0.7nm、0.8nm、0.9nm、1nm、2nm、3nm、4nm、5nm、6nm、7nm、8nm、9nm、10nm、20nm、30nm、40nm、50nm、60nm、70nm、80nm、90nm、100nm或更大的带宽。光可以具有至多约100nm、90nm、80nm、70nm、60nm、50nm、40nm、30nm、20nm、10nm、9nm、8nm、7nm、6nm、5nm、4nm、3nm、2nm、1nm、0.9nm、0.8nm、0.7nm、0.6nm、0.5nm、0.4nm、0.3nm、0.2nm、0.1nm、0.09nm、0.08nm、0.07nm、0.06nm、0.05nm、0.04nm、0.03nm、0.02nm、0.01nm、0.009nm、0.008nm、0.007nm、0.006nm、0.005nm、0.004nm、0.003nm、0.002nm、0.001nm或更小的带宽。光可以具有在前述任何两个值定义的范围内的带宽。

[0136] 光可以具有至少约1微瓦(μ W)、2 μ W、3 μ W、4 μ W、5 μ W、6 μ W、7 μ W、8 μ W、9 μ W、10 μ W、20 μ W、30 μ W、40 μ W、50 μ W、60 μ W、70 μ W、80 μ W、90 μ W、100 μ W、200 μ W、300 μ W、400 μ W、500 μ W、600 μ W、700 μ W、800 μ W、900 μ W、1毫瓦(mW)、2mW、3mW、4mW、5mW、6mW、7mW、8mW、9mW、10mW、20mW、30mW、40mW、50mW、60mW、70mW、80mW、90mW、100mW、200mW、300mW、400mW、500mW、600mW、700mW、800mW、900mW、1瓦(W)、2W、3W、4W、5W、6W、7W、8W、9W、10W或更高的平均光功率。

[0137] 光可以具有至多约10W、9W、8W、7W、6W、5W、4W、3W、2W、1W、900mW、800mW、700mW、600mW、500mW、400mW、300mW、200mW、100mW、90mW、80mW、70mW、60mW、50mW、40mW、30mW、20mW、10mW、9mW、8mW、7mW、6mW、5mW、4mW、3mW、2mW、1mW、900 μ W、800 μ W、700 μ W、600 μ W、500 μ W、400 μ W、300 μ W、200 μ W、100 μ W、90 μ W、80 μ W、70 μ W、60 μ W、50 μ W、40 μ W、30 μ W、20 μ W、10 μ W、9 μ W、8 μ W、7 μ W、6 μ W、5 μ W、4 μ W、3 μ W、2 μ W、1 μ W或更低的平均光功率。光可以具有在前述任何两个值定义的范围内的光功率。

[0138] 光可以具有至少约1mW、2mW、3mW、4mW、5mW、6mW、7mW、8mW、9mW、10mW、20mW、30mW、40mW、50mW、60mW、70mW、80mW、90mW、100mW、200mW、300mW、400mW、500mW、600mW、700mW、800mW、900mW、1W、2W、3W、4W、5W、6W、7W、8W、9W、10W、10W、20W、30W、40W、50W、60W、70W、80W、90W、100W、200W、300W、400W、500W、600W、700W、800W、900W、1,000W或更高的峰值光功率。

[0139] 光可以具有至多约1,000W、900W、800W、700W、600W、500W、400W、300W、200W、100W、90W、80W、70W、60W、50W、40W、30W、20W、10W、9W、8W、7W、6W、5W、4W、3W、2W、1W、900mW、800mW、

700mW、600mW、500mW、400mW、300mW、200mW、100mW、90mW、80mW、70mW、60mW、50mW、40mW、30mW、20mW、10mW、9mW、8mW、7mW、6mW、5mW、4mW、3mW、2mW、1mW或更低的峰值光功率。光可以具有在
前述任何两个值定义的范围内的峰值光功率。

[0140] 光可以具有至少约100飞秒(fs)、200fs、300fs、400fs、500fs、600fs、700fs、800fs、900fs、1皮秒(ps)、2ps、3ps、4ps、5ps、6ps、7ps、8ps、9ps、10ps、20ps、30ps、40ps、50ps、60ps、70ps、80ps、90ps、100ps、200ps、300ps、400ps、500ps、600ps、700ps、800ps、900ps、1纳秒(ns)、2ns、3ns、4ns、5ns、6ns、7ns、8ns、9ns、10ns、20ns、30ns、40ns、50ns、60ns、70ns、80ns、90ns、100ns、200ns、300ns、400ns、500ns、600ns、700ns、800ns、900ns、1微秒(μ s)、2 μ s、3 μ s、4 μ s、5 μ s、6 μ s、7 μ s、8 μ s、9 μ s、10 μ s、20 μ s、30 μ s、40 μ s、50 μ s、60 μ s、70 μ s、80 μ s、90 μ s、100 μ s、200 μ s、300 μ s、400 μ s、500 μ s、600 μ s、700 μ s、800 μ s、900 μ s、1毫秒(1ms)或更大的脉冲长度。

[0141] 光可以具有至多约1ms、900 μ s、800 μ s、700 μ s、600 μ s、500 μ s、400 μ s、300 μ s、200 μ s、100 μ s、90 μ s、80 μ s、70 μ s、60 μ s、50 μ s、40 μ s、30 μ s、20 μ s、10 μ s、9 μ s、8 μ s、7 μ s、6 μ s、5 μ s、4 μ s、3 μ s、2 μ s、1 μ s、900ns、800ns、700ns、600ns、500ns、400ns、300ns、200ns、100ns、90ns、80ns、70ns、60ns、50ns、40ns、30ns、20ns、10ns、9ns、8ns、7ns、6ns、5ns、4ns、3ns、2ns、1ns、900ps、800ps、700ps、600ps、500ps、400ps、300ps、200ps、100ps、90ps、80ps、70ps、60ps、50ps、40ps、30ps、20ps、10ps、9ps、8ps、7ps、6ps、5ps、4ps、3ps、2ps、1ps、900fs、800fs、700fs、600fs、500fs、400fs、300fs、200fs、100fs或更小的脉冲长度。光可以具有在
前述任何两个值定义的范围内的脉冲长度。

[0142] 方法100还可以包括将一个或多个机器学习分类器应用于与信号相对应的一个或多个压缩波形。方法100还可以包括将一个或多个机器学习分类器应用于本文所述的一个或多个时域波形,或应用于与本文所述的一个或多个时域波形相关联的压缩波形。

[0143] 一个或多个机器学习分类器可以应用于波形,以识别本文所述的一个或多个粒子。一个或多个机器学习分类器可以被配置为识别一个或多个粒子,以获得至少约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.91%、99.92%、99.93%、99.94%、99.95%、99.96%、99.97%、99.98%、99.99%或更高的灵敏度、特异性和准确度的至少1、2或3项。

[0144] 一个或多个机器学习分类器可以被配置为识别一个或多个粒子,以获得至多约99.99%、99.98%、99.97%、99.96%、99.95%、99.94%、99.93%、99.92%、99.91%、99.9%、99.8%、99.7%、99.6%、99.5%、99.4%、99.3%、99.2%、99.1%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%或更少的灵敏度、特异性和准确度的至少1、2或3项。机器学习分类器可以被配置为识别一个或多个粒子,以获得在
前述任何两个值定义的范围内的灵敏度、特异性和准确度的至少1、2或3项。

[0145] 一个或多个机器学习分类器可以包括用于使用统计技术从一组或多组数据推断一个或多个特征的任何方法和技术。这些方法和技术可以包括监督、监督、半监督或无监督

的机器学习技术。机器学习技术可以包括回归分析、正则化、分类、降维、集成学习、元学习、强化学习、关联规则学习、聚类分析、异常检测或深度学习。机器学习技术可以包括,但不限于:k均值、k均值聚类、k最近邻、学习矢量量化、线性回归、非线性回归、最小二乘回归、偏最小二乘回归、逻辑回归、逐步回归、多元自适应回归样条、岭回归、主成分回归、最小绝对收缩和选择运算、最小角度回归、典型相关分析、因子分析、独立成分分析、线性判别分析、多维标度、非负矩阵分解、主成分分析、主坐标分析、投影追踪、Sammon映射、t分布随机近邻嵌入、AdaBoost、增强、自举集成、累加平均、决策树、条件决策树、增强决策树、梯度增强决策树、随机森林、堆叠泛化、贝叶斯网络、贝叶斯信念网络、朴素贝叶斯、高斯朴素贝叶斯、多项式朴素贝叶斯、隐马尔可夫模型、分层隐马尔可夫模型、支持向量机、编码器、解码器、自动编码器、堆叠式自动编码器、感知器、多层感知器、人工神经网络、前馈神经网络、卷积神经网络、递归神经网络、长短期记忆、深度置信网络、深度玻尔兹曼机器、深度卷积神经网络、深度递归神经网络或生成对抗网络。

[0146] 可以训练一个或多个机器学习分类器,以直接从时域波形或压缩的时域波形中学习粒子的识别。这样,可以在没有图像重构的情况下分析粒子。

[0147] 备选地或组合地,可以训练一个或多个机器学习分类器,以从时域波形或压缩的时域波形重构的一个或多个图像中学习粒子的识别。这样,方法100还可以包括重构粒子的一个或多个图像,并且可以基于重构的图像来分析粒子。一个或多个图像可以包括一个或多个明场、交叉极化、暗场、相位对比、微分干涉反差(DIC)、反射干涉、Sarfus、荧光、落射荧光、共聚焦、光片、多光子、超分辨率、近场扫描光学、近场光学随机映射(NORM)、结构化照明(SIM)、空间调制照明(SMI)、4- π 、受激发射损耗(STED)、基态损耗(GSD)、可逆饱和光学线性荧光跃迁(RESOLFT)、结合激活定位(BALM)、光激活定位(PALM)、随机光学重构(STORM)、直接随机光学重构(dSTORM)、超分辨率光学波动(SOFI)或无所不在定位(omnipresent localization,OLM)图像。

[0148] 方法100还可以包括重构多个粒子图像,如至少约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、60、70、80、90、100或更多个粒子图像,至多100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个粒子图像,或在前述任何两个值定义的范围内的多个粒子图像。多个图像中的每个图像可以包括不同的波长或波长范围。

[0149] 一个或多个图像可以没有模糊伪影。例如,当粒子相对于图案化的光学结构,以至少约每秒1毫米(mm/s)、2mm/s、3mm/s、4mm/s、5mm/s、6mm/s、7mm/s、8mm/s、9mm/s、10mm/s、20mm/s、30mm/s、40mm/s、50mm/s、60mm/s、70mm/s、80mm/s、90mm/s、100mm/s、200mm/s、300mm/s、400mm/s、500mm/s、600mm/s、700mm/s、800mm/s、900mm/s、每秒1米(m/s)、2m/s、3m/s、4m/s、5m/s、6m/s、7m/s、8m/s、9m/s、10m/s、20m/s、30m/s、40m/s、50m/s、60m/s、70m/s、80m/s、90m/s、100m/s、200m/s、300m/s、400m/s、500m/s、600m/s、700m/s、800m/s、900m/s、1,000m/s或更大的速率移动时,一个或多个图像可以没有模糊伪影。

[0150] 当粒子相对于图案化的光学结构,以至多约1,000m/s、900m/s、800m/s、700m/s、600m/s、500m/s、400m/s、300m/s、200m/s、100m/s、90m/s、80m/s、70m/s、60m/s、50m/s、40m/s、30m/s、20m/s、10m/s、9m/s、8m/s、7m/s、6m/s、5m/s、4m/s、3m/s、2m/s、1m/s、900mm/s、800mm/s、700mm/s、600mm/s、500mm/s、400mm/s、300mm/s、200mm/s、100mm/s、90mm/s、80mm/s、70mm/s、60mm/s、50mm/s、40mm/s、30mm/s、20mm/s、10mm/s、9mm/s、8mm/s、7mm/s、6mm/s、

5mm/s、4mm/s、3mm/s、2mm/s、1mm/s或更小的速率移动时，一个或多个图像可以没有模糊伪影。当粒子相对于图案化的光学结构，以在所述任何两个值定义的范围内的速率移动时，一个或多个图像可以没有模糊伪影。

[0151] 方法100还可以包括将粒子的至少一个子集分选为一组或多组分选的粒子。例如，该方法还可以包括基于粒子的形态将粒子分选为一组或多组分选的粒子。可以通过激活一个或多个致动器（例如，压电单元）来引导或转移一个或多个粒子或包括一个或多个粒子的流体流，例如，从一个通道至另一个通道，对粒子（例如，细胞）进行识别和分离、隔离或分选。例如，这种一个或多个致动器可以提供流体或压力脉冲（例如，通过超声信号）。

[0152] 可以以至少约每秒1个粒子、每秒2个粒子、每秒3个粒子、每秒4个粒子、每秒5个粒子、每秒6个粒子、每秒7个粒子、每秒8个粒子、每秒9个粒子、每秒10个粒子、每秒20个粒子、每秒30个粒子、每秒40个粒子、每秒50个粒子、每秒60个粒子、每秒70个粒子、每秒80个粒子、每秒90个粒子、每秒100个粒子、每秒200个粒子、每秒300个粒子、每秒400个粒子、每秒500个粒子、每秒600个粒子、每秒700个粒子、每秒800个粒子、每秒900个粒子、每秒1,000个粒子、每秒2,000个粒子、每秒3,000个粒子、每秒4,000个粒子、每秒5,000个粒子、每秒6,000个粒子、每秒7,000个粒子、每秒8,000个粒子、每秒9,000个粒子、每秒10,000个粒子、每秒20,000个粒子、每秒30,000个粒子、每秒40,000个粒子、每秒50,000个粒子、每秒60,000个粒子、每秒70,000个粒子、每秒80,000个粒子、每秒90,000个粒子、每秒100,000个粒子、每秒200,000个粒子、每秒300,000个粒子、每秒400,000个粒子、每秒500,000个粒子、每秒600,000个粒子、每秒700,000个粒子、每秒800,000个粒子、每秒900,000个粒子、每秒1,000,000个粒子或更大的速率对粒子（例如，细胞）进行识别和分离、隔离或分选。

[0153] 可以以至多每秒1,000,000个粒子、每秒900,000个粒子、每秒800,000个粒子、每秒700,000个粒子、每秒600,000个粒子、每秒500,000个粒子、每秒400,000个粒子、每秒300,000个粒子、每秒200,000个粒子、每秒100,000个粒子、每秒90,000个粒子、每秒80,000个粒子、每秒70,000个粒子、每秒60,000个粒子、每秒50,000个粒子、每秒40,000个粒子、每秒30,000个粒子、每秒20,000个粒子、每秒10,000个粒子、每秒9,000个粒子、每秒8,000个粒子、每秒7,000个粒子、每秒6,000个粒子、每秒5,000个粒子、每秒4,000个粒子、每秒3,000个粒子、每秒2,000个粒子、每秒1,000个粒子、每秒900个粒子、每秒800个粒子、每秒700个粒子、每秒600个粒子、每秒500个粒子、每秒400个粒子、每秒300个粒子、每秒200个粒子、每秒100个粒子、每秒90个粒子、每秒80个粒子、每秒70个粒子、每秒60个粒子、每秒50个粒子、每秒40个粒子、每秒30个粒子、每秒20个粒子、每秒10个粒子、每秒9个粒子、每秒8个粒子、每秒7个粒子、每秒6个粒子、每秒5个粒子、每秒4个粒子、每秒3个粒子、每秒2个粒子、每秒1个粒子或更小的速率对粒子（例如，细胞）进行识别和分离、隔离或分选。可以以在所述任何两个值定义的范围内的速率来实现对粒子（例如，细胞）进行识别和分离、隔离或分选。

[0154] 方法100还可以包括收集一组或多组分选的粒子，以生成富集的粒子混合物。一组或多组分选的粒子可以具有至少约60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%、99.91%、99.92%、99.93%、99.94%、99.95%、99.96%、99.97%、99.98%、99.99%或更高的纯度。

[0155] 一组或多组分选的粒子可以具有至多约99.99%、99.98%、99.97%、99.96%、99.95%、99.94%、99.93%、99.92%、99.91%、99.9%、99.8%、99.7%、99.6%、99.5%、99.4%、99.3%、99.2%、99.1%、99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%、79%、78%、77%、76%、75%、74%、73%、72%、71%、70%、69%、68%、67%、66%、65%、64%、63%、62%、61%、60%或更低的纯度。一组或多组分选的粒子可以具有在所述任何两个值定义的范围内的纯度。

[0156] 方法100还可以包括对来自一组或多组分选粒子的一个或多个粒子进行一种或多种测定。一种或多种测定可以包括选自以下的一个或多个成员：裂解、核酸提取、核酸扩增、核酸测序和蛋白质测序。

[0157] 方法100还可以包括使粒子经受流体动力流聚焦。在操作110之前，操作110期间，操作110之后，操作120之前，操作120期间，操作120之后，操作130之前，操作130期间和/或操作130之后可以对粒子进行流体动力流聚焦。

[0158] 方法100还可以包括当粒子相对于图案化的光学结构移动时，收集粒子的部分透射散斑图案。散斑图案可以由已通过图案化的光学结构的光的衍射生成。例如，相干光可以与图案化的光学结构相互作用，以产生结构化照明，该照明可以指向物镜的焦点。聚焦后，相干光可以扩散并由于衍射而产生散斑图案。在距焦点相当长的长度处，散斑图案可以足够大，使得散斑图案的第一部分可以被阻挡，而散斑图案的第二部分被透射。这种阻挡可以使用例如虹膜来实现。原始散斑图案的这一小部分可以使用本文所述的任何检测器检测。当细胞粒子通过结构化照明时，透射光的相位和强度变化可以导致散斑图案的变化，这可以导致在检测器处检测到的光强度的变化。通过检测信号的调制，可以获得粒子的相位和/或强度信息。

[0159] 本文所述的系统和方法可以用于多种治疗应用中。

[0160] 在一些情况下，方法100可以用于从多个细胞中识别一个或多个靶细胞。用于从多个细胞中识别一个或多个靶细胞的方法可以包括本文所述方法100的任何一个或多个操作，如方法100的操作110、120和130中的一个或多个。例如，从多个细胞中识别一个或多个靶细胞的方法可以包括：(a) 从多个细胞相对于图案化的光学结构的运动中获得空间信息（例如，如本文所述的关于方法100的操作110），以及(b) 使用空间信息从多个细胞中识别一个或多个靶细胞。

[0161] 使用空间信息从多个细胞中识别一个或多个靶细胞可以包括使用空间信息分析一个或多个靶细胞（例如，如本文所述的关于方法100的操作130）。例如，可以如本文所述（例如，关于图1A）至少部分地通过组合使用一个或多个时域波形来计算重构粒子的形态，所述时域波形包括由图案化的光学结构赋予的一个或多个光强度分布。

[0162] 使用空间信息从多个细胞中识别一个或多个靶细胞可以包括应用一个或多个机器学习分类器以从多个细胞中识别靶细胞。一个或多个机器学习分类器可以包括本文所述的任何机器学习分类器。一个或多个机器学习分类器可以利用空间信息（或与空间信息相关联的信号）来识别靶细胞。例如，如本文参考方法100所述，一个或多个机器学习分类器可以应用于空间信息（或与空间信息相关联的信号）。

[0163] 可以训练一个或多个机器学习分类器，以学习直接从空间信息（或从与空间信息

相关联的信号)中识别多个细胞(或靶细胞)。这样,可以在没有图像重构的情况下分析多个细胞(或靶细胞)。

[0164] 备选地或组合地,可以训练一个或多个机器学习分类器,以学习从根据空间信息(或与空间信息相关联的信号)重构的一个或多个图像中识别多个细胞(或靶细胞)。这样,使用信号来识别一个或多个靶细胞还可以包括重构多个细胞(或靶细胞)的一个或多个图像。可以基于重构图像来分析多个细胞(或靶细胞)。一个或多个图像可以包括本文描述的任何图像(例如,关于方法100)。

[0165] 空间信息可以对应于与多个细胞有关的特征、特性或信息。空间信息可以和与多个细胞有关的特征、特性或信息一一对应。与多个细胞有关的特征、特性或信息可以包括一个或多个选自以下的成员:代谢状态、增殖状态、分化状态、成熟状态、标志物蛋白的表达、标志物基因的表达、细胞的形态、细胞器的形态、细胞器的位置、细胞器的大小或范围、细胞质的形态、细胞质的位置、细胞质的大小或范围、细胞核的形态、细胞核的位置、细胞核的大小或范围、线粒体的形态、线粒体的位置、线粒体的大小或范围、溶酶体的形态、溶菌酶的位置、溶菌酶的大小或范围、细胞内分子的分布、细胞内肽、多肽或蛋白质的分布、细胞内核酸的分布、细胞内聚糖或多糖的分布,以及细胞内脂质的分布。

[0166] 使用信号分离一个或多个靶细胞还可以包括基于多个细胞的形态将多个细胞分选为一组或多组分选的细胞,如本文所述(例如,关于方法100或图5A、图5B、图5C、图12A、图12B、图12C、图12D和图14中的任何一个)。一组或多组分选的细胞可以包括靶细胞。

[0167] 使用信号分离一个或多个靶细胞还可以包括收集一组或多组分选的细胞,以生成富集的细胞混合物,如本文所述(例如,关于方法100或图5A、图5B和图5C中的任何一个)。

[0168] 空间信息可以被压缩地转换为按顺序到达检测器的信号,如本文关于方法100所述。

[0169] 一个或多个靶细胞可以基于空间信息(或与空间信息相关联的信号)与多个细胞分离。分离一个或多个靶细胞可以包括:(i)使用空间信息(或与空间信息相关联的信号)分析多个细胞;(ii)基于分析多个细胞的结果,将多个细胞分选为一组或多组分选的细胞;以及(iii)从一组或多组分选的细胞中收集一个或多个靶细胞。

[0170] 使用空间信息(或与空间信息相关联的信号)从多个细胞中分离一个或多个靶细胞可以包括使用空间信息(或与空间信息相关联的信号)来分析一个或多个靶细胞(例如,如本文所述的关于方法100的操作130)。例如,可以如本文所述(例如,关于图1A)至少部分地通过组合使用一个或多个时域波形来计算重构粒子的形态,所述时域波形包括由图案化的光学结构赋予的一个或多个光强度分布。

[0171] 使用空间信息(或与空间信息相关联的信号)从多个细胞中分离一个或多个靶细胞可以包括将一个或多个机器学习分类器应用于与空间信息相对应的一个或多个时域波形或压缩的时域波形(或与空间信息相关的信号),如本文所述(例如,参考方法100)。

[0172] 使用空间信息(或与空间信息相关联的信号)分离一个或多个靶细胞还可以包括基于分析多个细胞的结果将多个细胞分选为一组或多组分选的细胞。例如,一组或多组分选的细胞可以基于多个细胞的形态,如本文所述(例如,关于方法100或图5A、图5B、图5C、图12A、图12B、图12C、图12D和图14中的任何一个)。一组或多组分选的细胞可以包括靶细胞。

[0173] 使用空间信息(或与空间信息相关联的信号)分离一个或多个靶细胞还可以包括

从一组或多组分选的细胞中收集一个或多个靶细胞。例如,可以收集一组或多组分选的细胞,以生成富集的细胞混合物,如本文所述(例如,关于方法100或图5A、图5B和图5C中的任何一个)。

[0174] 靶细胞可以包括一个或多个治疗性细胞。靶细胞可以包括选自以下的一个或多个成员:干细胞、间充质干细胞、诱导多能干细胞、胚胎干细胞、从诱导多能干细胞分化的细胞、从胚胎干细胞分化的细胞、基因工程细胞、血细胞、红细胞、白细胞、T细胞、B细胞、自然杀伤细胞、嵌合抗原受体T细胞、嵌合抗原受体自然杀伤细胞、癌细胞和胚细胞。

[0175] 在另一方面,本公开内容提供了一种至少部分基于粒子的形态对粒子进行分类或分选,而无需使用非天然标记的无图像方法,其准确度至少为80%或更高。

[0176] 图1C示出了用于对粒子进行分类或分选的无图像光学方法150的一个示例的流程图。在第一操作160中,方法150可以包括至少部分基于粒子的形态对粒子进行分类或分选,而无需使用非天然标记。操作160可以包括本文所述的方法100的任何一个或多个操作,如本文所述的操作110、120和130的任何一个或多个。

[0177] 基于本文提供的方法100或150的许多变化、变更和改编是可能的。例如,方法100或150的操作顺序可以改变,视情况而定,一些操作可以去除,一些操作可以重复,并且额外的操作被添加。一些操作可以连续执行。一些操作可以并行执行。一些操作可以执行一次。一些操作可以执行超过一次。一些操作可以包括子操作。一些操作可以是自动化的,而一些操作可以是手动的。

[0178] 在另一方面,本公开内容提供了一种用于粒子分析的系统。该系统可以包括被配置为引导粒子的流体流动路径。该系统还可以包括与流体流动路径的至少一部分感测连通的检测器,以及可操作地耦合至该检测器的一个或多个计算机处理器。一个或多个计算机处理器可以被单独或共同编程,以实现本文所述的方法100或150。例如,一个或多个计算机处理器可以被单独或共同编程以(i)从粒子相对于伪随机图案化的光学结构的随机运动中获取空间信息,(ii)将空间信息压缩转换为按顺序到达检测器的信号;以及(iii)使用信号分析粒子。在一些实施方案中,检测器是多像素检测器。或者,检测器可以是单像素检测器。

[0179] 计算机系统

[0180] 本公开内容提供被编程为实现本公开内容的方法和系统的计算机系统。图13示出了计算机系统1301,该计算机系统包括中央处理单元(CPU,本文也称为“处理器”和“计算机处理器”)1305,该中央处理单元可以是单核或多核处理器,或者是用于并行处理的多个处理器。计算机系统1301还包括存储器或存储器位置1310(例如,随机存取存储器、只读存储器、闪存)、电子存储单元1315(例如,硬盘)、用于与一个或多个其他系统通信的通信接口1320(例如,网络适配器),以及外围装置1325(如高速缓存、其他存储器、数据存储和/或电子显示适配器)。存储器1310、存储单元1315、接口1320和外围装置1325通过通信总线(实线)(如主板)与CPU 1305通信。存储单元1315可以是用于存储数据的数据存储单元(或数据存储库)。计算机系统1301可以借助于通信接口1320可操作地耦合至计算机网络(“网络”)1330。网络1330可以是因特网、互联网和/或外联网或与因特网通信的内联网和/或外联网。在一些情况下,网络1330是电信和/或数据网络。网络1330可以包括一个或多个计算机服务器,其可以实现分布式计算,如云计算。在一些情况下,网络1330可以借助计算机系统1301实现对等网络,该对等网络可以使耦合至计算机系统1301的装置充当客户端或服务器。

[0181] CPU 1305可以执行一系列机器可读指令,其可以体现在程序或软件中。指令可以被存储在存储器位置中,如存储器1310。指令可以被定向至CPU 1305,随后可以对CPU 1305进行编程或以其他方式配置CPU 1305,以实现本公开内容的方法。CPU 1305执行的操作示例可以包括获取、解码、执行和写回。

[0182] CPU 1305可以是电路如集成电路的一部分。系统1301的一个或多个其他部件可以包括在电路中。在一些情况下,该电路是专用集成电路 (ASIC)。

[0183] 存储单元1315可以存储文件,如驱动程序、库和保存的程序。存储单元1315可以存储用户数据,例如,用户偏好和用户程序。在一些情况下,计算机系统1301可以包括计算机系统1301外部的一个或多个附加数据存储单元,如位于通过内联网或因特网与计算机系统1301通信的远程服务器上。

[0184] 计算机系统1301可以通过网络1330与一个或多个远程计算机系统通信。例如,计算机系统1301可以与用户的远程计算机系统通信。远程计算机系统的示例包括个人计算机(例如,便携式PC)、平板或平板计算机(例如, Apple® iPad、Samsung® Galaxy Tab)、电话、智能电话(例如, Apple® iPhone、支持Android的装置、Blackberry®)或个人数字助理。用户可以通过网络1330访问计算机系统1301。

[0185] 如本文所述的方法(如本文所述的一种或多种用于粒子分析的方法、无图像光学方法,或从多个细胞中识别一个或多个靶细胞的方法)可以通过存储在计算机系统1301的电子存储位置上(例如,在存储器1310或电子存储单元1315上)的机器(例如,计算机处理器)可执行代码的方式来实现。可以以软件的形式提供机器可执行代码或机器可读代码。在使用期间,代码可以由处理器1305执行。在一些情况下,可以从存储单元1315中检索代码,并将其存储在存储器1310中,以供处理器1305随时访问。在一些情况下,可以不包括电子存储单元1315,并且将机器可执行指令存储在存储器1310中。

[0186] 可以对代码进行预编译并配置为与具有适于执行代码的处理器一起使用,或者可以在运行时编译。可以以编程语言提供代码,可以选择编程语言以使代码能够以预编译或即时编译的方式执行。

[0187] 本文提供的系统和方法的方面,如计算机系统1301,可以体现编程中。技术的各个方面可以被认为“产品”或“制品”,通常为在机器可读介质类型上承载或体现的机器(或处理器)可执行代码和/或相关数据的形式。机器可执行代码可以存储在电子存储单元上,如存储器(例如,只读存储器、随机存取存储器、闪存)或硬盘。“存储”类型的介质可以包括计算机、处理器等的任何或所有有形存储器,或其相关模块,如各种半导体存储器、磁带驱动器、磁盘驱动器等,它们可以随时为软件编程提供非暂时性存储。软件的全部或部分有时可以通过因特网或其他各种电信网络进行通信。例如,这种通信可以使软件能够从一个计算机或处理器加载到另一个计算机或处理器,例如,从管理服务器或主机加载到应用服务器的计算机平台。因此,可以承载软件元素的另一种介质类型包括光波、电波和电磁波,如在本地装置之间的物理接口之间、通过有线和光学陆线网络以及在各种空中链路上使用的。携带这种波的物理元件,如有线或无线链路、光链路等也可以被视为承载软件的介质。如本文所用,除非限于非暂时性的、有形的“存储”介质,否则诸如计算机或机器“可读介质”的术语是指参与向处理器提供指令以供执行的任何介质。

[0188] 因此,机器可读介质,如计算机可执行代码,可以采取许多形式,包括但不限于有形存储介质、载波介质或物理传输介质。非易失性存储介质包括,例如,光盘或磁盘,如任何计算机中的任何存储装置等,它们例如可用于实现附图所示的数据库等。易失性存储介质包括动态存储器,如此类计算机平台的主存储器。有形的传输介质包括同轴电缆;铜线和光纤,包括构成计算机系统内总线的电线。载波传输介质可以采用电信号或电磁信号的形式,或声波或光波的形式,如在射频(RF)和红外(IR)数据通信期间生成的那些。因此,计算机可读介质的常见形式包括例如:软盘、柔性盘、硬盘、磁带、任何其他磁介质、CD-ROM、DVD或DVD-ROM、任何其他光学介质、穿孔卡纸带、带孔图案的任何其他物理存储介质、RAM、ROM、PROM和EPROM、FLASH-EPROM、任何其他存储芯片或盒带、传输数据或指令的载波、传输此类载波的电缆或链路,或计算机可以从中读取编程代码和/或数据的任何其他介质。计算机可读介质的许多这些形式可以涉及将一个或多个指令的一个或多个序列传送给处理器以供执行。

[0189] 计算机系统1301可以包括电子显示器1335或与电子显示器1335通信,该电子显示器包括用户界面(UI) 1340,用于例向用户提供信息。UI的示例包括,但不限于,图形用户界面(GUI)和基于网络的用户界面。

[0190] 本公开内容的方法和系统可以通过一种或多种算法来实现,如对应于本文所述的一种或多种用于粒子分析的方法、无图像光学方法或用于从多个细胞中识别一个或多个靶细胞的方法的一种或多种算法。算法可以在中央处理单元1305执行时通过软件实现。

[0191] 方法和系统可以与例如W02016136801和W02017073737中描述的其他方法和系统组合或被其中描述的其他方法和系统修改,其每一个均通过引用整体并入本文。

[0192] 实施例

[0193] 实施例1:材料和方法

[0194] 用于这项工作的所有光电倍增管均购自Hamamatsu Photonics Inc.在图2和图3B和图3C中,使用示波器(8位,1GHz,Tektronix)使用 10^6 欧姆电阻记录PMT信号。具有内置放大器(H10723-210MOD2)的带宽为10MHz的PMT用于检测蓝色和绿色信号,而另一个与电流放大器(HCA-40M-100K-C,FEMTO)连接的PMT(7422-40)被用于检测红色信号。

[0195] 在图3D、图4和图5中,使用数字化仪(M4i.4451或M2i.4932-Expa,Spectrum,Germany)或带有模拟/数字转换器(ADC,部分修改,Texas Instruments,AD11445EVM)的FPGA开发板(TR4,Terasic)通过电子滤波器记录PMT信号。数字化仪和/或FPGA同时从每个颜色通道连续收集固定长度的信号段,并将固定触发条件应用于绿色信号。

[0196] 在图17A-图17E、图18A-图18F,以及图19A-图19D中,使用带有内置放大器(H10723-210 MOD2)的带宽为10MHz的PMT检测GC信号,而使用带宽为1MHz(H10723-210 MOD3)或10MHz(H10723-210 MOD2)的PMT检测荧光和侧向散射(SSC)信号。前向散射(FSC)信号使用光电探测器(PDA100A或PDA100A2,Thorlabs)获得。使用数字化仪(M4i.4451或M2i.4932-Expa,Spectrum,Germany)或带有模拟/数字转换器(部分修改,Texas Instrument,AD11445EVM)的FPGA开发板(TR4,Terasic)通过电子滤波器记录PMT信号。数字化仪和/或FPGA同时从每个颜色通道连续收集固定长度的信号段,并将固定触发条件应用于绿色信号。

[0197] 通过使用TwIST程序(13)解决以下优化问题,根据等式(1)所示,从使用GC测量的

时域信号重构物体图像：

$$[0198] \quad \arg \min_i \|g - H(x, y) i\| + \tau R(i) \quad (2)$$

[0199] 其中 g 为测得的时域信号的矢量, $H(x, y)$ 为GC的系统矩阵, i 为从输入物体图像 I 重构的矢量, R 为稀疏性正则化器,并且 τ 为正则化常数。 $\|\cdot\|$ 表示 l_2 范数。在CS中,图像物体可以在正则化空间中稀疏,这与等式(1)所示的随机卷积测量过程不一致(32)。

[0200] 在重构图3C的面板(i)中的图像时,选择小波变换,并使用Fejer-Korovkin缩放滤波器作为正则化器(33)。在重构其他图像时,选择总变化作为正则化器(34)。二维总变化量 R_{TV} 表示为

$$[0201] \quad R_{TV}(I) = \sum_x \sum_y \sqrt{(I_{x+1,y} - I_{x,y})^2 + (I_{x,y+1} - I_{x,y})^2} \quad (3)$$

[0202] 总体变化提高平滑度,同时保留物体图像的边缘。TwIST用小波变换或总变化编码。

[0203] 根据峰值信噪比(PSNR),用阵列像素彩色相机拍摄的图3C的面板(v)中的基线图像 I' 评估图3C的面板(iv)中的重构图像 I 。PSNR计算如下:

$$[0204] \quad PSNR(I, I') = 20 \cdot \log_{10} \frac{MAX(I')}{\sqrt{MSE(I, I')}} \quad (4)$$

[0205] 其中 $MAX(I')$ 为 I' 中的最大像素强度,并且 $MSE(I, I')$ 为 I 和 I' 之间的均方误差。PSNR越大,则表示重构越好,其最大值为无穷大。

[0206] 除非另有说明,否则所有试剂均购自Wako, Sigma-Aldrich或Invitrogen。D-PBS(-) (Wako)用于磷酸盐缓冲盐水(PBS)溶液。

[0207] 具有所有补体以及 $10\mu\text{M}$ Y-27632 (Wako)和 $0.25\mu\text{g}/\text{cm}^2$ iMatrix-511丝(Nippi)的Stem Fit AK02N(味之素)被用作诱导多能干细胞(iPSC)培养基。不含补体C但具有 $10\mu\text{M}$ SB431542 (Wako)和 $10\mu\text{M}$ DMH (Wako)的Stem Fit AK02N被用作神经祖细胞(NPC)分化培养基。不含补体C但具有 $10\text{ng}/\text{mL}$ 激活素A (Wako)和 $3\mu\text{M}$ CHIR99021 (Wako)的Stem Fit AK02N被用作内胚层分化培养基。具有20%Stemsure Serum Replacement (Wako)、1%L-丙氨酰L-谷氨酰胺溶液(Nacalai Tesque)、1%单硫代甘油溶液(Wako)、1%MEM非必需氨基酸溶液(Nacalai Tesque)和1%DMSO (Sigma-Aldrich)的Stemsure DMEM (Wako)被用作肝母细胞分化培养基。

[0208] MCF-7和MIA PaCa-2细胞购自RIKEN BRC CELL BANK。外周血单核细胞(PBMC)购自Astarte Biologics, Inc.。Jurkat细胞、Y-79视网膜母细胞瘤细胞和Raji细胞购自JCRB。T细胞购自ProMab。iPSC的制备方法如前所述,并且可以购自Coriell Institute (GM25256)。

[0209] MIA PaCa-2细胞在含有10%FBS的L-谷氨酰胺、酚红和丙酮酸钠(Wako)的D-MEM(高葡萄糖)中培养。Jurkat和Raji细胞分别在含有10%和20%FBS的L-谷氨酰胺和酚红(Wako)的RPMI-1640中培养。Y-79细胞在含有20%FBS的RPMI 1640培养基(Gibco)中培养。

[0210] 通过以下步骤从iPSC中分化NPC。在iPS培养基中以2500个细胞/ cm^2 的浓度接种iPSC(第0天)。在第1天,将培养基更换为NPC分化培养基。在第3天和第5天将培养基更换为相同的培养基。在第6天,超过90%的细胞为PAX6阳性NPC。

[0211] 通过以下步骤从iPSC中分化肝母细胞。在iPS培养基中以2500个细胞/ cm^2 的浓度

接种iPSC(第0天)。在第1天,将培养基更换为内胚层分化培养基。在第3天,将培养基更换为相同的培养基。在第5天,将培养基更换为肝母细胞分化培养基,并且在第7天和第9天将培养基更换为相同的培养基。在第10天,在免疫染色测试中,细胞显示AFP阳性。

[0212] 使用胰蛋白酶将MIA PaCa-2细胞从培养瓶中分离。通过移液将Jurkat细胞从培养瓶中取出。用PBS溶液洗涤后,将每种类型的细胞用4%多聚甲醛PBS溶液(Wako)固定15分钟。随后用PBS溶液洗涤细胞。向Jurkat细胞中加入FITC小鼠抗人CD45(BD Biosciences),并温育30分钟。用PBS溶液洗涤染色的Jurkat细胞。然后将每种类型的细胞混合,以使其流经分选系统。

[0213] 每个实验都使用iPSC、T细胞或raji细胞。分离前,将iPSC的培养基换为PBS溶液中的0.5mM EDTA,并且温育3分钟。然后将培养基换回iPSC培养基,并使用细胞刮棒分离细胞。通过移液将T细胞和raji细胞从培养瓶中取出。结合缓冲液洗涤后,将细胞用PI(医学与生物实验室)和膜联蛋白V-FITC(医学与生物实验室)染色15分钟,然后不经洗涤就流过系统。首先使用FSC-SSC散布图对细胞进行门控,以去除碎片,然后使用FSC高度-宽度散布图对细胞进行门控,以去除成对物(doublet)。根据PI和膜联蛋白V-FITC的荧光强度,进一步对门控细胞进行门控,并标记为活细胞、死细胞或凋亡细胞。将1,000个每个随机(无重叠)选择的细胞(具有相同数量的未分化和分化细胞)用作训练和测试数据。

[0214] 使用细胞刮棒将iPSC、NPC和肝母细胞各自从培养瓶中分离。用缓冲溶液(D-PBS中的1%FBS,X%EDTA)洗涤后,分别用钙黄绿素AM(Dojindo)和rBC2LCN-635(Wako)染色,然后用缓冲溶液洗涤。为了对未分化细胞(iPSC)和分化细胞(NPC或肝母细胞)分类,将每种细胞以相等的浓度混合。使混合的悬浮液流过iSGC系统。首先使用FSC-SSC散布图对细胞进行门控,以去除死细胞和碎片,然后使用FSC高度-宽度散布图进行门控以去除成对物,然后再次使用FSC-Calcein AM散布图进行门控,以去除残留的死细胞。根据rBC2LCN-635和钙黄绿素AM的荧光强度,进一步对门控细胞进行门控,并标记为未分化细胞或分化细胞。将5,000和1,000个随机(无重叠)选择的细胞(具有相同数量的未分化和分化细胞),分别用作训练和测试数据。

[0215] 使用用于鞘液的定制压力泵(IsoFlow,Beckman Coulter)和用于样品流的注射泵(KD Scientific),使细胞流过石英流动池(Hamamatsu)或PDMS微流体装置。石英流动池在测量位置的通道横截面尺寸为250 μ m $\times$ 500 μ m,并且除非另有说明,否则使用时,鞘液的驱动压力约为25kPa。PDMS装置在测量位置的通道横截面尺寸为50 $\times$ 50 μ m,并且除非另有说明,否则使用时,鞘液的驱动压力约为170kPa。除非另有说明,否则样品流以20 μ L/min的流速驱动。

[0216] 在细胞染色前,通过使用细胞计数芯片将细胞数调整为每个测试约 8×10^6 个细胞。染色后,调整细胞浓度,以制备在PBS中约 1×10^6 细胞/mL的细胞悬浮液。当以多种颜色染色MCF-7细胞时(如图3B-图3D所示),首先通过加入PBS中的100 μ L 0.5%BSA,然后加入5 μ L PE-CF594-EpCAM抗体溶液,用PE-CF594-EpCAM(BD,PE-CF594小鼠抗人CD326抗体)标记其膜,然后在室温下温育15分钟。用甲醛固定细胞后,向细胞微丸中加入2mL PBS中的3-60 μ M DAPI储备溶液,用DAPI(Invitrogen,DAPI核酸染色剂)标记细胞核,并在室温下温育15分钟。用PBS严格洗涤细胞后,通过加入PBS中的200 μ L 1%Tween 20,然后向细胞微丸中加入5 μ L LFG荧光活性染料溶液,用FG((Thermo Fisher Scientific,LIVE/DEAD®Fixable

Green Dead Cell Stain Kit,用于488nm波长激发)最终标记细胞质,并在室温下温育一个小时以上。为了细胞成像,将细胞悬浮液夹在一对盖玻片之间,以固定细胞的位置,然后将样品安装到电子载物台(Sigma Koki,Japan)上,以0.2mm/s的恒定速率沿所期望的方向移动细胞。

[0217] 在图4C-图4E所示的无图像GC分析实验中,使用FG将所有MCF-7、MIA PaCa-2细胞和PBMC的细胞质标记为绿色。调整反应时间和染料浓度,以使不同细胞类型的总荧光强度具有可比性。这证实了准确的分类是由于形态信息,而不是由于总强度。使用甲醛固定后,通过向细胞微丸中加入420μL PBS中的0.5%BSA和80μL BV421-EpCAM抗体溶液,使用BV421-EpCAM(BV421共轭小鼠抗人CD326抗体,BD)标记MCF-7细胞膜为蓝色发射,然后在室温下温育2小时。

[0218] 在对MCF-7和MIA PaCa-2细胞进行分类的无图像GC分选实验中(如图5B所示),使用BV421-EpCAM以与上述相同的方式标记MCF-7细胞膜为蓝色发射。在对MIA PaCa-2细胞和PBMC进行分类的实验中(如图5C所示),使用小鼠单克隆抗泛细胞角蛋白AE1/AE3一抗(Abcam)和AF405-共轭驴抗小鼠IgG二抗(Abcam),标记MIA PaCa-2细胞的细胞质为蓝色发射。首先向固定细胞微丸中加入450μLPBS中的0.5%Tween 20和0.5%BSA和50μL一抗溶液进行染色,然后在4℃温育过夜,然后加入490μL PBS中的0.5%Tween20和0.5%BSA和10μL的二抗溶液,然后在室温下温育一个小时。在两个实验中均进行上述免疫染色后,使用FG将MCF-7、MIA PaCa-2细胞和PBMC的细胞质标记为绿色。调整反应时间和染料浓度,以使不同细胞类型的总荧光发射强度具有可比性。在每个染色过程后,严格洗涤细胞。

[0219] 在图4中,为训练模型,使用注射泵(Harvard)和定制的高压泵,通过使每种细胞类型(MCF-7和MIA PaCa-2)分别流过光学结构,收集时域波形的训练数据集。构建能够充分概括以避免过度拟合的模型是对未训练信号进行可靠预测的关键。为此,通过改变内部流体的流速,同时保持外部流体的流速,收集各种时域波形:内部流速在20μL/min和30μL/min的范围内变化,同时外部流速在180kPa的压力下驱动。在测试模型前,制备不同浓度比的MCF-7和MIA PaCa-2细胞的混合溶液。在实验测试模型时,内部流速保持在20μL/min。在SVM模型的训练和测试的整个过程中,细胞流动流的中心线保持在相同位置。最后,将相同条件应用于从复杂PBMC检测癌细胞的演示中。

[0220] 使用PMT检测所有信号,使用ADC板收集和转换所有信号,并且使用Python处理。在准备数据集时,基于所记录的用于训练的整个信号的平均水平,通过阈值化选择性地收集单个流动对象的波形。本研究中使用的径向基函数(RBF)的SVM通过计算以下评分函数f来估计输入时域信号/波形g的标记:

$$[0221] \quad f(g) = b + \sum_{j=1}^N \alpha_j y_j \exp \left[-\gamma \|g - g_j\|^2 \right] \quad (5)$$

[0222] 其中 α_j ($0 \leq \alpha_j \leq C$) 和 y_j 为训练系数和第j个训练时域信号 g_j 的类别标记,b为偏置项, γ 为核缩放参数,N为训练时域信号的数量,并且C为正则化系数。通过网格搜索优化C和 γ 。为了在FPGA中进行高通量处理,根据生物样品和分类目的在离线计算机中调整N和g的长度。

[0223] 为了分类细胞,支持向量机(SVM)技术使用线性或径向基函数核。SVM中的超参数通过网格搜索进行调整。除非另有说明,否则使用每种类别标记的细胞类型的均等混合物

进行训练和验证,并通过10次随机抽样验证准确度、ROC曲线和ROC-AUC,并提供10次试验的平均值和标准差。

[0224] 实施例2:鬼影细胞术灵敏度估计

[0225] 对于整个系统,假设模型荧光团为荧光素分子,PMT可以检测单个光子,荧光团远未达到光饱和以及通过二向色镜和带通滤光片的光损耗可以忽略不计,按照下文可以估计可检测到的荧光团的最小数量。

[0226] 可检测的荧光团分子的最小数量由下式给出:

$$[0227] \quad e \times N_s = e \times N_f \times (r_p \times t) \times q \times (t \times r_t) \approx N_f \times 0.35$$

[0228] 实验装置中光子收集的效率由下式给出:

$$[0229] \quad e = \frac{1}{2} (1 - \cos(\sin^{-1} a))$$

[0230] 数值孔径 $a=0.75$ 。当一组荧光团通过由随机光学图案定义的单位点时,发射的荧光光子的数量由 N_s 给出。荧光团的数量由 N_f 给出。每个分子的光子吸收率由下式给出:

$$[0231] \quad r_p = f \times s$$

[0232] 入射光子通量由下式给出:

$$[0233] \quad f = 43 [\mu W/\mu m^2] = 1.06 \times 10^{14} [\text{在} 488 \text{nm}/\mu m^2 \text{的光子}]$$

[0234] 入射到样品平面中结构化照明亮点的光子通量由 f 给出。吸收截面由下式给出: $s = 1.5 \times 10^{-20} [m^2]$ (35)。量子效率由下式给出: $q=0.95$ (36)。曝光时间由下式给出:

$$[0235] \quad t = \frac{1}{10,000 [\text{细胞}/\text{sec}] \times \text{流动方向的像素数}} = 100 [\mu \text{sec}] / 1,350 [\text{像素}] \\ = 0.0741 [\mu \text{sec}/\text{像素}]$$

[0236] 周转率(1/寿命)由下式得出: $rt=1/4 [1/\text{nsec}]$ (37)。因此,在理想情况下,约需要三个荧光团($N_f \sim 3$)。

[0237] 实施例3:基于运动的压缩荧光成像

[0238] 图2A-图2G示出了基于运动的压缩荧光成像的演示。在图2A和图2B中分别描绘了用于SI和SD模式的光学设置。使用电子平移台使荧光珠的聚集体在玻璃盖玻片上横跨光学结构移动。如图2C所示,在SI模式的情况下,珠子根据运动经过结构化照明,从而导致荧光强度的时域波形的生成。如图2D所示,从该获取的时域信号,计算重构2D荧光图像。如图2E所示,在SD模式的情况下,珠子被均匀的光照射。然后,珠子的共轭荧光图像通过结构化的针孔阵列,从而生成时域波形。如图2F所示,根据该时域信号,计算重构2D荧光图像。图2G示出了使用阵列像素相机获得的相同聚集珠的荧光图像。

[0239] 作为成像模式下GC的实验性概念验证,使用电子平移台对安装在玻璃盖玻片上的荧光珠成像,并使其横跨随机或伪随机图案的光学结构移动。当珠子在平行于 $H(x, y)$ 的行方向的方向上移动时,它们保持聚焦。在样品前后将图案化的光学结构并入光路在数学上是等效的。这意味着基于GC的成像可以通过随机伪随机结构照明(如图2A所示)或随机结构检测(如图2B所示)在实验上实现。这些配置分别对应于计算鬼影成像和单像素压缩成像。可以测量SI模式下等式(1)中的编码算子 $H(x, y)$ 在实验上作为样品平面中的激发强度分布。另一方面,SD模式下的算子 $H(x, y)$ 可以测量为样品平面中激发强度分布与样品与检测

器之间的共轭平面中光掩模的透射率分布的逐点乘积。精确的算子 $H(x, y)$ 可以通过将荧光聚合物薄片放置在样品平面中,并使用空间分辨多像素检测器测量其强度分布来进行实验校准。非相干蓝色发光二极管(LED)被用作激发光源。在物体移动期间,PMT将从物体发出的光子收集为经过时域调制的荧光强度(如分别为SI和SD模式的图2C和图2E所示)。图2D和图2F示出了对于每个波形,多个珠子的计算恢复的荧光图像。为了比较,图2G示出了使用基于阵列检测器的科学互补金属氧化物半导体(CMOS)相机获取的图像。珠子的形态特征清晰,验证了SI和SD模式下的GC成像。

[0240] 实施例4:多色、高通量荧光细胞成像

[0241] 图3A-图3D示出了通过GC进行的多色和高通量荧光细胞成像的演示。图3A示出了基于多色运动的压缩荧光成像(SD模式)的光学设置。该设置利用473nm波长的相干蓝色激光器和375nm波长的非相干UV LED作为通过二向色镜耦合的激发光源(图7)。实验使用培养的MCF-7细胞,其细胞膜、细胞质和细胞核分别用红色、绿色和蓝色荧光染色。当标记的细胞随电子平移台移动时,它们的共轭图像通过光学编码器并生成时域波形。然后使用二向色镜将信号分成(i)红色,(ii)绿色和(iii)蓝色的三色通道,并最终由不同的PMT记录,其代表性迹线如图3B所示。如图3C所示,从每个PMT的时域信号,标记细胞的荧光图像分别以红色(图3C的面板(i))、绿色(图3C的面板(ii))和蓝色(图3C的面板(iii))计算恢复。图3C的面板(iv)示出了从图3的面板(i)、(ii)和(iii)组合的伪彩色多色图像。图3C的面板(iv)示出了使用阵列像素彩色相机获取的多色荧光图像。在图3D中示出了以超过10,000个细胞/s的吞吐速率流动的细胞的多色亚毫秒荧光成像。在实验中,波长为488nm的蓝色激光和波长为405nm的紫色激光穿过衍射光学元件,以产生对细胞流的随机结构照明。图3D的面板(i)和(ii)分别示出了来自细胞质和细胞核的绿色和蓝色荧光信号。从每个PMT的时域信号,标记细胞的荧光图像分别以绿色(图3D的面板(iii))和蓝色(图3D的面板(iv))计算恢复。图3D的面板(v)示出了重构的多色荧光图像。

[0242] GC光学器件的简单设计意味着添加多个光源、介质镜和光学滤波器可以用单个光掩模进行多色荧光成像,如图3A所示。为了验证GC用于细胞成像,将MCF-7细胞(源自乳腺癌的人细胞系)染为3种颜色——膜、细胞核和细胞质分别用红色(EpCAM PE-CF594)、蓝色(DAPI)和绿色(FG:可固定绿色)染料染色。将染色的细胞安装在玻璃盖玻片上。使用相干的蓝色连续波(CW)激光器和非相干的紫外线(UV)LED光源来激发荧光团。使用SD模式,并对每个激发光源的算子 $H(x, y)$ 进行了实验估计。在实验中,移动安装盖玻片的载物台,并使用三个PMT分别测量了每个颜色通道的时域信号。通过计算重建的每种颜色的荧光图像清楚地揭示了细胞膜、细胞质和细胞核的精细特征。为了比较,图3C的面板(iv)示出了重叠的彩色图像,图3C的面板(v)示出了使用常规彩色相机(Wraycam SR 130, WRAYMER Inc., 日本)获得的荧光图像。根据方程式(8)计算的红色、绿色和蓝色通道的峰值信噪比的平均值在GC的重建图像(如图3C的面板(iv)所示)和相机图像(如图3C的面板(v)所示)之间为26.2dB。这些结果证明了多色GC成像在描绘细胞形态特征方面的良好性能。

[0243] GC还可实现流动细胞的快速多色连续荧光成像。可使用用于将流动的荧光细胞流聚焦在三维空间中的流动池组件(Hamamatsu Photonics, 日本),使得细胞聚焦在垂直于与编码器 $H(x, y)$ 的长度方向平行对齐的流动的平面中。使用在流动池内部产生结构化照明的衍射光学元件,垂直于流动方向进行100个像素的连续扩展光学点扫描,这与计算重建中 y

方向上的图像大小相对应。图3D的面板(i)和(ii)示出了来自单个MCF-7细胞的每个颜色通道的时域波形,其细胞质用FG标记,其细胞核用DAPI标记。分别在图3D的面板(iii)和(iv)中对每个波形计算重构荧光图像。图3D的面板(v)示出了具有清晰分辨的细胞形态特征的计算重构的多色荧光图像。这些细胞以高于10,000个细胞/秒的吞吐速率流动,阵列像素相机(诸如电荷耦合器件(CCD)和CMOS)在该速率下生成完全运动模糊图像。对于488nm和405nm的激光器,物镜后结构化照明的总输入激发强度分别为~58mW和~14mW,而分配给各个随机点的平均激发强度分别为<43μW和<10μW。通过设计和采用适当的DOE,可以以最小的损失生成光图案,这表明GC成像具有很高的灵敏度,以可检测的荧光团的最小数量计算(如方法中详述),接近单分子水平。

[0244] 利用物体在光图案 $H(x, y)$ 上的运动进行光学编码和稀疏采样,以高信噪比实现了无模糊、高帧率成像。帧速率 r 和像素扫描速率 p 定义为:

$$[0245] \quad r = v / (\text{宽度}(H(x, y)) + \text{宽度}(I)) \quad (6)$$

$$[0246] \quad p = v / (\text{单个光斑大小,以} H \text{计}) \quad (7)$$

[0247] 其中 I 是最终图像, p 是荧光团通过 $H(x, y)$ 中每个激发点所用时间的倒数。首先,压缩编码减少了采样点的数量,该采样点的数量由 $H(x, y)$ 的长度确定,并且是一帧采集所需的,从而有效降低了实现高帧速率所需的带宽。这种减少非常重要,特别是在使用少量光子的超快速成像中,因为散粒噪声随带宽的增加而增加。此特征使我们能够有效降低荧光信号的激发功率,以克服噪声。其次,在足够的信噪比下,GC可以充分利用单像素检测器的高带宽,因为 $H(x, y)$ 可能在时间上是静态的,这与在物体通过一定像素的激发光之前时域调制激发强度的其他技术不同。因此,除非像素扫描速率至少超过PMT带宽速率的两倍,否则GC会产生无模糊图像。例如,对于具有500nm的光斑大小的 $H(x, y)$ 和100MHz的高带宽的PMT,GC可提供流动速率高达100m/s的无模糊图像。

[0248] 实施例5:荧光标记细胞的机器学习分类

[0249] 图4A-4E示出了借助压缩信号的直接机器学习,通过GC进行的高通量和高准确度无荧光图像的“成像”细胞计数。图4A图示了用于在GC中训练分类器模型的过程。图4A的面板(i)示出了荧光标记不同但形态上相似的细胞类型(MCF-7和MIA PaCa-2细胞)。对于这两种细胞类型,细胞质都被FG染成绿色,而只有MCF-7细胞的膜被BV421-EpCAM染成蓝色。比例尺=20μm。图4A的面板(ii)示出了在>10,000个细胞/秒的吞吐速率下,不同细胞类型分别流经图3D中使用的编码光学结构。图4A的面板(iii)示出了从荧光强度的时域调节信号中共同提取的每种细胞类型的压缩波形。图4A的面板(iv)示出了用每种细胞类型标记的波形文库,该波形文库被用作构建细胞分类器的训练数据集。支持向量机模型用于这项工作。图4B图示了用于测试分类器模型的过程。图4B的面板(i)示出了在分析之前将不同类型的细胞以各种浓度比进行实验混合。图4B的面板(ii)示出了细胞混合物以相同的吞吐速率流过编码器。图4B的面板(iii)示出了将训练模型直接应用于对细胞类型进行分类的波形。如图4C的面板(i)所示,蓝色曲线是通过将经过训练的基于SVM的分类直接应用于FG强度的波形(在图4C的面板(iv)中详细示出)所估计的、与通过测量BV421的总强度(在图4C的面板(ii)中详细示出)获得的那些相比,每个样品中MCF-7细胞的浓度比。红色曲线是通过对总FG强度应用基于SVM的分类的相同程序所估计的MCF-7细胞的浓度比:对总FG强度应用经过训练的基于SVM的分类(图4C的面板(iii)中详细示出),并与BV421的测量总强度进行比较。测量

了70个样品的各种浓度比,每个样品包含700次随机混合细胞测试。无图像的GC结果(在图4C的面板(i)中用蓝色曲线显示)示出了 $y=x$ 的0.046的小均方根误差(RMSE),以及在大约五万个细胞上在接收器工作特性(ROC,如图4D所示)曲线下方的面积(AUC)为0.971,尽管这些细胞的形态看起来类似于人眼。ROC曲线上的每个点都对应一个阈值,该阈值应用于训练的SVM模型的评分,其中直方图中的红色和蓝色根据BV421的强度进行标记。相反,图4C的面板(i)中的红色曲线示出了较差的分类结果,具有0.289的大RMSD和0.596的差的ROC-AUC。如图4E所示,在对外周血单核细胞(PBMC)的复杂混合物分类模型癌(MCF-7)细胞时,超快速无图像GC记录了较高值的AUC $\sim$ 0.998,证实了其在实际应用中的鲁棒性和准确性。

[0250] 除了使用GC作为强大的成像仪之外,与其他成像方法相比,直接分析GC压缩生成的信号能够以显著较低的计算成本实现高通量和准确的细胞形态分类,从而实现超快荧光“成像”——活化细胞分析和分选(FiCS)。这是可实现的,因为GC中的压缩感测显著减小了成像数据的大小,同时保留了用于重建物体图像的足够信息。尽管人类识别无法直接对波形进行分类,但是机器学习方法可以分析波形而无需图像生成。有监督的机器学习直接应用于以 $\sim$ 10,000个细胞/秒的速率分类荧光标记细胞测量的波形,具有超越现有流式细胞仪和人类图像识别的高性能。此外,这种无图像的GC可与微流体分选系统集成,以实现实时FiCS。

[0251] 无图像GC可以包括两个步骤:细胞分类的1)训练和2)测试模型。基于支持向量机(SVM)技术(23),通过计算混合来自不同细胞类型的荧光信号的波形来构建模型。通过分别使每种细胞类型单独通过光学编码器进行实验来收集波形的训练数据。然后通过流动实验混合细胞并分类细胞类型来测试模型。实验之前,先对两种不同类型的细胞进行培养、固定和荧光标记:MCF-7细胞和MIA PaCa-2细胞,如图4A的面板(i)所示。对于两种细胞类型,使用FG将细胞质标记为绿色,以通过无图像GC进行分类,如图4A的面板(i)所示。另一方面,仅在MCF-7细胞中使用BV421-EpCAM将膜标记为蓝色。MIA PaCa-2细胞在蓝色通道中仅具有较低的自发荧光,从而在该通道中提供了易于区分的对比度,如图10A-10C所示)。这用于验证依赖于两种细胞类型相似的细胞质标记的GC分类。紫外光和蓝光CW激光器都用于激发这些荧光团,而数字化仪(M4i.4451, Spectrum, 德国)则记录了由PMT产生的信号。开发了一种微流体系统,以在空间上控制细胞流相对于随机光学结构的位置,该位置对应于重构图像中细胞的位置。使用这种光流体平台,从每种细胞类型的细胞质中收集绿色荧光强度的波形。从该训练数据集中,构建了没有任意特征提取的基于SVM的分类器。为了测试该训练的分类器,引入了一系列包含以不同浓度比混合的不同细胞类型的组合的溶液。然后,每个分类器将约700个混合细胞的波形识别为单个数据集,并估算每种细胞的浓度比。通过将MCF-7和MIA PaCa-2结合使用,可以通过测量MCF-7细胞膜上BV421的总荧光强度对分类结果进行定量评分。

[0252] 使用蓝色荧光强度测得的MCF-7和MIA PaCa-2细胞的浓度比与通过将模型应用于绿色荧光波形测得的浓度比的曲线在对角线上有一条线, $y=x$ 的小均方根误差(RMSE)为0.046。使用BV421的测量结果评估了约49,000个混合细胞的基于GC的分类,得出的接收器工作特性(ROC)曲线(AUC)下方的面积为0.971,这证实了GC进行的细胞分类是准确的。ROC曲线上的每个点对应一个阈值,该阈值应用于从训练的SVM模型获得的评分,其中直方图中的红色和蓝色根据图4D中BV421的强度进行标记。为了确认GC的高性能归因于波形中编码

的空间信息,将基于SVM的相同的程序应用于通过整合每个GC波形随时间获得的总绿色荧光强度。在图4C中以红色曲线示出的结果的ROC-AUC较差,为0.596, $y=x$ 时的RMSE值较大,为0.289,因此表明总荧光强度对GC的高性能贡献很小。此外,通过计算简单的线性拟合(如图11所示),可以确认基于SVM的分类在宽范围的浓度比范围内始终保持其准确度。因此,即使目标细胞的大小、总荧光强度和明显的形态特征相似,并且以不同浓度存在于混合物中,无图像的GC仍是准确的细胞分类器。实际上,在缺乏分子特异性标记的情况下,对此类相似的细胞类型进行分类对于先前的细胞计数仪甚至人类识别一直是一个重大挑战。

[0253] 除了对形态相似的两种细胞进行分类外,GC还能够以高通量从复杂的细胞混合物中准确分类出特定的细胞类型。例如,这种技术在检测患者外周血中的稀有循环肿瘤细胞(CTC)方面很重要(24-27)。应用无图像GC的工作流程对来自外周血单核细胞(来自Astarte Biologics, Inc的PBMC),包括淋巴细胞和单核细胞的血细胞异质群体的模型癌细胞(MCF-7)进行分类。同样,使用FG将所有细胞的细胞质标记为绿色,以通过无图像GC进行分类,而使用BV421-EpCAM仅将MCF-7细胞的膜标记为蓝色以验证GC的分类结果。首先通过实验收集标记的MCF-7和PBMC细胞的绿色荧光波形并计算混合它们来训练分类器SVM模型。然后通过流动实验混合细胞并逐一分类其细胞类型来测试该模型。以大于10,000个细胞/秒的吞吐量测量所有信号。为了训练模型,使用了1,000个MCF-7细胞和1,000个PBMC。为了测试模型,使用了来自MCF-7细胞和PBMC的随机混合物的1,000个细胞。在执行十次交叉验证后,对于GC波形的基于SVM的分类器,AUC记录为0.998。图4E示出了一条ROC曲线,证明了从复杂细胞混合物中超快速而准确地检测特定细胞类型的能力。

[0254] 实施例6:超快速准确的细胞分选

[0255] 图5A-5C示出了基于机器学习的荧光“成像”激活细胞分选仪(FiCS)的演示。如图5A的左面板所示,微流体装置可以包括三个功能位点。细胞的流动流首先通过3D流体动力流聚焦来聚焦,然后经历随机结构化的照明,最后到达分选区域。在分选进行时,由输入电压驱动锆钛酸铅(PZT)致动器,并弯曲以将流体横向转移至接合部,以将目标细胞分选到收集出口。如图5A的右面板所示,为了实时分类和选择性分离细胞,将在PMT处测得的模拟信号数字化,然后在FPGA中进行分析,在FPGA中实现了训练的基于SVM的分类器。当分类结果为阳性时,FPGA发出延时脉冲,从而启动PZT器件。以每秒约3,000个细胞的吞吐速率进行实验。使用FG将所有MIA PaCa-2、MCF-7和PBMC细胞的细胞质标记为绿色。分别使用BV421-缀合的EpCAM抗体和抗泛细胞角蛋白一抗/AF405-缀合的二抗,将其中的MCF-7细胞的膜(如图5B所示)和其中的MIA PaCa-2细胞的细胞质(如图5C所示)标记为蓝色。

[0256] 图5B示出了针对形态相似的MCF-7细胞的MIA PaCa-2细胞的精确分离。GC直接对绿色荧光波形进行分类,而无需重构图像。图5B的面板(i)示出了针对细胞混合物测得的最大蓝色荧光强度的直方图,示出了MIA PaCa-2的纯度为0.626,而图5B的面板(ii)示出了应用FiCS后相同混合物的最大蓝色荧光强度直方图,显示MIA PaCa-2的纯度为0.951。对应于阈值0.05的虚线用于区分两种细胞类型的群体。

[0257] 图5C示出了针对PBMC的复杂混合物的模型癌症(MIA PaCa-2)细胞的精确分离。图5C的面板(i)示出了针对细胞混合物测得的最大蓝色荧光强度的直方图,示出了MIA PaCa-2的纯度为0.117,而图5C的面板(ii)示出了应用FiCS后相同混合物的最大蓝色荧光强度直方图,显示MIA PaCa-2的纯度为0.951。虚线对应于阈值40,该阈值用于区分两种细胞类型

的群体。

[0258] 通过压缩感测减小数据大小并避免在GC中进行图像重构,可缩短对单个波形进行分类所需的计算时间。通过将这种有效的信号处理与微流体系统相结合,实现了基于实时分析“成像”数据的超快速和准确的细胞分选。证明了以高通量和高准确度从另一个形态相似细胞群体和复杂细胞混合物中分离特定细胞群体的能力。图5A的左面板示出了由聚二甲基硅氧烷制成的微流体装置。如图12A所示,设计了三个功能位点。首先,如图12B所示,通过3D流体动力流聚焦(28、29)结构将细胞流体流聚焦成致密流。然后,细胞经历了GC的随机结构光照射,并最终到达分选接合部。如图12C所示,锆钛酸铅(PZT)致动器通过在垂直于主流方向上定向的通道连接到该接合部。对于分选动作,由输入电压驱动致动器,以弯曲并向接合部横向转移流体,以将目标细胞分选到收集出口。如图5A和图12D所示,为了实时分类和选择性分离细胞,它们的荧光信号由PMT记录为模拟电压,并由模数转换器数字化,然后由现场可编程门阵列(FPGA, Stratix IV, Altera)分析。预先实现了基于SVM的分类器。当FPGA将目标细胞归类为阳性时,它发出一个延时脉冲,从而驱动了芯片中的PZT致动器。FPGA中用于对每个压缩波形进行分类的计算时间足够短($<10\mu\text{sec}$),从而可以实现可重现的分选。通过实验,GC波形的长度保持在大约 $300\mu\text{sec}$,相当于每秒大约3,000个细胞的吞吐量。当通过最大的蓝色荧光强度测量标记的阳性和阴性细胞的绿色荧光波形后,离线建立分类器模型并在FPGA中实现。在实验中,使用FG将所有MIA PaCa-2、MCF-7和PBMC细胞的细胞质标记为绿色,此外,分别使用BV421-缀合的EpCAM抗体和抗泛细胞角蛋白一抗/AF405-缀合的二抗,将其中的MCF-7细胞的膜(如图5B所示)和其中的MIA PaCa-2细胞的细胞质(如图5C所示)标记为蓝色。

[0259] 集成的FiCS能够从MCF-7细胞中准确分离MIA PaCa-2细胞,它们的大小、总荧光强度和表观形态相似。使用200个MIA PaCa-2细胞波形和200个MCF-7细胞波形来训练SVM模型。混合两种细胞类型,并使用自制的流式细胞仪(分析仪)测量其最大蓝色荧光强度,产生对应于直方图中出现的两种细胞类型的两个不同的峰(如图5B中的面板(i)所示)。通过分类绿色荧光波形将机器学习驱动的FiCS应用于相同的细胞混合物后,以相同的方式测量分选后的混合物的最大蓝色荧光强度。结果,对应于MCF-7细胞的强度更高的峰消失了,MIA PaCa-2细胞的纯度从0.625(如图5B的面板(i)所示)增加到了0.951(如图5B的面板(ii)所示)。这证实了,仅通过单独使用不特异地标记目标分子的细胞质染色(FG),FiCS可基于它们的形态以高准确度和高通量识别并物理分离表面上相似的细胞类型。

[0260] FiCS还能够针对PBMC的复杂混合物准确富集MIA PaCa-2细胞。使用200个MIA PaCa-2细胞波形和200个PBMC细胞波形来训练SVM模型。将两种细胞混合,并使用自制的流式细胞仪(分析仪)测量其最大蓝色荧光强度。对应于MIA PaCa-2细胞群体的强度较高的峰相对较小(如图5C的面板(i)所示)。通过对绿色荧光波形进行分类将FiCS应用于相同的细胞混合物后,以相同的方式测量分选后的混合物的最大蓝色荧光强度。结果,MIA PaCa-2细胞的纯度从0.117(如图5C的面板(i)所示)增加到了0.951(如图5C的面板(ii)所示)。这证实了FiCS能够在复杂细胞混合物的背景下以高准确度和高通量显著富集模型癌细胞而无需任何特异性生物标记物。

[0261] 最近的研究已广泛使用成像流分析仪来检测和/或表征包括肿瘤学、免疫学和药物筛选的各个领域的关键细胞(30、31)。GC能够显著提高分析通量并根据高内涵信息实时

选择性分离细胞群体的能力,可能导致整合基于形态学的分析与单个细胞水平的综合下游组学分析。除了依赖于人类有限的知识和能力的常规图像生成和处理之外,直接应用于压缩模态的机器学习方法可能对于实时应用高数量和高维数据也具有广泛的适用性。

[0262] 实施例7:获取光学编码器图案

[0263] 图6示出了在SI模式和SD模式下在珠子的荧光成像中使用的光学编码器图案 $H(x, y)$ 的获取。图6的左下部分示出了用于估计编码器 $H(x, y)$ 精确强度分布的光学设置(如图6的右上部分所示)。将具有相同伪随机孔阵列的铬层制成的光掩模分别放置在用于SI和SD模式的样品之前(图6中所示的平面1)和之后(图6中所示的平面2)的共轭图像平面中。制成的孔是边长为 $8\mu\text{m}$ 的正方形,随机分布在 $800 \times 9,600\mu\text{m}^2$ 的矩形区域中,填充率为 $\sim 1\%$ 。光学结构的稀疏性(填充率)旨在使GC的测量过程对实验噪声具有鲁棒性(38、39)。这些 $8\mu\text{m}$ 的孔对应于衍射和几何收缩后样品平面中的约 $1\mu\text{m}$ 斑点,并定义了基于GC的成像的空间分辨率。为了最小化归因于每个光学组件的色差所引起的误差,将荧光聚合物薄膜放置在样品平面中并记录其图案化发射。

[0264] 在SI模式下,聚合物膜被穿过光掩模的光激发。膜的荧光图像转移到平面2上,并通过4f显微镜系统进一步转移到图像传感器上,该显微镜系统包括两个消色差透镜,每个消色差透镜的焦距为200mm。在SD模式下,聚合物膜被均匀散布的光激发。膜的荧光图像被转移到平面2上,在该平面上放置了光掩模。穿过伪随机图案孔的光子通过4f显微镜系统成像,该系统包括两个消色差透镜,每个消色差透镜的焦距为200mm。比例尺为 $50\mu\text{m}$ 。在实验中,蓝色LED(UHP-T-LED-460UV LED,Prizmatix,Israel)用作激发光源,科学的CMOS相机(Flash 4.0 V2,Hamamatsu Photonics)用于获取图像。物镜为20倍,获自Olympus(UPlanSApo)。成像的珠子购自Spherotech Inc.(FP-10052-2荧光黄色粒子,直径: $10.0\text{--}14.0\mu\text{m}$)。穿过474/27nm带通滤光器(Semrock)的蓝色LED发出的激发光被二向色镜(ZT488rdc,Chroma)反射,并照亮了样品。发出的光穿过镜并穿过525/50nm带通滤光器(Semrock)被收集。

[0265] 图7示出了编码器 $H(x, y)$ 的光学设置和测得的强度分布,它们用于荧光标记细胞的三色成像。将具有伪随机孔阵列的铬层的光掩模放置在SD模式的样品之后的缀合像平面中。所制造的孔是边长为 $8\mu\text{m}$ 的正方形,并在 $800 \times 10,800\mu\text{m}^2$ 的矩形区域上以 $\sim 1\%$ 的填充率随机分布。

[0266] 蓝色激光器(GEM473-500,激光量子)发出的光通过清除滤波器(Ex.1,Semrock),UV LED(UHP-T-LED-385UV LED,Prizmatix)发出的光通过377/50nm带通滤光器(Ex.2,Semrock)。这些激发光源与420长通二向色镜(DM1,Chroma)结合,被三边二向色镜(DM2,Di01-R405/488/594,Semrock)反射,并且通过20倍物镜均匀地照射样品。样品的发射通过DM2、三带通发射滤波器(Em.1,FF01-432/523/702,Semrock)和光掩模进行光学编码。在基于GC的成像中,通过组合使用二向色镜(DM3是Semrock的FF-573-Di01,而DM4是Chroma的ZT488rdc),将光掩模之后的发射光分为三个颜色通道,并使用三个通过每个带通滤波器(Em.2、Em.3和Em.4是Semrock的593长通滤波器、535/50nm带通滤波器和435/40nm带通滤波器)的PMT记录。在 $H(x, y)$ 的校准中,将荧光聚合物薄膜放在样品平面中,并分别使用536/40nm带通滤光器(Em.5,Chroma)和sCMOS相机,记录在不同激发条件下照射的图案化发射。比例尺为 $50\mu\text{m}$ 。

[0267] 图8示出了用于通过GC进行超快速多色荧光成像和无图像成像细胞计数的光学编码器的光学设置和校准的强度分布。图8的左下部分示出了用于无图像GC的光学装置,其中使用衍射光学元件(DOE)的结构化照明为样品之前的共轭图像平面中的每个波长激光器进行照明。结构化照明设计为具有100x1350像素的图案,具有~1%亮点的伪随机图案,其中使用405nm(DOE-1)的焦距为150mm的透镜和488nm(DOE-2)的焦距为~12 μ m的透镜,每个正方形像素的边长为~10.5 μ m。在样品之前的共轭图像平面上,放置了一个空间过滤器以阻挡零级和多级衍射图。

[0268] 来自488nm蓝色激光器(Cobolt 06-MLD 488nm,Cobolt)的光和来自405nm紫色激光器(Stradus 405-250,Vortran)的光与长通二向色镜(DM1,来自Chroma的ZT405rdc-UF1)结合,被四波段二向色镜(DM2,Di03-R405/488/561/635-t3,Semrock)反射,并通过20倍物镜均匀照射样品。样品的发射穿过DM2,并通过二向色镜(DM3,来自Semrock的FF506-Di03)分成两个颜色通道,并使用两个通过每个带通滤波器(Em.1和Em.2为535/50nm带通滤波器、来自Semrock的440/40nm带通滤波器)的PMT进行记录。如本文参照图7所述,使用Em.5和sCMOS以相同的方式执行校准。当执行无图像成像细胞计数法时(图4),将DOE-1替换为圆柱透镜。比例尺为50 μ m。

[0269] 实施例8:流体动力流聚焦

[0270] 图9A-9F示出了控制流体动力聚焦强度对通过无图像GC进行分类的性能的影响。图9A中描绘的流动池(Hamamatsu Photonics K.K.,日本)的几何形状通过外部流体产生内部流体的流体动力学三维(3D)流动聚焦,允许流动细胞保持聚焦并允许控制它们在图像中的位置,如图所示。而且,该装置允许通过改变内部和外部流体之间的流速比来控制聚焦强度,如图9B所示。换句话说,与强聚焦条件相比,在一种松散聚焦条件下流动一种类型的细胞会产生更多种、概括化的时域波形。在对聚焦强度的各种组合进行如下综合研究后,使用了允许构建高度概括、鲁棒和敏感的分类器模型的流体条件组合:将松散和紧密聚焦条件组合用于训练模型,并将紧密聚焦条件用于测试模型。

[0271] 为了确定流动聚焦对使用基于SVM的无图像GC进行的细胞分类的影响,如图9C-9F所示,在训练和测试模型时全面测试了聚焦强度的各种组合。为了评估GC的分类结果,从每种类型(MCF-7或MIA PaCa-2细胞)标记的一组波形中随机选择波形以训练模型。如图9C-9F所示,该模型通过增加用于训练分类器的波形数来改进。从其他波形中为每种细胞类型选择1,000个波形以测试模型,其中通过重复10次获得误差线。在此,紧密聚焦的流表示其中内部体积流速和外部流动速率流速分别为20 μ L/min和>10m/sec的情况。松散聚焦的流表示内部速率为30 μ L/min的情况。

[0272] 图9C中的曲线表明,当在高度受控的实验条件下(最小的实验误差)将紧密聚焦流用于训练和测试时,准确度快速达到具有少量训练点的高水平。图9D中的曲线表明,当将松散聚焦的流同时用于训练和测试时,准确度缓慢增加并且需要大量的训练点。这些结果表明,紧密聚焦的条件有助于提高分类器的灵敏度。然而,在严格条件下训练的模型可能过拟合,并且在测试条件与训练条件不完全相同的情况下可能会失去准确性,而实际情况经常是这样。实际上,图9E中的曲线表明,当使用紧密聚焦的流进行训练而使用宽松聚焦的流进行测试时,准确度的提高要慢得多,并达到较低的平稳期。

[0273] 为了在细胞分类上同时追求高灵敏度和鲁棒性,准备包括从使用紧密聚焦流和松

散聚焦流收集的数据集中随机选择的波形的训练数据集。当该训练模型用于测试通过使用紧密聚焦的流测量的数据集时,准确度迅速提高并最终达到很高的平稳期,如图9F所示。因此,该模型是概括性的并且表现良好。这些结果表明,尽管使用松散聚焦流训练模型会降低灵敏度,但模型相对于样品的鲁棒性会增加,这等同于机器学习模型的概括泛化能力。为了实现灵敏且鲁棒的细胞计数,将松散和紧密的聚焦条件组合来训练模型,并使用紧密聚焦条件来测试模型。

[0274] 实施例9:验证通过无图像鬼影细胞术进行的分类

[0275] 图10A-10D示出了基于BV421-EpCAM的无图像GC的分类和无图像GC的工作流程的验证。为了评估无图像GC在对时域调制的绿色荧光强度进行分类中的性能,对相同细胞的总蓝色荧光(BV421-EpCAM)强度进行了定量。图10A仅示出MCF-7细胞的总蓝色荧光强度的直方图,图10B仅示出MIA PaCa-2细胞的总蓝色荧光强度的直方图。图10C示出了细胞混合物的示例数据集的强度直方图,其对应于图4D中的单个点。在图4A-4E的整个实验中,使用BV421-EpCAM的总荧光强度,将2,500用作区分MIA PaCa-2细胞的上限阈值,将4,000用作区分MCF7细胞的下限阈值。通过该门控排除的细胞仅占总群体的0.7%,可忽略不计。与BV421总强度的明显分布相反,相同样品细胞的FG总荧光强度的直方图显示出难以区分的分布,如图10D所示。

[0276] 图10D示出了FG的总荧光强度的直方图,其中没有明显可区分的峰。相反,图4D示出了使用等式(9)计算的评分的直方图,其具有可区分的两个峰。图4D中的ROC曲线上的每个点对应于阈值,该阈值应用于从该训练的SVM模型获得的评分。通过0.971的ROC曲线(AUC)下方的面积测得的基于SVM的细胞分类方法显示出高性能。表1总结了图4和图11中的演示所采用的样品和流体条件。

[0277] 表1:样品和流体条件

[0278]	训练数据集		测试数据集	
	流体条件	波形总数	流体条件	波形总数
	紧密	2,400	紧密	700 种波形
	松散	1,200		x 样品

[0279] 实施例10:确认基于SVM的分类的一致准确度

[0280] 图11示出了在宽范围的浓度比上基于SVM的分类的一致准确度的确认。

[0281] 计算了简单的线性拟合以证明该模型在宽的浓度比范围内始终保持其准确度。在图11中,将GC区分MCF-7的真阳性率和假阳性率分别表示为 α 和 β ,GC对BV421强度测量的结果可估计为:

$$[0282] \quad n = \alpha m + \beta (1 - m)$$

[0283] 其中 m 是通过BV421的测量结果估计的MCF-7的浓度比, n 是通过GC分类获得的浓度比。通过将MCF-7和MIA PaCa-2的纯溶液的GC分类结果与DAPI测量结果进行比较,计算出 α 和 β 的数量。对于图4D所示的拟合,计算出的 α 和 β 为0.949和0.068。这表明对于不同的浓度比,曲线和拟合之间始终具有良好的匹配性。用肉眼很难发现MIA PaCa-2和MCF-7细胞的绿

色荧光细胞质图像之间明显不同的形态特征,诸如大小和圆形度,如图4A的面板(i)所示。

[0284] 实施例11:基于机器学习的荧光“成像”激活的芯片上细胞分选

[0285] 图12A-图12D示出了基于机器学习的荧光“成像”激活的芯片上细胞分选系统(FiCS)。图12A-12C示出了使FiCS与GC系统结合的功能性微流体装置。使用标准软光刻技术制造图12A中描绘的细胞分选芯片。通过SU-8光刻胶模具对通道特征进行光刻图案化,并转移到聚二甲基硅氧烷(PDMS)中。PDMS通道通过氧等离子体激活键合固定在玻璃基板上。样品注射和鞘液注射均由注射泵(Harvard Apparatus Pump 11 Elite Syringe Pump)分别以约10 μ L/min和400 μ L/min的恒定流速驱动。图12B中显示为显微镜图像的芯片设计(28)使样品流能够在光学测量部位之前通过3D流体动力流聚焦而聚焦成狭窄的细胞流。图12C中显示为显微镜图像的芯片设计(29)使得能够基于分类进行选择性的细胞分选。在该分选点,压电PZT致动器通过垂直于主流的通道连接到接合部。进入分选位点的目标细胞通过由PZT致动器的弯曲作用驱动的置换液偏转到收集出口。压电致动器的直径为20mm,固有共振频率约为6.5kHz。在图12B和12C中,比例尺为50 μ m。

[0286] 图12D示出了在这项工作中使用的实时分类和电控制系统的过程流程。首先通过模数转换器(ADC,Texas Instrument的部分改良的AD11445EVM)将由PMT检测为模拟电压的GC波形数字化,采样率为20MHz,分辨率为14位。在FPGA开发板(Terasic TR4)上的现场可编程门阵列(FPGA,Stratix IV,Altera)基于SVM的分类中,每个波形被抽取为1,000个数据点。当FPGA根据分类确定目标细胞的存在时,它会自动输出延时信号来驱动函数发生器(Tektronix AGF1022)。立即从函数发生器发出的矩形脉冲通过高压放大器(Trek 2210型)进行放大,然后传递到PZT致动器的电极,以引起分选动作。FPGA还连接到计算机,用于收集训练数据、上传SVM参数、设置触发条件和存储测试数据。

[0287] 为了评估细胞分选系统的性能,在分选之前和之后,使用自制的分析仪对样品进行分析,该分析仪包括带有流动池(Hamamatsu Photonics)的光学装置(如图8所示),其中来自样品的最大的蓝色(作为标记)和绿色荧光强度只需通过将触发条件应用于绿色荧光信号即可检测到。

[0288] 在示例性流体动力流聚焦装置中,通过改变内部流与外部流之间的速率比来控制细胞流在三维空间中的位置。

[0289] 实施例12:基于部分透射散斑图案的无标记分选

[0290] 本文所述的系统和方法可用于执行无标记分选。可以通过通过压缩感测获得微流体通道中快速流动的细胞的相位信息来实现这种无标记分选。当细胞通过本文所述的结构化照明时,这可以通过用检测器(诸如本文所述的单个像素PMT或任何其他检测器)测量透射斑纹图案的调制波形来完成。与相位检索成像技术相比,此方法只能获得再生图像所需的整个散斑图案的一部分。尽管如此,足以以高准确度对细胞进行分类,并且在获取之前降低光学尺寸可以实现快速、实时的分类和分选。

[0291] 图14示出了利用GC的无标记细胞分选仪。现场可编程门阵列(FPGA)可以直接从光电探测器(PD)获得的波形中实现机器学习分类器,该分类器对通过PD的每个细胞进行分类。然后,FPGA可以将脉冲发送到PZT,以将被标识为目标细胞的细胞推到相邻通道。

[0292] 图15示出了用于无标记细胞分选仪的运动驱动的压缩鬼影细胞术。当细胞通过结构化照明时,可以通过结构化照明来调制透射斑点图案。通过由光电检测器(PD)获得该斑

点图案的一部分,可以获得调制波形。

[0293] 使用本公开内容的系统和方法,对具有相似大小和明显形态的两种细胞系MIA PaCa-2细胞和Jurkat细胞进行分类和分选。细胞以3m/s的速度流动,在110微秒(μ s)内获得每个细胞的波形,对应于超过9,000个细胞/秒的吞吐量。为了训练和验证机器分类器,用绿色荧光染色MIA PaCa-2细胞。通过用每种细胞类型的150个细胞训练机器分类器,能够以93%的准确度对混合物中的两种细胞进行分类。实际分选的细胞通过荧光分析,纯度为89%。常规的前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)图显示,很难根据大小对两个细胞进行完全分类。

[0294] 图16A示出了使用无标记细胞分选仪对Jurkat和MIA PaCa-2细胞的分选。图16A的左上部分示出了Jurkat细胞的相位对比图像。图16A的右上部分示出了MIA PaCa-2细胞的相位对比图像。图16A的左下部分示出了Jurkat细胞的FSC和SSC图。图16A的右下部分示出了MIA PaCa-2细胞的FSC和SSC图。如图16A中所示,Jurkat细胞和MIA PaCa-2细胞的FSC和SSC图重叠,使得仅通过FSC和SSC图的大小确定很难区分两种类型的细胞。

[0295] 图16B示出了细胞分选之前和之后的Jurkat和MIA PaCa-2细胞群体的直方图。仅MIA PaCa-2细胞被染色为绿色。图16B的顶部示出了分选之前的样品。图16B的底部示出了分选之后的样品。分选后,MIA与PaCa-2的比例从51%增加到89%。

[0296] 实施例13:死亡和早期凋亡诱导多能干细胞(iPSC)的分类

[0297] 图17A示出了碘化丙锭(PI)和膜联蛋白V的荧光强度的散布图的示例,用于将诱导的多能干细胞(iPSC)分类为活的、早期凋亡的或死亡的。如图17A所示,在蓝色、红色和绿色区域内的群体分别被标记为活细胞、死细胞和早期凋亡的细胞。

[0298] 图17B示出了IPSC的前向散射(FSC)和侧向散射(SSC)的散布图的示例。蓝色、红色和绿色的点分别对应于活细胞、死细胞和早期凋亡细胞。使用常规方法诸如FSC和SSC,活细胞大多可与死细胞/凋亡细胞区分开来,但死细胞和凋亡细胞很难相互区分开。

[0299] 图17C示出了使用本公开内容的系统和方法对活细胞和死细胞进行分类的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。虚线是仅使用常规FSC和SSC进行分类的ROC曲线,以供参考。如图17C中所示,常规的FSC和SSC允许在0.876的AUC下区分活细胞和死细胞,而使用本公开内容的系统和方法的分类实现了AUC变为0.995,示出了非常优越的性能。

[0300] 图17D示出了使用本公开内容的系统和方法对活细胞和早期凋亡细胞进行分类的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。虚线是仅使用常规FSC和SSC进行分类的ROC曲线,以供参考。类似于图C中所示的情况,与使用常规FSC和SSC获得的性能(AUC=0.875)相比,利用本公开内容的系统和方法进行的分类显示出优异的性能(AUC=0.947)。

[0301] 图17E示出了使用本公开内容的系统和方法对死细胞和早期凋亡细胞进行分类的ROC曲线和SVM得分直方图的示例。虚线是仅使用常规FSC和SSC进行分类的ROC曲线,以供参考。仅使用常规的FSC和SSC,很难区分两个群体(AUC=0.657),但是利用本公开内容的系统和方法,可在AUC为0.931下区分它们。

[0302] 本文所述的系统和方法可展现显著适用于细胞制造过程,以用于诸如再生医学和细胞疗法的方法中。在这样的方法中,应当根据各种要求来监视和控制细胞的质量。将本文所述的系统和方法应用于使用诱导的多能干细胞(iPSC)的传递途径。可通过解冻冷冻保存的iPSC来启动传递途径,然后将其通过多个分化步骤,从而产生最终的细胞产物。在整个传

递途径中,可能需要监控细胞群体的活力、表达状态和纯度,有时可能需要对细胞进行分选。先前对iPSC的检查需要进行分子染色,这种染色通常对细胞有毒或对细胞有不利影响(例如,由于免疫反应)。此外,当细胞产物的化学污染物被诱导到人体中时,它们可能会对患者产生潜在的副作用。相反,本文所述的系统和方法可以基于细胞的活力、表达状态和纯度对细胞进行高速评估,而无需对实际的产物系细胞进行染色,从而解决了可能由分子染色引起的问题。

[0303] 本文描述的系统和方法不仅可以高准确度从活细胞中区分死细胞,还可以从活细胞中区分处于早期凋亡状态的细胞。这对于监视细胞群体以进行质量控制可能是必不可少的,因为死细胞的残留可能会潜在地给周围细胞造成压力并改变iPSC或其他干细胞的分化。此外,死细胞和早期凋亡细胞的污染可能导致移植中功能细胞数量的估计不准确。对从培养瓶分离的培养的iPSC进行活力和凋亡分析。如图17A所示,使用碘化丙啶(PI)和膜联蛋白V(分别为死细胞和早期凋亡细胞的指标)的荧光强度创建了训练标记。如图17B所示,可以从常规FSC和SSC图中以一定的准确度将死细胞和早期凋亡细胞与活细胞区别开来。然而,这样的分类可能不是完全准确的,并且常规方法可能需要另外的死细胞排除染色以排除死细胞。

[0304] 使用本公开内容的系统和方法,制备了具有门控并标记为活细胞、死细胞和早期凋亡细胞的细胞群体的波形训练数据集。如图17B所示,以 0.996 ± 0.001 的高ROC-AUC(如图17C中的实线所示)将死细胞与活细胞区分开,并且以 0.947 ± 0.005 的ROC-AUC(如图17D中的实线所示)将早期凋亡细胞与活细胞区分开。相反,仅使用带有相同标记的常规FSC和SSC数据,常规流式细胞仪分别以 0.890 ± 0.009 (如图17C中的虚线所示)和 0.875 ± 0.013 (如图17D中的虚线所示)的ROC-AUC对于死亡-活和凋亡-活的区分,性能有限。另外,本公开内容的系统和方法能够以 0.931 ± 0.006 的ROC-AUC(如图17E中的实线所示)从死细胞中区分早期凋亡细胞,这对于仅用常规的FSC和SSC而言达到 0.657 ± 0.012 的ROC-AUC(如图17E中的虚线所示)是困难的。

[0305] 实施例14:分化和未分化iPSC的分类

[0306] 图18A示出了用于训练机器学习分类器的神经祖细胞(NPC)和iPSC的混合物的钙黄绿素AM和rBC2LCN-635强度的散布图的示例。蓝色和红色区域内的群体分别标记为NPC和iPSC。

[0307] 图18B示出了使用本公开内容的系统和方法对NPC和iPSC进行分类的ROC曲线(图18B的外面板)和SVM得分直方图(图18B的内面板)的示例。ROC曲线的AUC为0.933。蓝色和红色的SVM得分直方图分别对应于来自图18A的标记为NPC和iPSC的细胞。

[0308] 图18C示出了用于训练机器学习分类器的肝母细胞和iPSC的混合物的钙黄绿素AM和rBC2LCN-635强度的散布图的示例。蓝色和红色区域内的群体分别标记为肝母细胞和iPSC。

[0309] 图18D示出了使用本公开内容的系统和方法对肝母细胞和iPSC进行分类的ROC曲线(图18D的外面板)和SVM得分直方图(图18D的内面板)的示例。ROC曲线的AUC为0.947。蓝色和红色的SVM得分直方图分别对应于来自图18C的标记为肝母细胞和iPSC的细胞。

[0310] 本公开内容的系统和方法可以将未分化的细胞与分化的细胞进行分类,这可以代表细胞制造传递途径中最重要的方法之一。这样的分类可能很关键,因为剩余的未分化细

胞可能仍具有增殖能力,这最终可能导致细胞成为癌细胞。将未分化的iPSC与神经祖细胞(NPC)和肝母细胞形式的分化细胞进行比较,两者均源自相同iPSC。在训练过程中,用未分化标记物标记细胞,该标记物仅染色未分化的iPSC。还实现了无标记细胞计数方法。通过用指示未分化细胞的标志物rBCLCN-635(Wako)染色细胞并测量rBCLCN-635强度来生成训练标记(如图18A和图18C所示)。使用未分化标志物标记的每种细胞类型的波形作为训练数据集,分类器以 0.933 ± 0.008 的ROC-AUC(如图18B所示)区分出iPSC和NPC,并以 0.944 ± 0.004 的ROC-AUC(如图18D所示)区分出iPSC和肝母细胞,显示其高分类能力。相反,仅使用常规FSC和SSC信息,用于分类每对细胞的ROC-AUC分别限制为 0.862 ± 0.013 和 0.697 ± 0.020 。

[0311] 实施例15:基于功能的细胞分类

[0312] 图19A示出了T细胞的fab FITC强度的直方图的示例。红色阈值线右侧的细胞标记为CAR T细胞。该阈值由阴性对照样品决定。

[0313] 图19B示出了ROC曲线和SVM得分直方图的示例,其利用来自图19A的标记对细胞周期中的不同状态进行分类。

[0314] 图19C示出了raji细胞的2-(N-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基)氨基)-2-脱氧葡萄糖(2-NBDG)强度的直方图的示例。绿色阈值线左侧的细胞标记为低葡萄糖细胞,红色阈值线右侧的细胞标记为高葡萄糖细胞。

[0315] 图19D示出了ROC曲线和SVM得分直方图的示例,其利用来自图19C的标记对具有高水平和低水平的葡萄糖的细胞进行分类。

[0316] 本文所述的系统和方法可用于通过基于细胞的功能选择细胞来改善细胞群体的质量。这在例如癌症疗法中可能很重要,在该疗法中,免疫细胞可能会被修饰以攻击癌细胞。

[0317] 使用本公开内容的系统和方法,从非转导的T细胞和CAR T细胞的混合物中进行嵌合抗原受体(CAR)T细胞的分类,并在仅在CAR T细胞上表达的fab标记物上训练机器学习,如图19A所示。ROC-AUC为 0.887 ± 0.007 (如图19B所示),表明本公开内容的系统和方法可用于以无标记方式高准确度纯化CAR T细胞,从而使这些细胞可以直接用于治疗患者。

[0318] 还进行了基于糖酵解水平的细胞分类。糖酵解水平的差异导致不同的细胞代谢,并导致不同的细胞活性。例如,据报道在CAR T细胞中,低葡萄糖水平的细胞对癌症具有更高的功效。为了监测糖酵解水平,通常使用2-(N-(7-硝基苯并-2-氧杂-1,3-二唑-4-基)氨基)-2-脱氧葡萄糖(2-NBDG),一种荧光葡萄糖类似物,但其对细胞有剧毒。因此,以前根据其糖酵解水平分选活细胞的方法是困难的。Raji细胞用2-NBDG处理。离线提取整个群体中高水平和低水平的2-NBDG的细胞(如图19C所示)。使用高和低2-NBDG水平的这些细胞,对分类器进行训练,然后进行验证。结果,分类器能够以0.88的准确度对两个群体进行分类(如图19D所示),表明本公开内容的系统和方法可基于细胞的糖酵解水平对其进行分类。

[0319] 实施例16:混合流体中特定细胞类型的检测

[0320] 本公开内容的系统和方法可以用于检测或分选混合流体(诸如血液、尿液、泪液、唾液、胸腔积液、脑脊髓液或本文所述的任何其他流体)中的特定细胞类型(诸如疾病细胞)。所述系统和方法可以允许检测或分选这种特定的细胞类型,而不需要如各种常规实验室测试中所要求的那样用荧光团标记或通过抗体进行免疫染色。

[0321] 图20A-I示出了在混合流体中各种类型的白血细胞的无标记检测。

[0322] 图20A示出了包括嗜中性粒细胞群体的训练数据集。嗜中性粒细胞的特征在于相对较高水平的CD66标志物表达和相对较低水平的CD193标志物表达。使嗜中性粒细胞流过本文所述的图案化的光学结构,并记录对应于嗜中性粒细胞的光信号。

[0323] 图20B示出了对应于嗜中性粒细胞和非嗜中性粒细胞的无标记光信号的示例。无需事先标记嗜中性粒细胞和非嗜中性粒细胞即可获得光信号。光信号用于训练机器学习分类器,以区分嗜中性粒细胞和非嗜中性粒细胞。

[0324] 图20C示出了用于对嗜中性粒细胞和非嗜中性粒细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。无需事先标记嗜中性粒细胞和非嗜中性粒细胞即可获得分类。SVM分类获得了91.4%的准确度和0.941的ROC-AUC。

[0325] 图20D示出了包括嗜酸性粒细胞群体的训练数据集。嗜酸性粒细胞的特征在于相对较高水平的CD66标志物表达和相对较高水平的CD193标志物表达。使嗜酸性粒细胞流过本文所述的图案化的光学结构,并记录对应于嗜酸性粒细胞的光信号。

[0326] 图20E示出了对应于嗜酸性粒细胞和非嗜酸性粒细胞的无标记光信号的示例。无需事先标记嗜酸性粒细胞和非嗜酸性粒细胞即可获得光信号。光信号用于训练机器学习分类器,以区分嗜酸性粒细胞和非嗜酸性粒细胞。

[0327] 图20F示出了用于对嗜酸性粒细胞和非嗜酸性粒细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。无需事先标记嗜酸性粒细胞和非嗜酸性粒细胞即可获得分类。SVM分类获得了94.7%的准确度和0.992的ROC-AUC。

[0328] 图20G示出了包括嗜碱性粒细胞群体的训练数据集。嗜碱性粒细胞的特征在于相对较低水平的CD66标志物表达和相对较低水平的CD193标志物表达。使嗜碱性粒细胞流过本文所述的图案化的光学结构,并记录对应于嗜碱性粒细胞的光信号。

[0329] 图20H示出了对应于嗜碱性粒细胞和非嗜碱性粒细胞的无标记光学信号的示例。无需事先标记嗜碱性粒细胞和非嗜碱性粒细胞即可获得光信号。光信号用于训练机器学习分类器,以区分嗜碱性粒细胞和非嗜碱性粒细胞。

[0330] 图20I示出了用于对嗜碱性粒细胞和非嗜碱性粒细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。无需事先标记嗜碱性粒细胞和非嗜碱性粒细胞即可获得分类。SVM分类获得了94.0%的准确度和0.970的ROC-AUC。

[0331] 图21A-22B示出了在混合流体中疾病细胞的无标记检测。

[0332] 图21A示出了用于对颊细胞和HeLa细胞分类的SVM得分直方图的示例。使颊细胞和HeLa细胞流过本文所述的图案化的光学结构,并记录对应于颊细胞和HeLa细胞的光信号。无需事先标记颊细胞或HeLa细胞即可获得光信号。光信号用于训练机器学习分类器,以区分颊细胞和HeLa细胞。SVM分类获得了0.995的ROC-AUC。

[0333] 图21B示出了用于对BM1细胞和K562细胞进行分类的SVM得分直方图的示例。使BM1细胞和K562细胞流过本文所述的图案化的光学结构,并记录对应于BM1细胞和K562细胞的光信号。无需事先标记BM1细胞或K562细胞即可获得光信号。光信号用于训练机器学习分类器,以区分BM1细胞和K562细胞。SVM分类获得了0.969的ROC-AUC。

[0334] 实施例16:区分检测区域中同时存在的不同类型的粒子

[0335] 即使当不同类型的粒子同时处于本公开内容的检测器对其敏感的区域中时,本公开内容的系统和方法也可以用于区分不同类型的粒子。当两个或更多个粒子同时位于该区

域中时,在检测器检测到的信号中可能发生重叠。因为本文所述的系统和方法可以按线性方程式表示,所以这种事件可以表示为独立于该区域中所有其他粒子的每个粒子产生的信号的总和。

[0336] 如本文所述,本文所述的系统和方法可用于学习对应于不同类型的粒子的不同波形。可以使用任意时间偏移来对这些波形进行任意求和,以说明在不同时间间隔内行进通过该区域的不同粒子。可以生成各种各样的这种求和并将其与由于同时存在不同类型的粒子而产生的测量波形进行比较。以这种方式,可以区分粒子。

[0337] 替代地或组合地,可以使用重叠波形来训练本文描述的机器学习过程,所述重叠波形由于同时存在不同类型的粒子而产生。

[0338] 图22A示出了由第一类型的粒子产生的信号(图22A的上部)、由第二类型的粒子产生的信号(图22A的中间部分)以及由第一和第二类型的粒子同时存在产生的信号(图22A的底部)的示例。

[0339] 图22B示出了用于区分同时存在于本公开内容的检测区域中的不同类型的粒子的混淆矩阵的示例。混淆矩阵显示为包含MIA PaCa-2细胞和MCF-7细胞的粒子的混合物生成的六个状态。如图22B所示,本公开内容的系统和方法从MCF-7细胞准确地区分MIA PaCa-2,即使在重叠信号对应于在检测器对其敏感的区域中同时存在两种类型的细胞的情况下。

[0340] 虽然本文已经示出和描述了本发明的优选实施方式,但对于本领域技术人员容易理解的是,这样的实施方式只是以示例的方式提供的。并非旨在通过说明书中提供的具体实施例来限制本发明。尽管已经参考前述说明书描述了本发明,但是本文实施方案的描述和说明并不意味着以限制性的意义来解释。本领域技术人员在不脱离本发明的情况下现将想到多种变化、改变和替代。此外,应当理解,本发明的所有方面不限于本文阐述的具体描述、配置或相对比例,其取决于各种条件和变量。应当理解,本文所述的本发明实施方案的各种替代方案可用于实施本发明。因此,考虑到本发明还应当涵盖任何这样的替代、修改、变化或等同物。以下权利要求旨在限定本发明的范围,并由此涵盖这些权利要求范围内的方法和结构及其等同物。

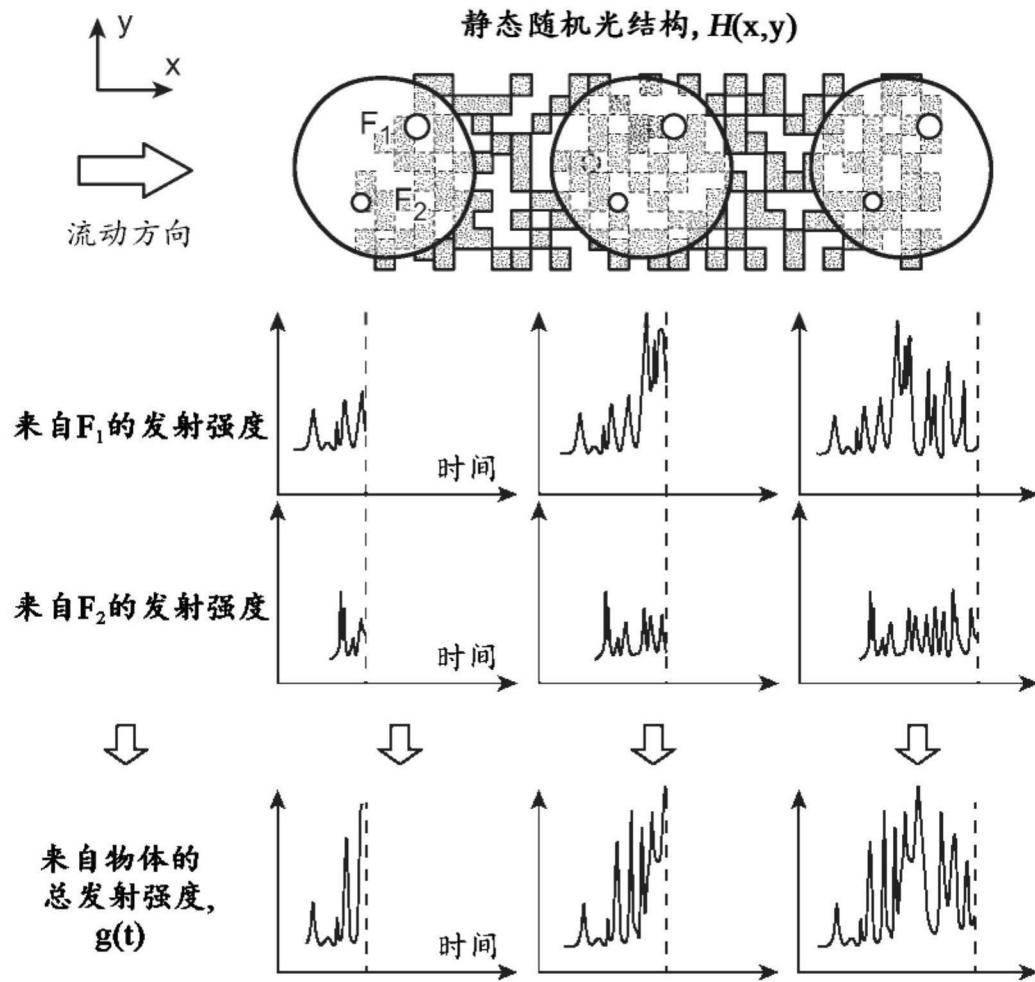


图1A

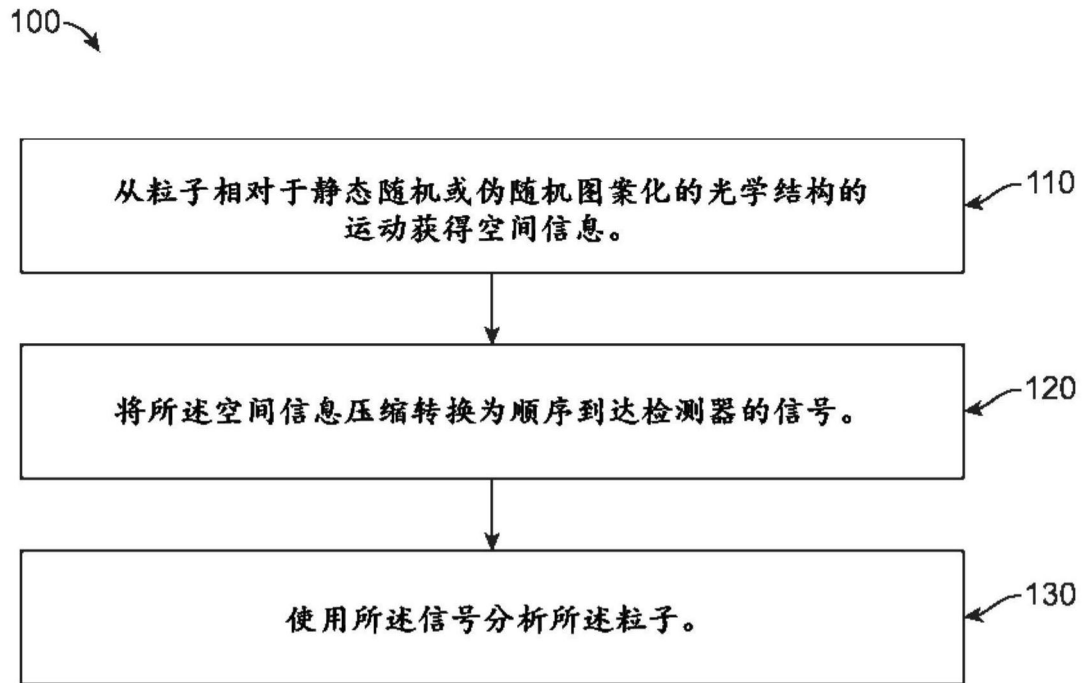


图1B

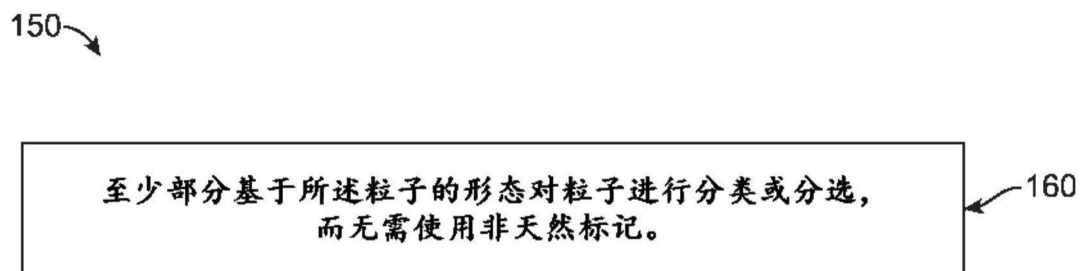


图1C

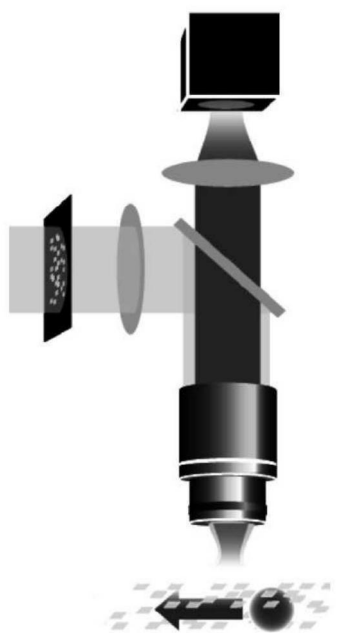


图2A



图2B

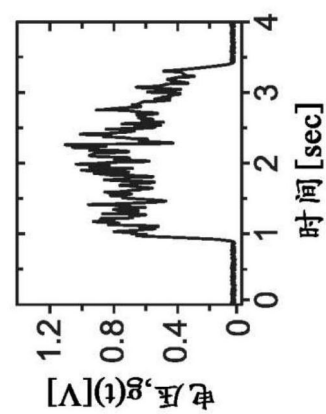


图2C

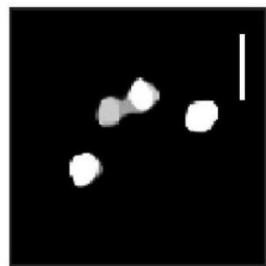


图2D

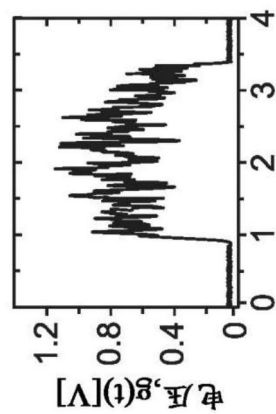


图2E

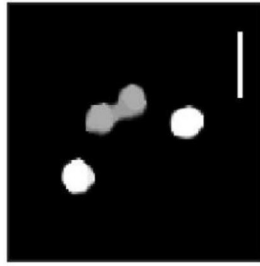


图2F

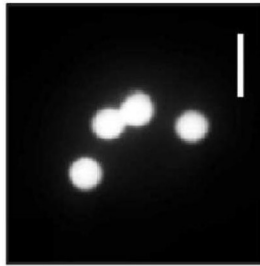


图2G

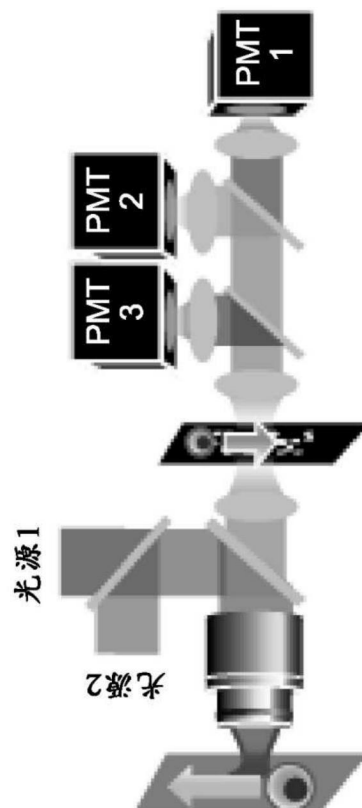


图3A

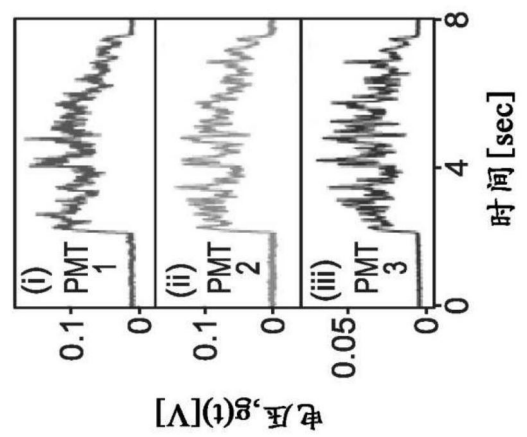


图3B

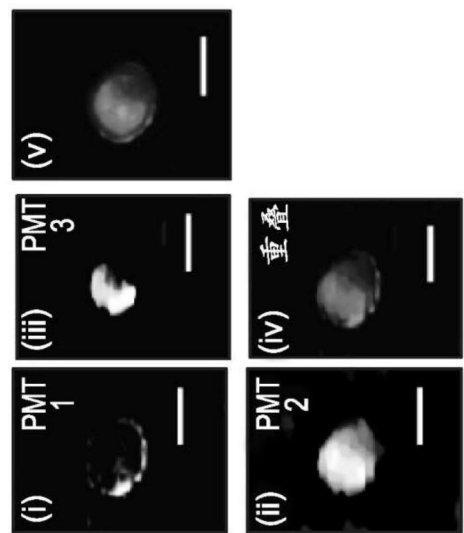


图3C

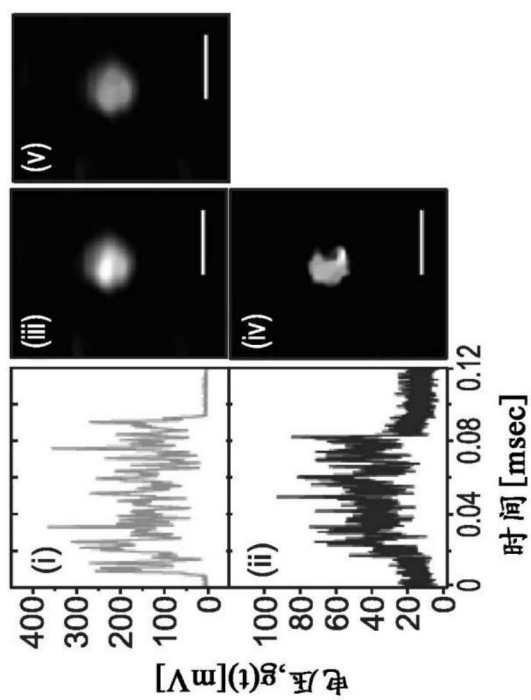


图3D

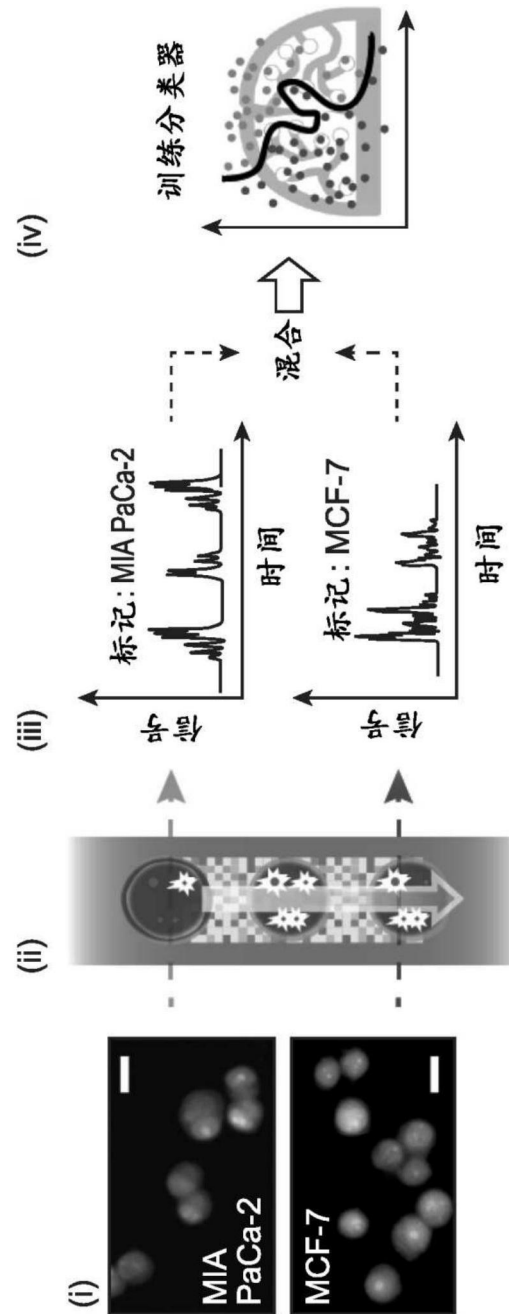


图4A

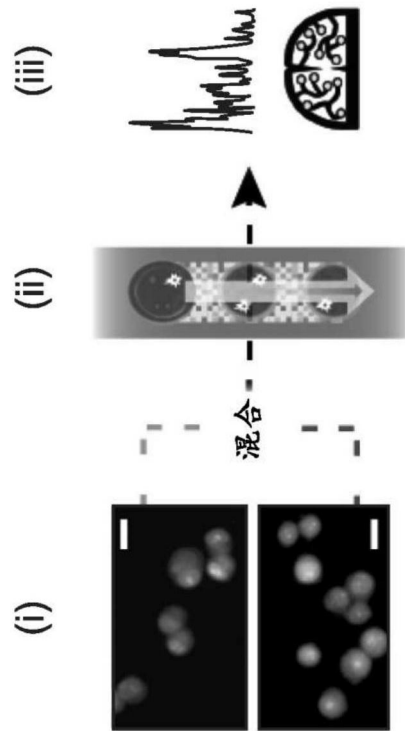


图4B

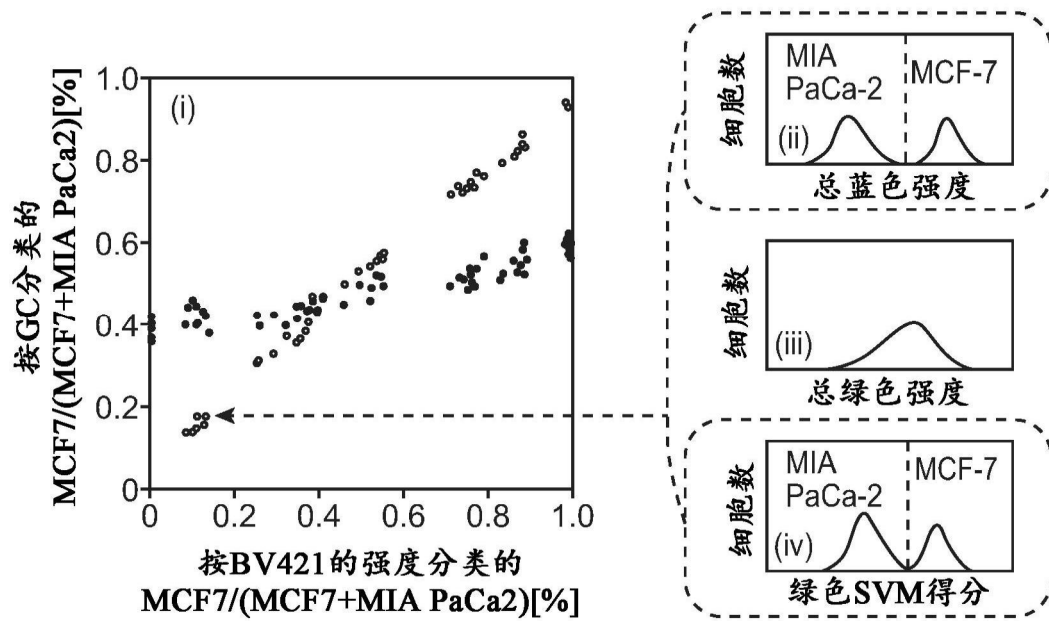


图4C

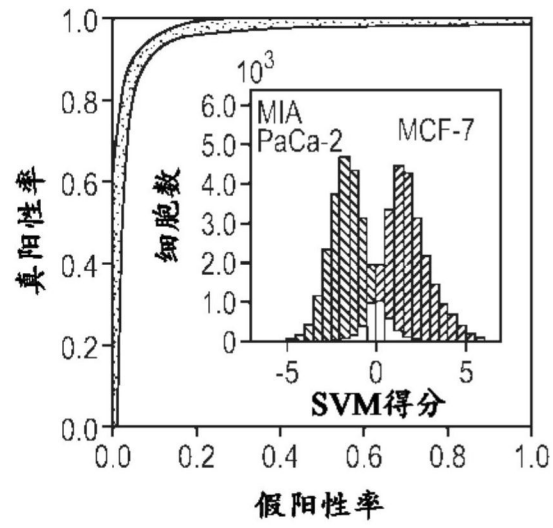


图4D

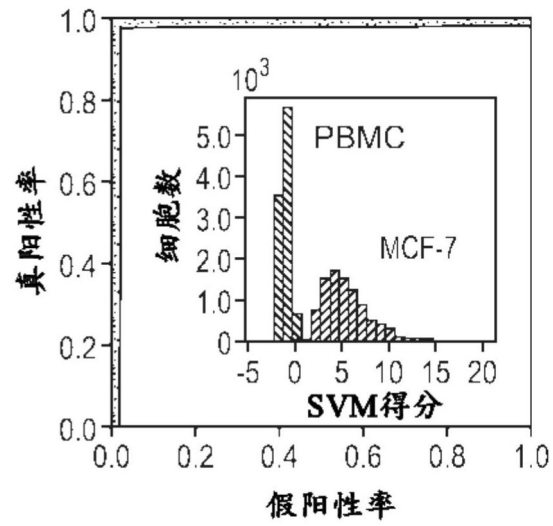


图4E

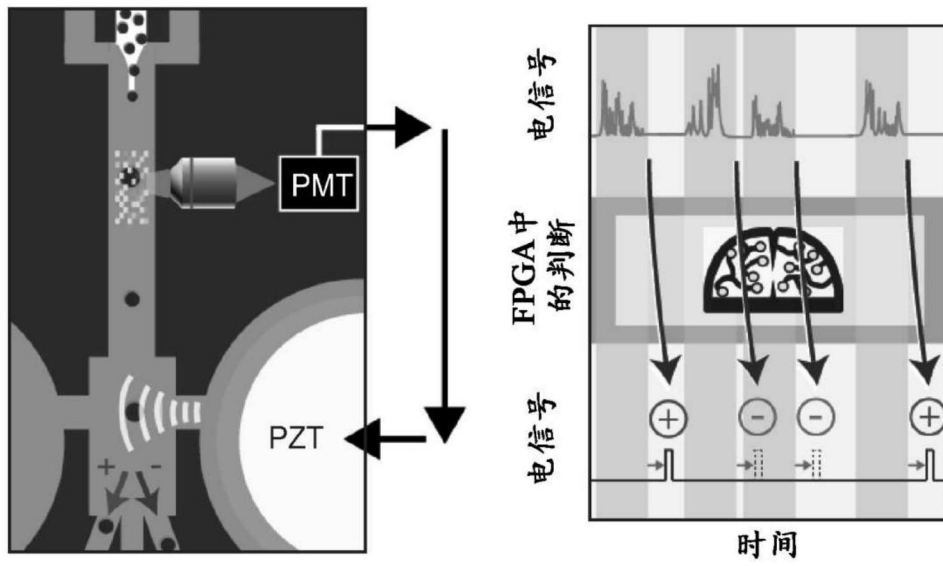


图5A

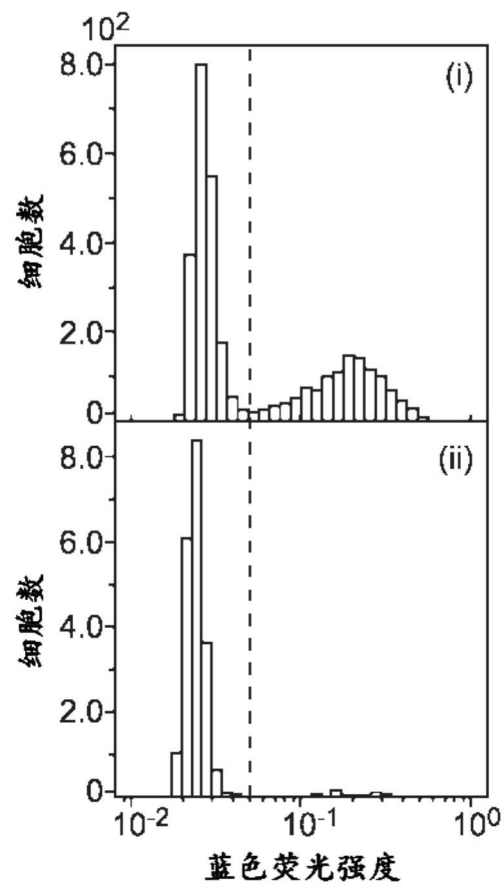


图5B

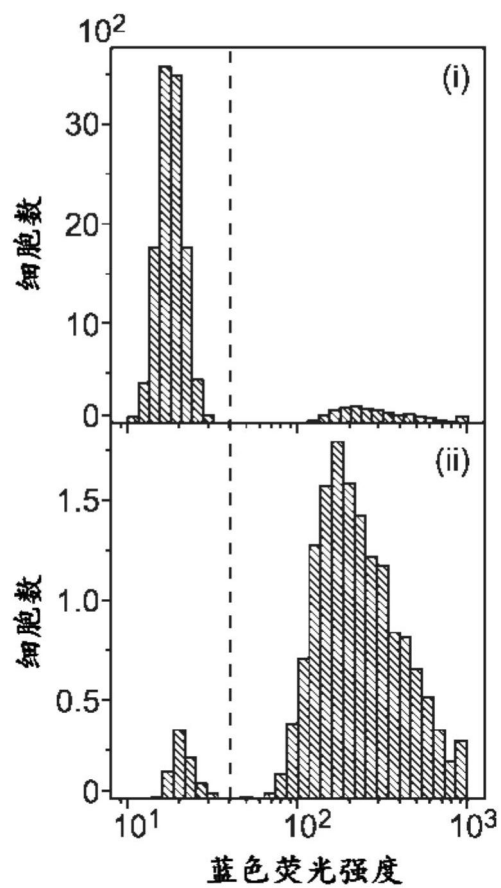


图5C

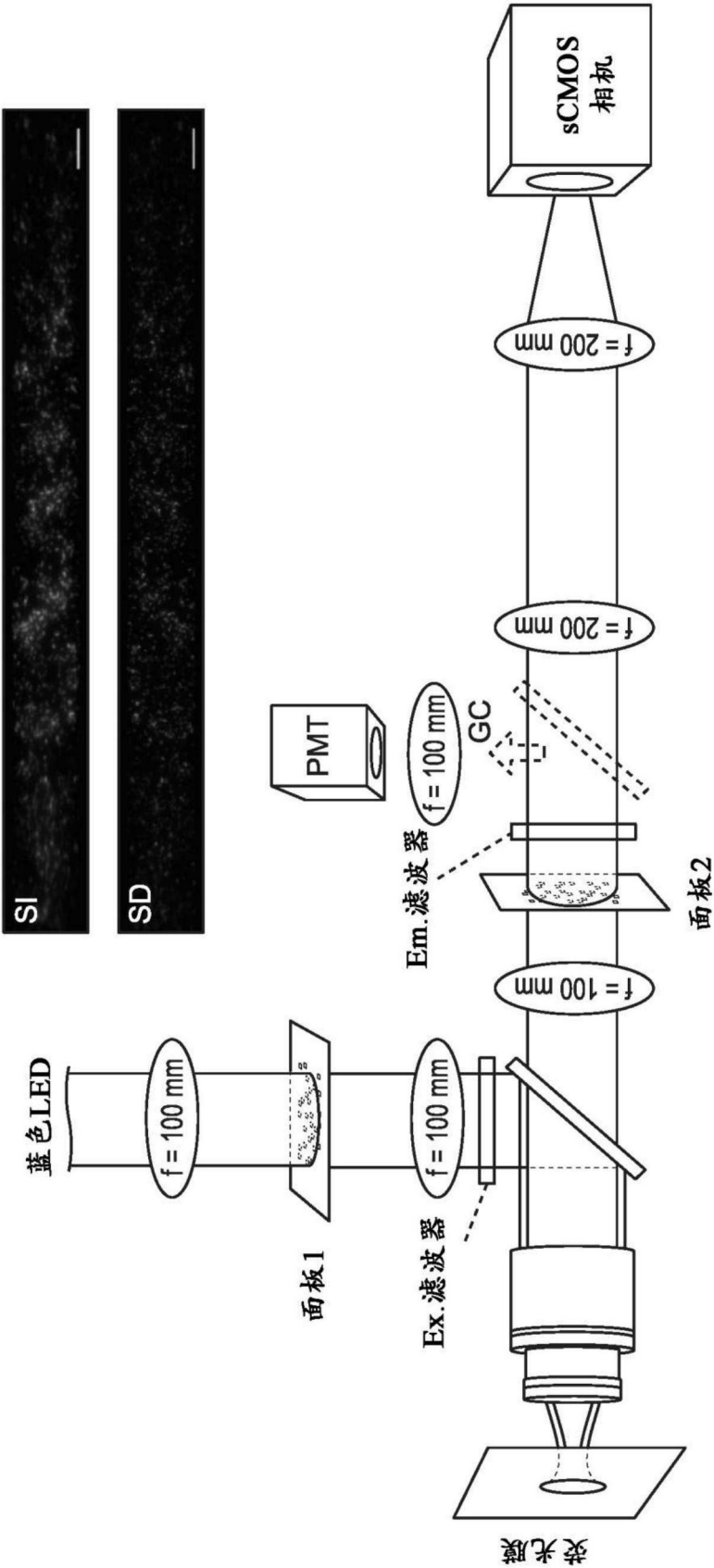


图6

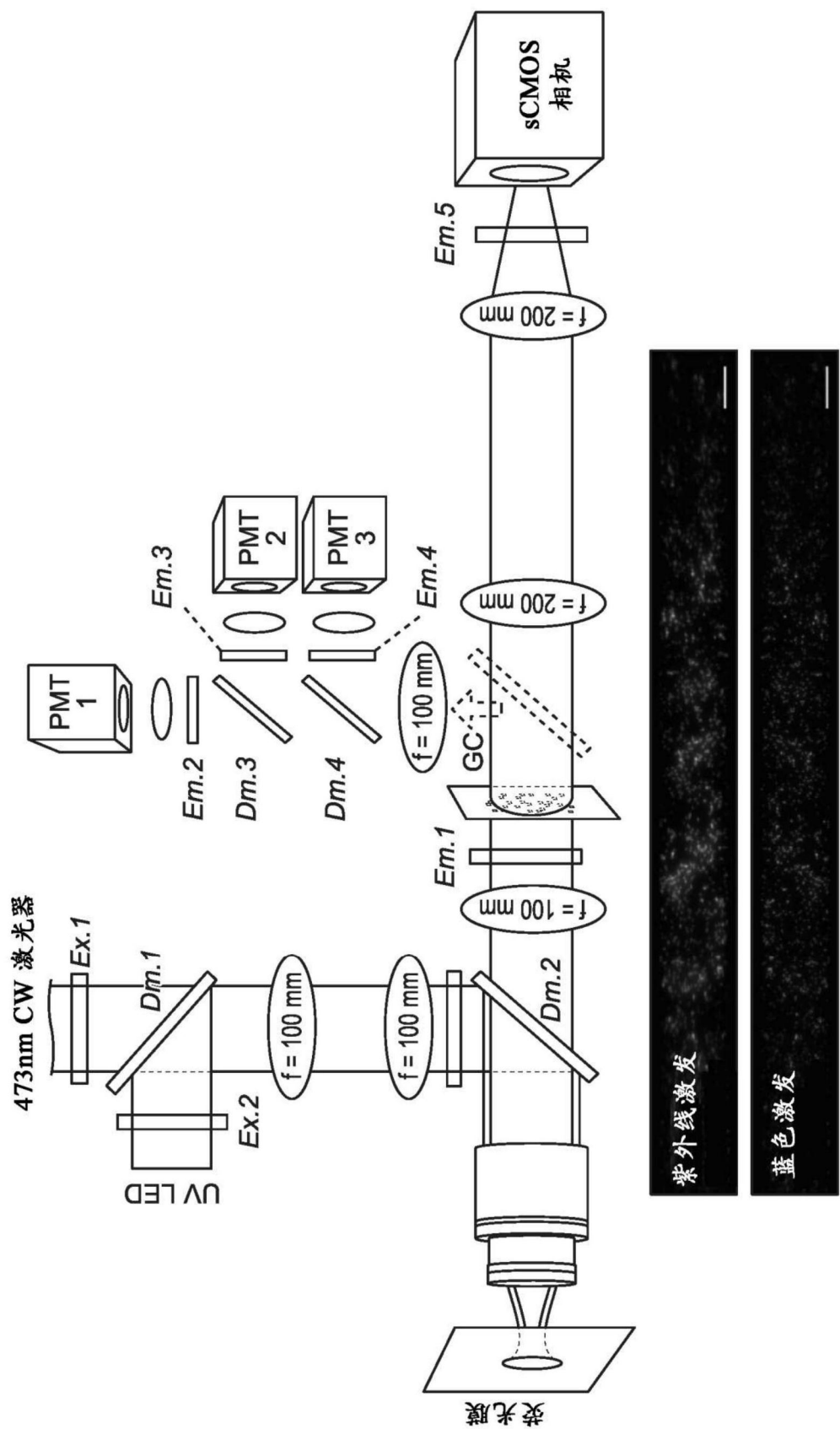


图7

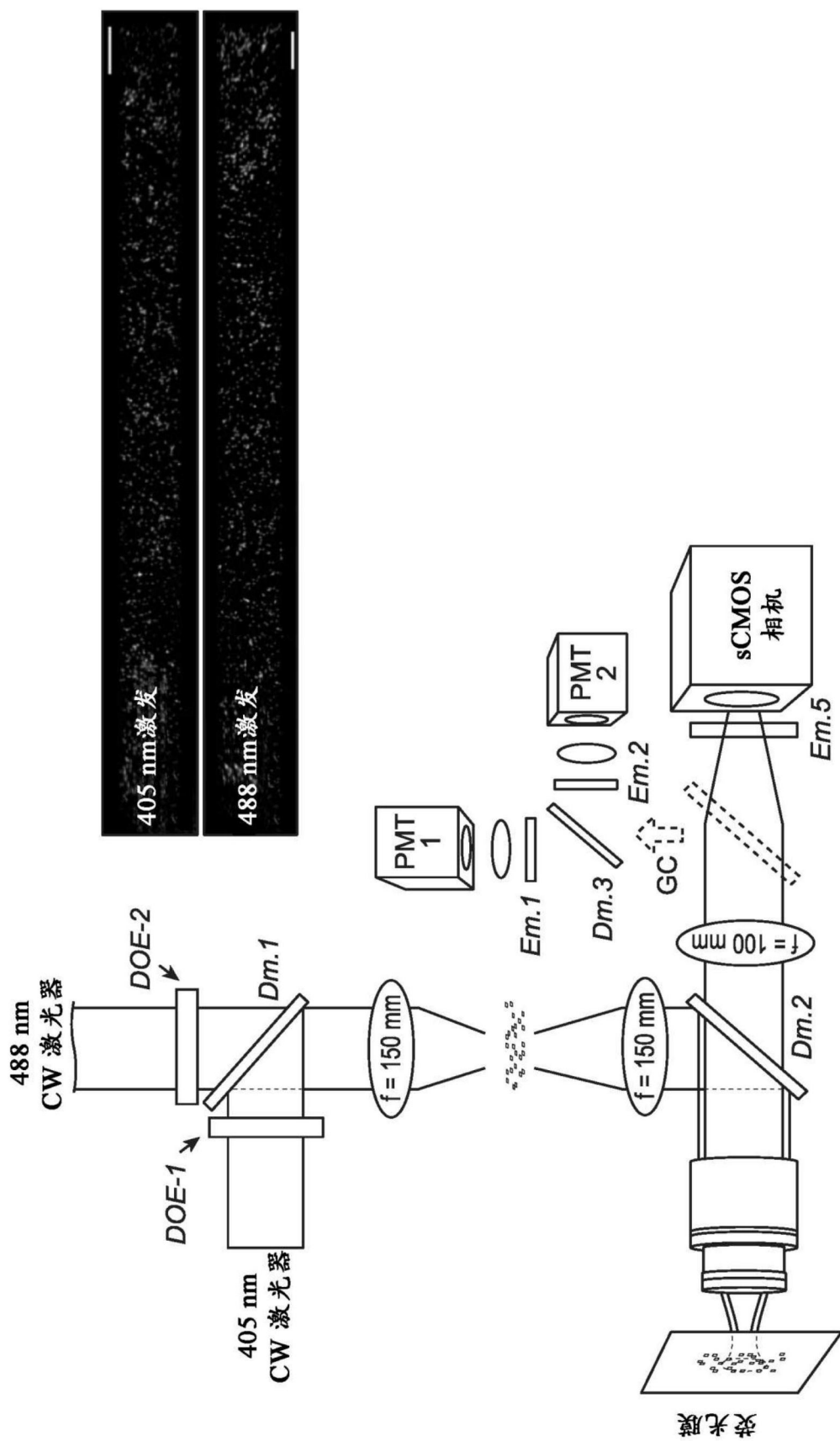


图8

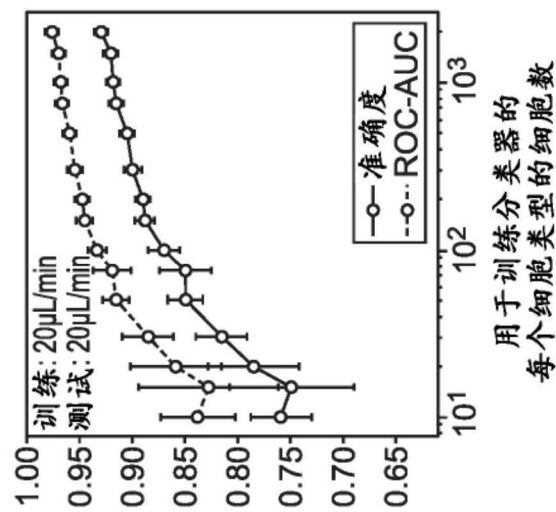
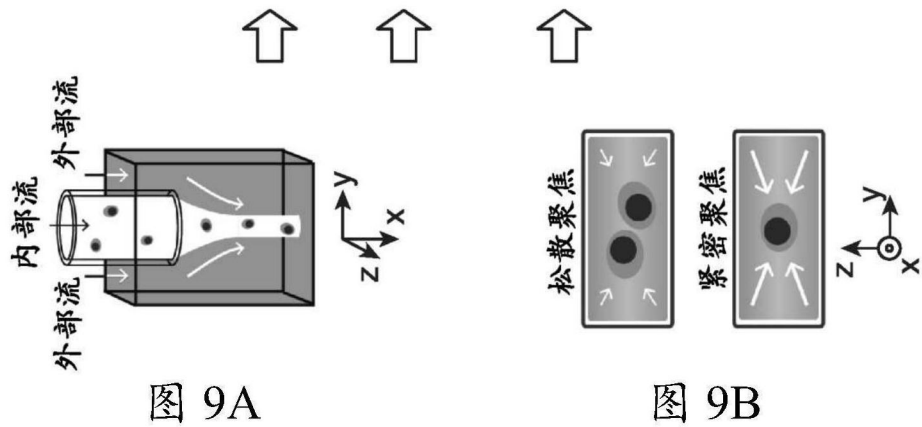


图9C

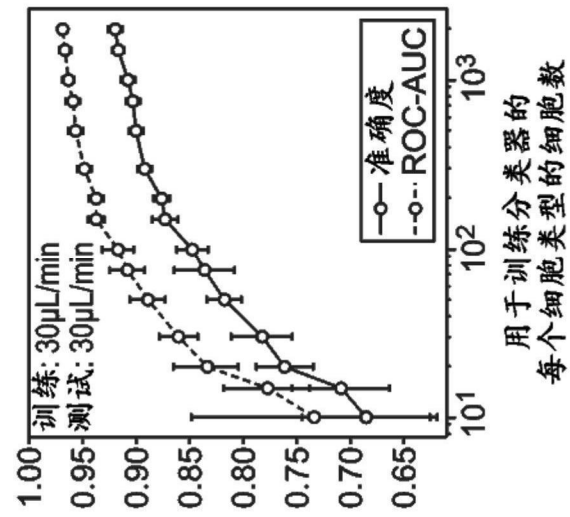


图9D

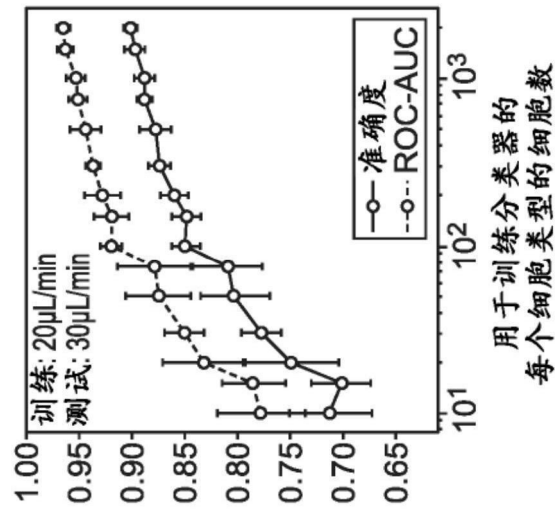


图9E

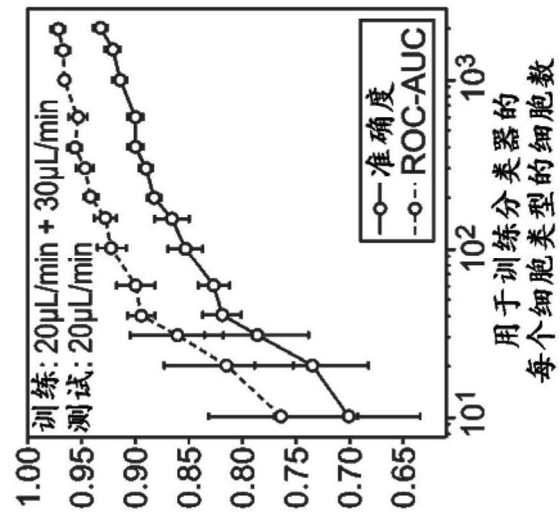


图9F

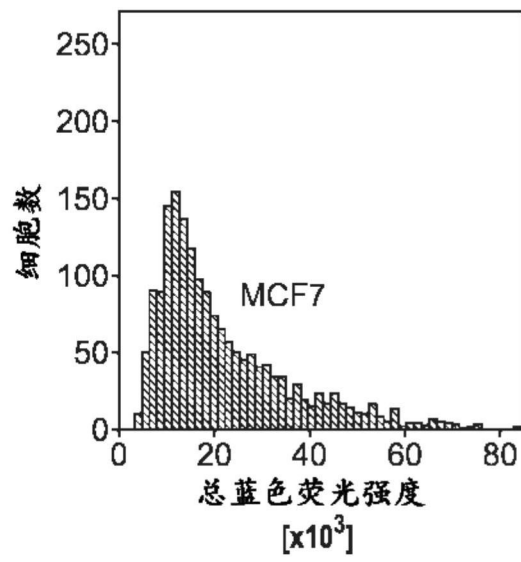


图10A

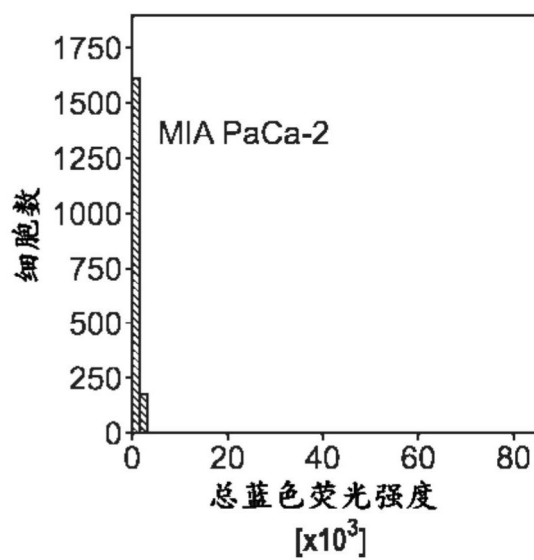


图10B

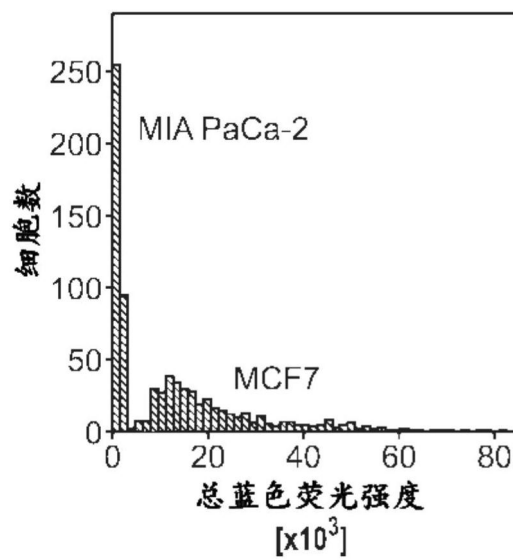


图10C

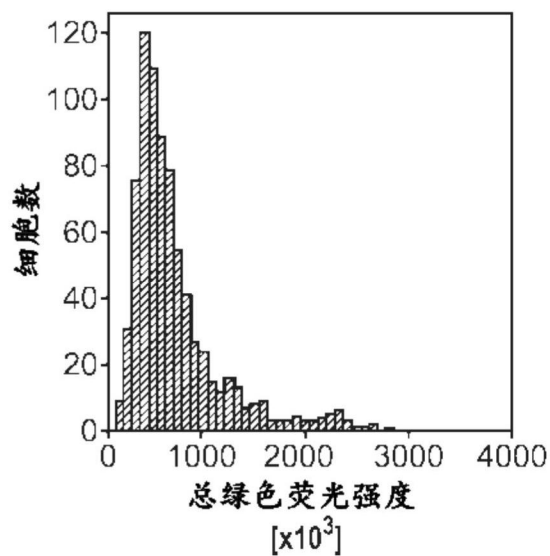


图10D

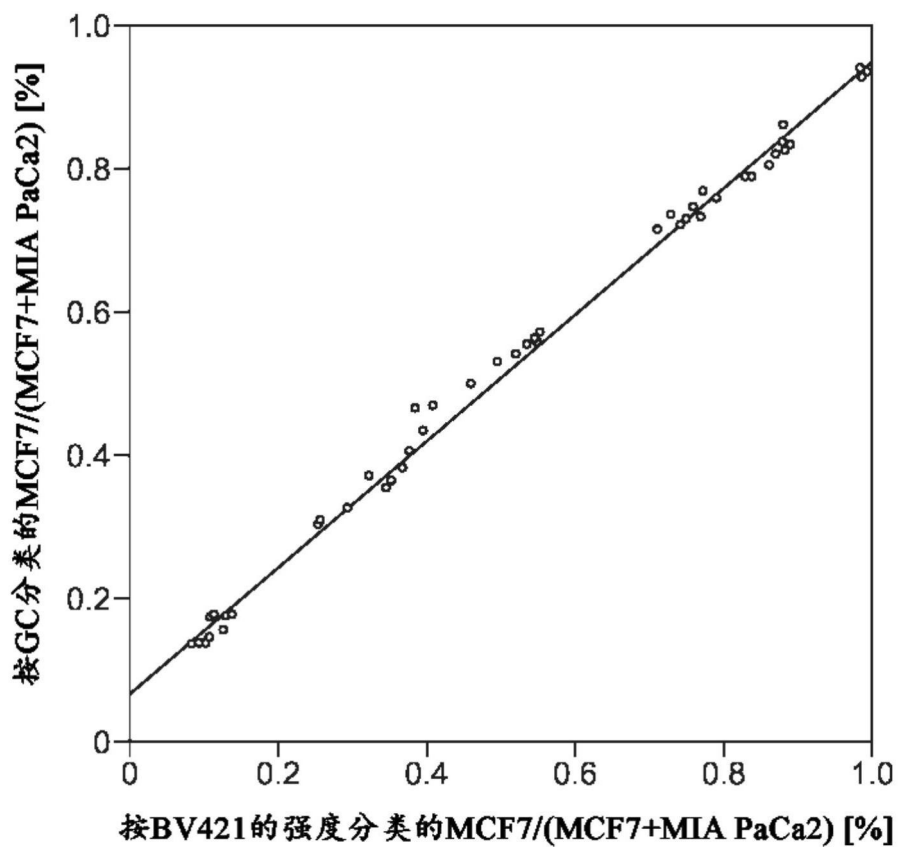


图11

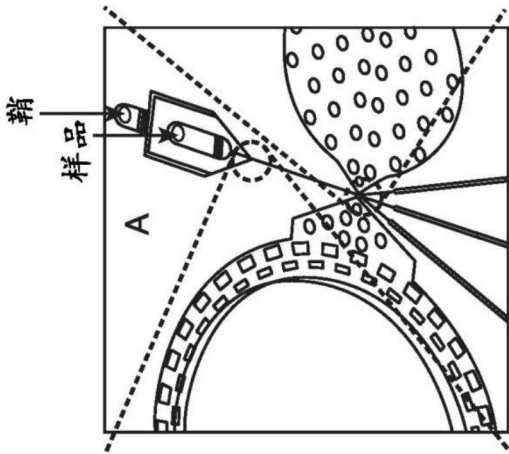


图12A

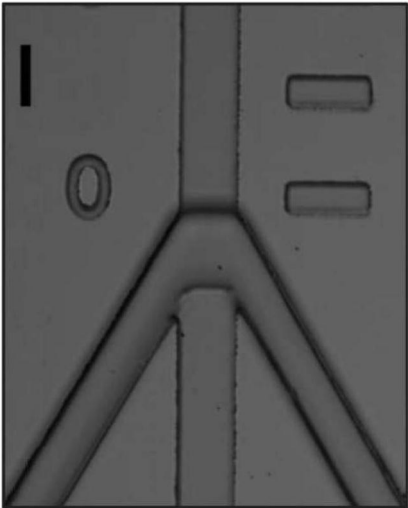


图12B

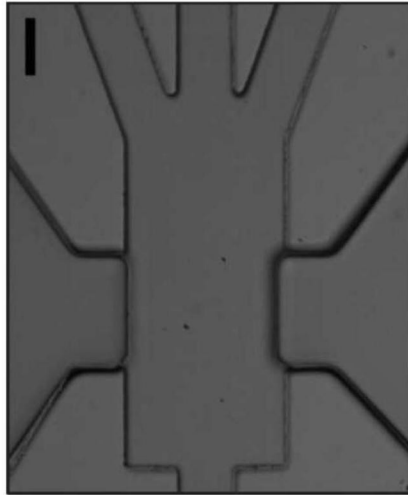


图12C

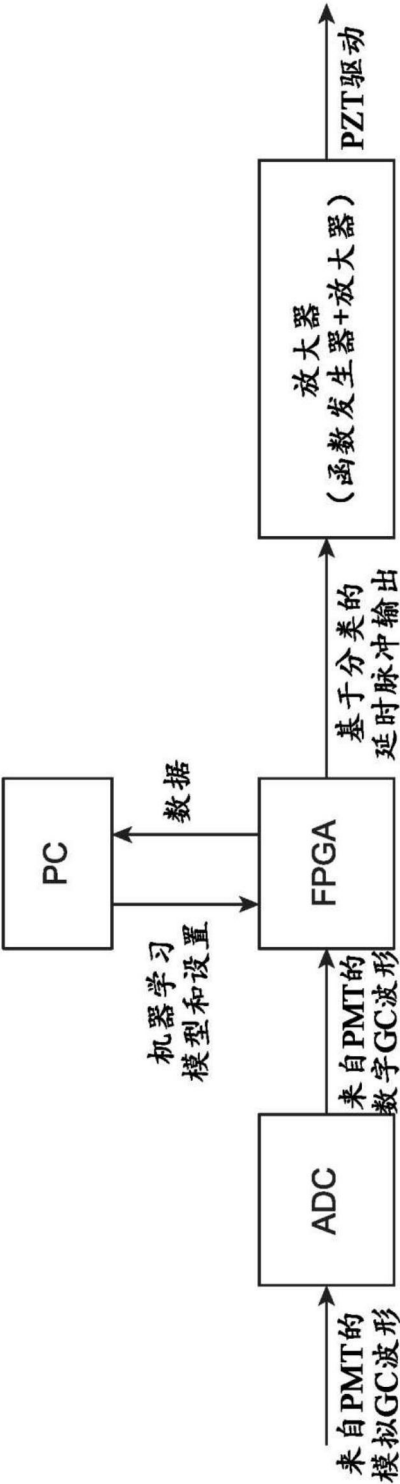


图12D

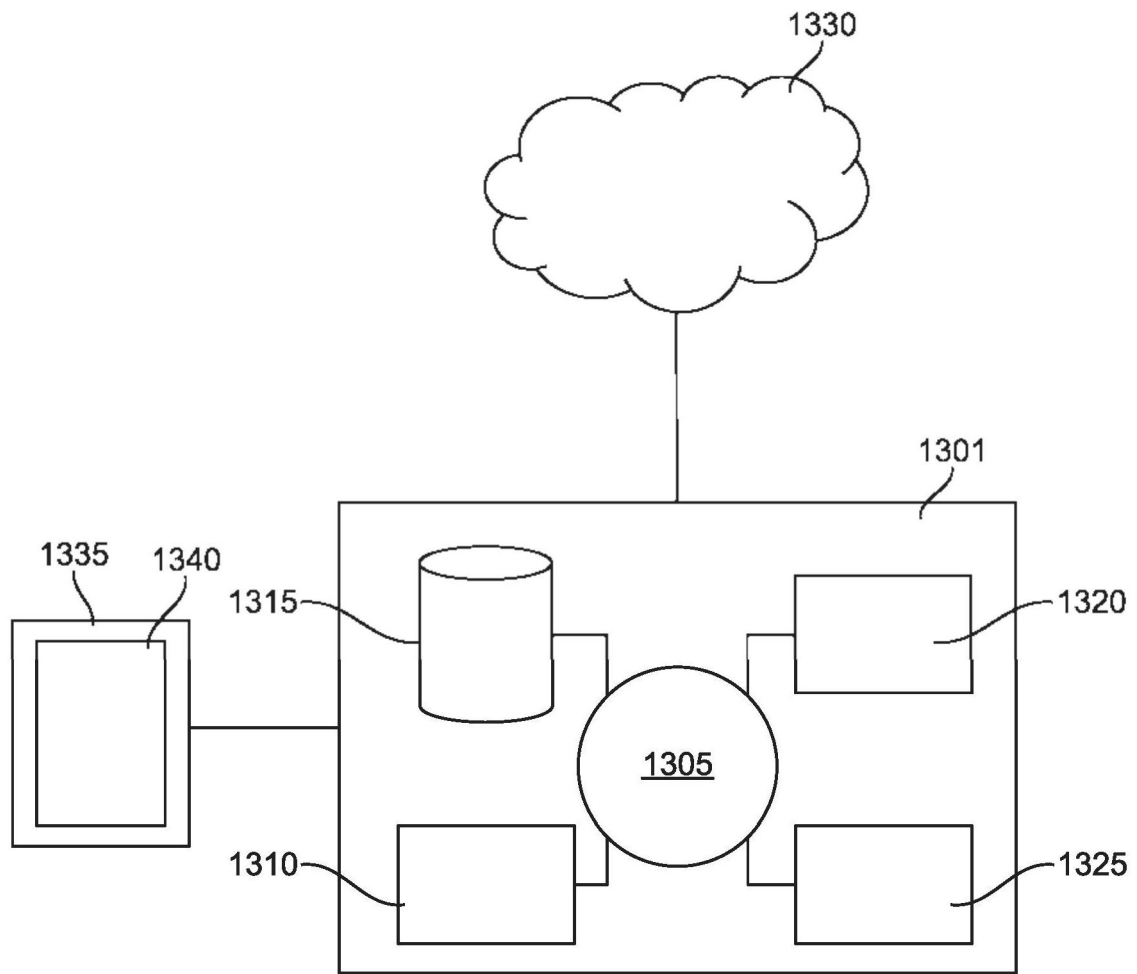


图13

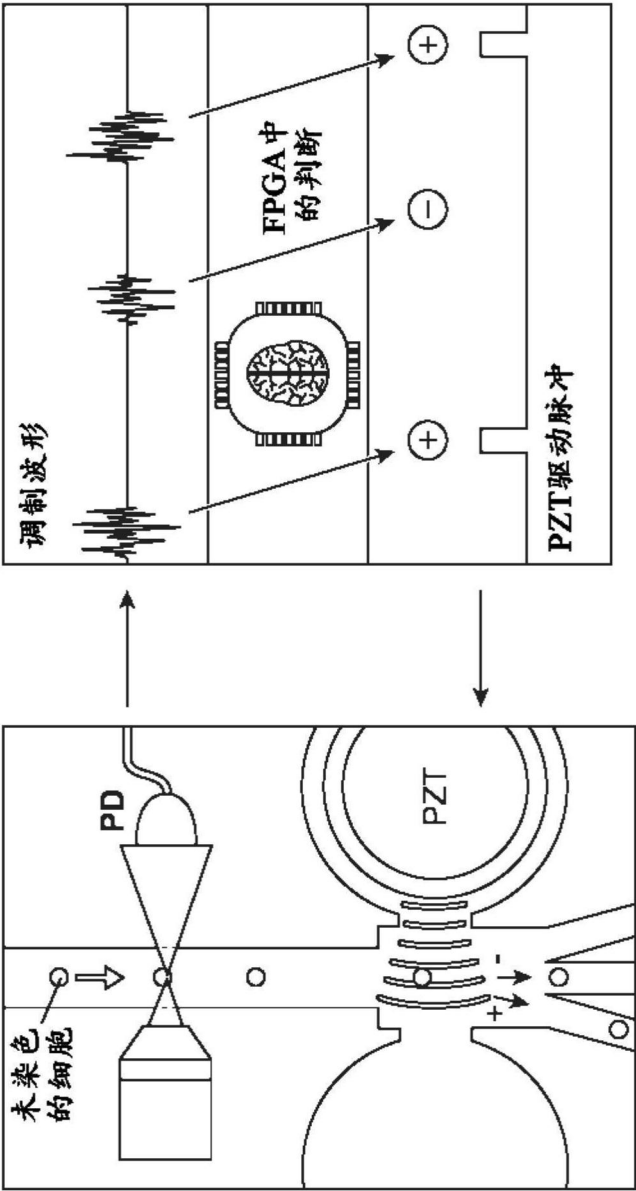


图14

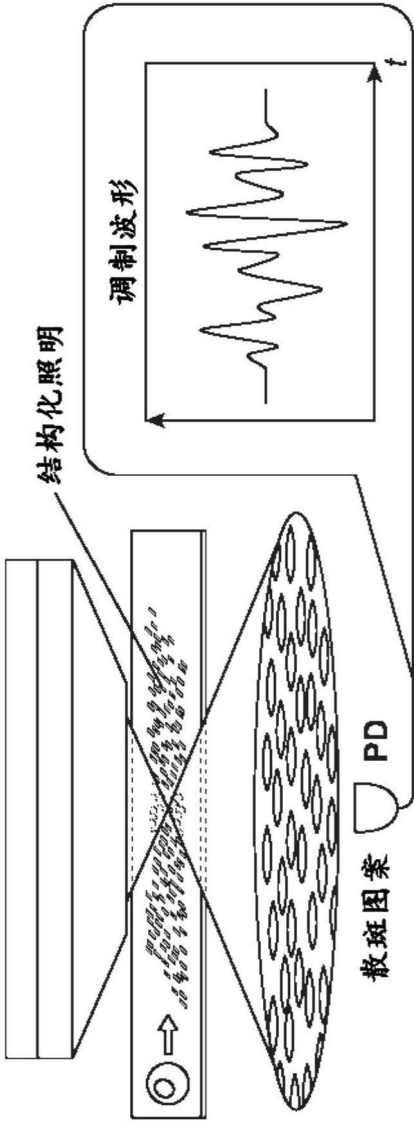


图15

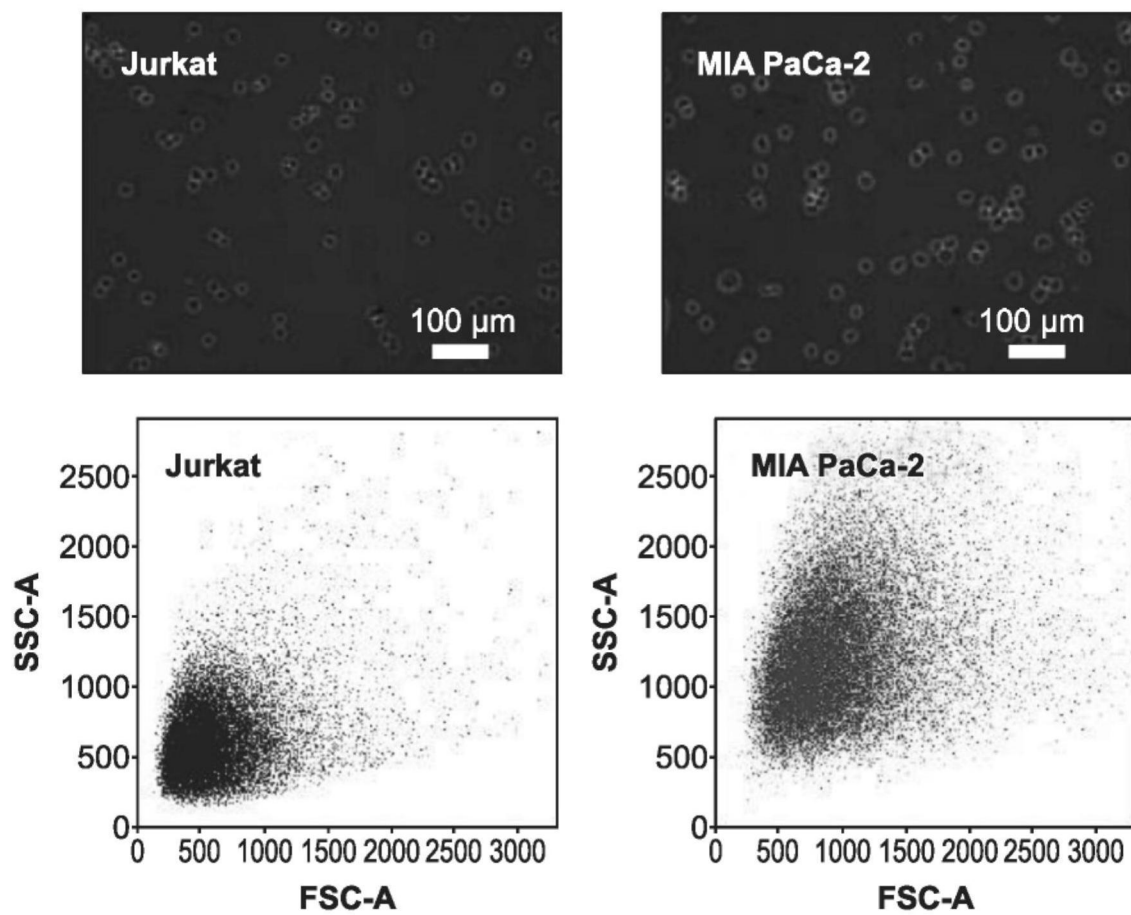


图16A

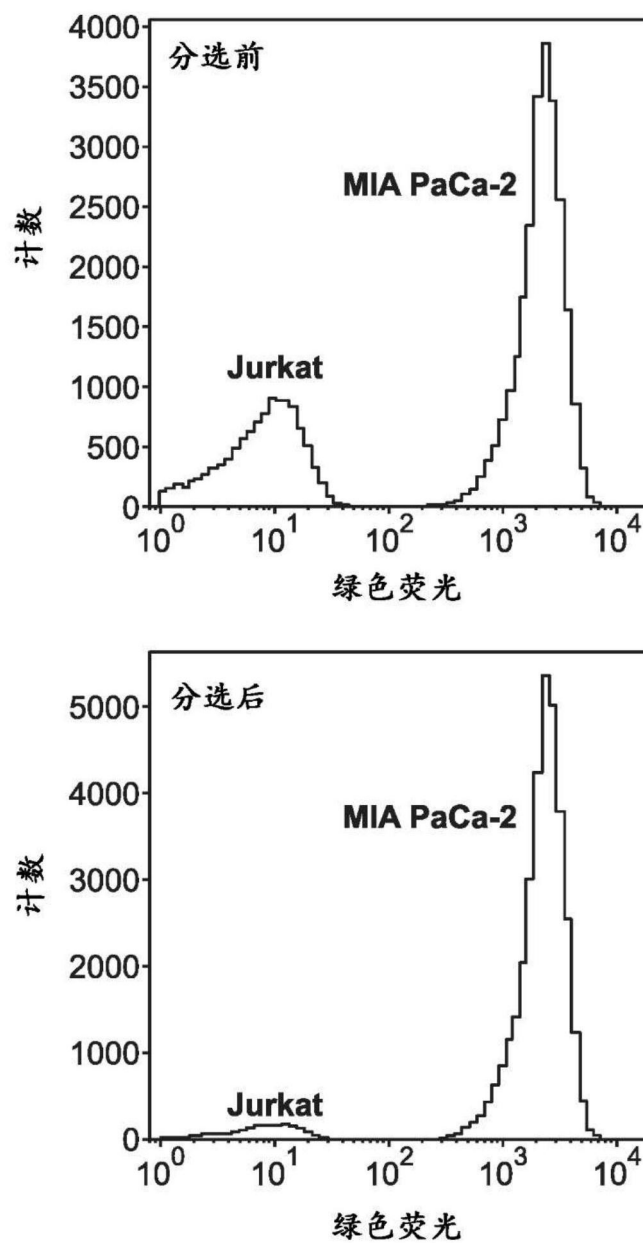


图16B

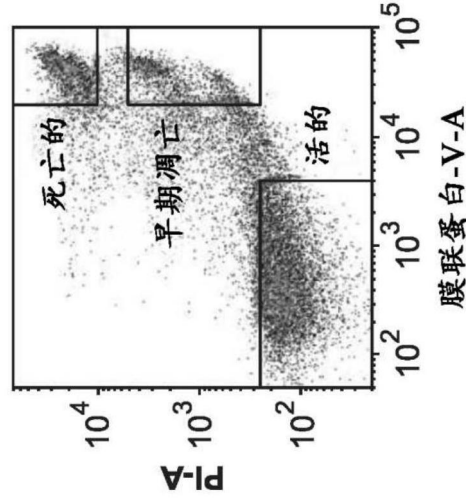


图17A

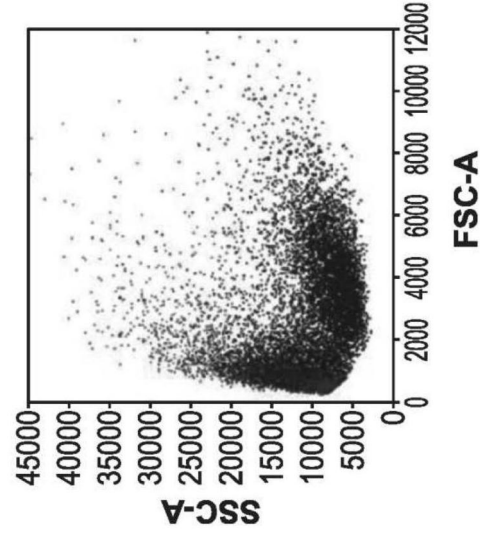


图17B

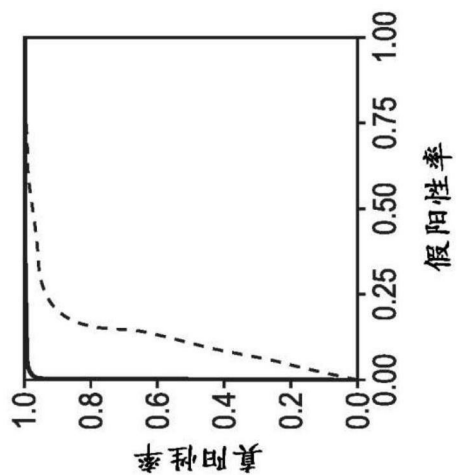


图17C

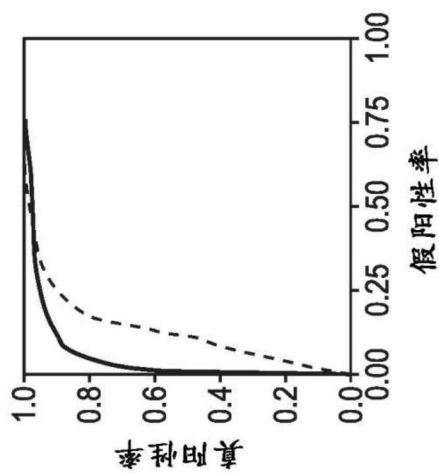


图17D

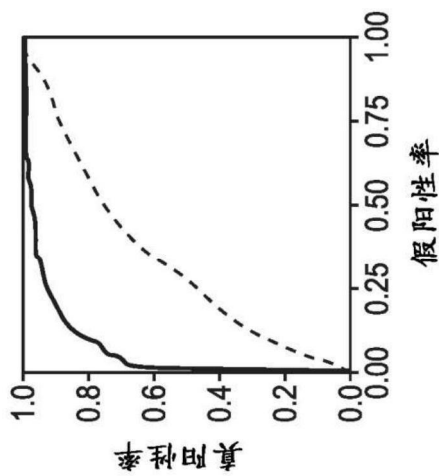


图17E

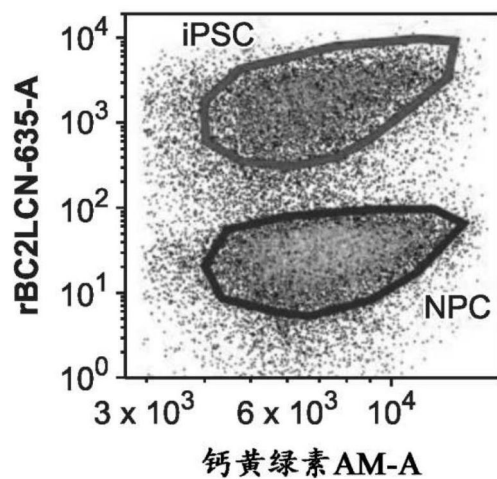


图18A

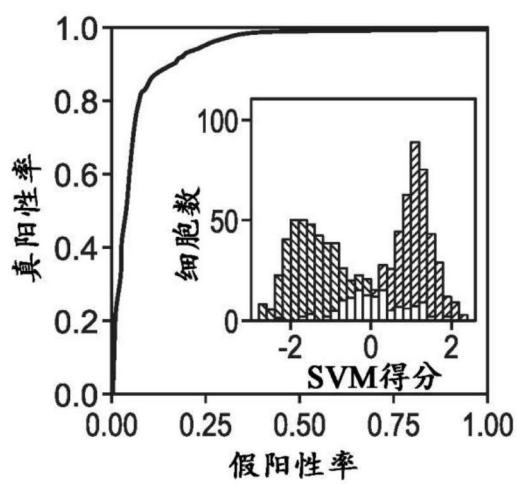


图18B

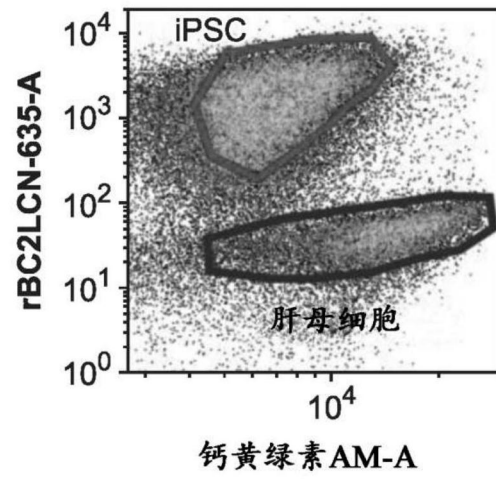


图18C

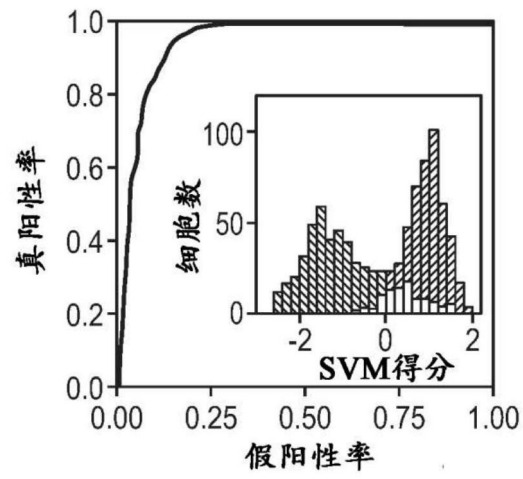


图18D

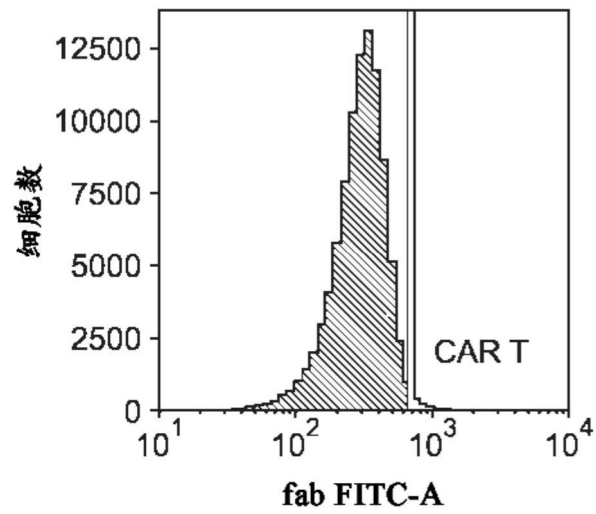


图19A

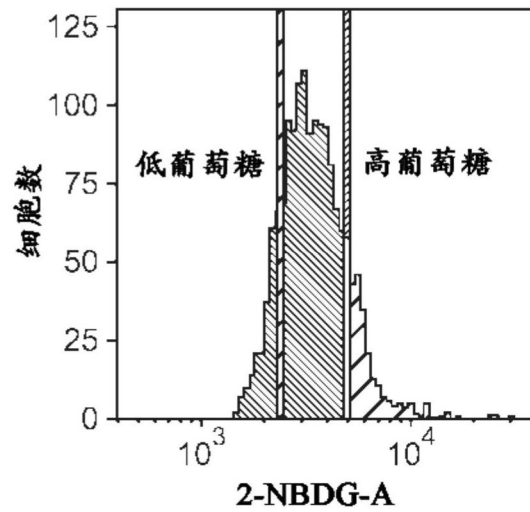


图19B

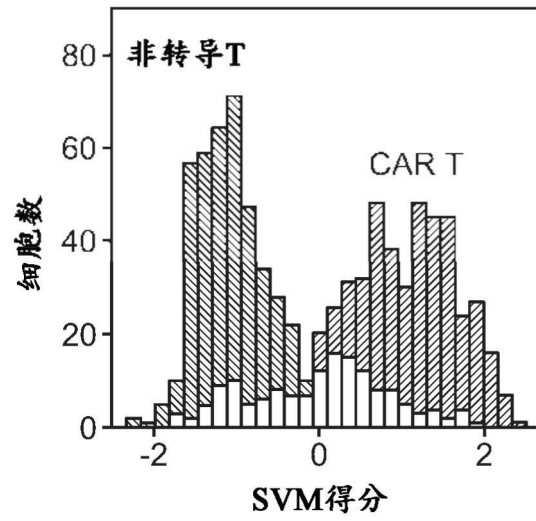


图19C

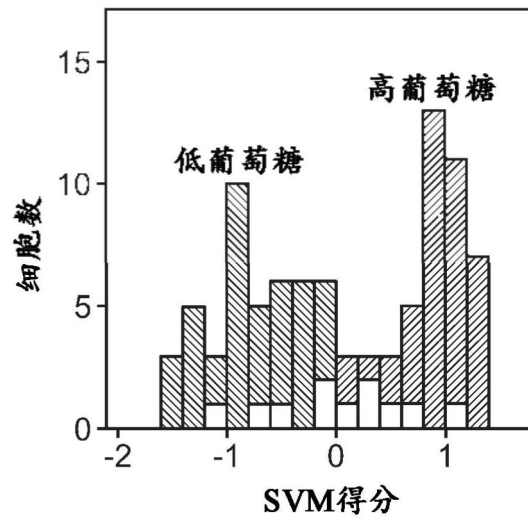


图19D

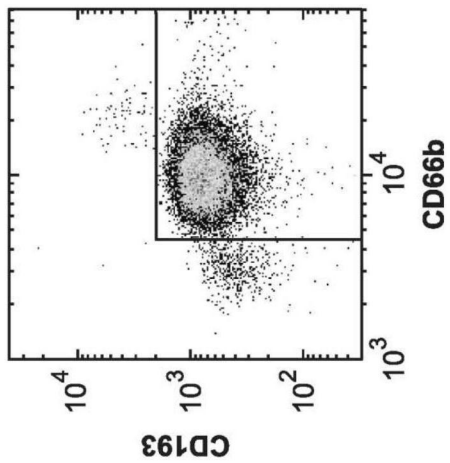


图20A

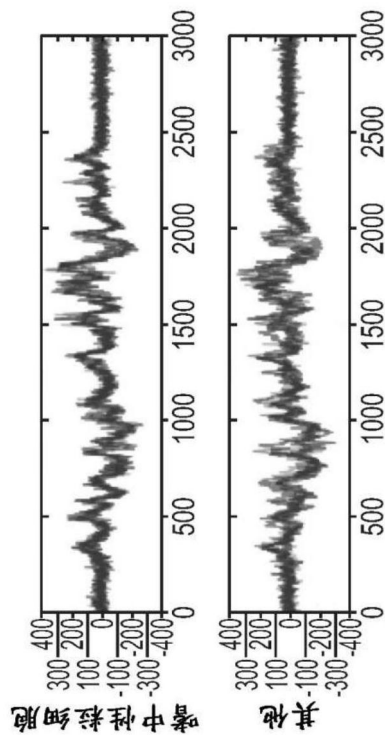


图20B

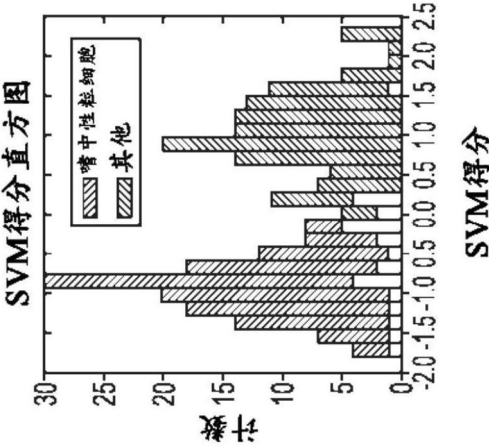


图20C

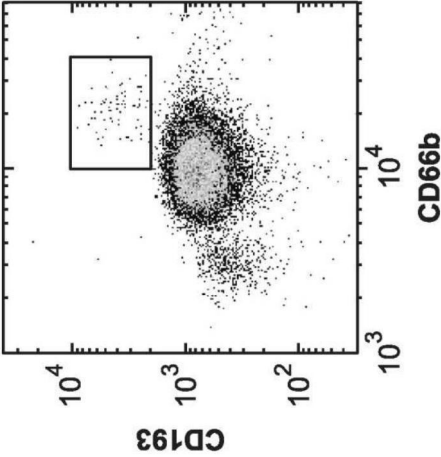


图20D

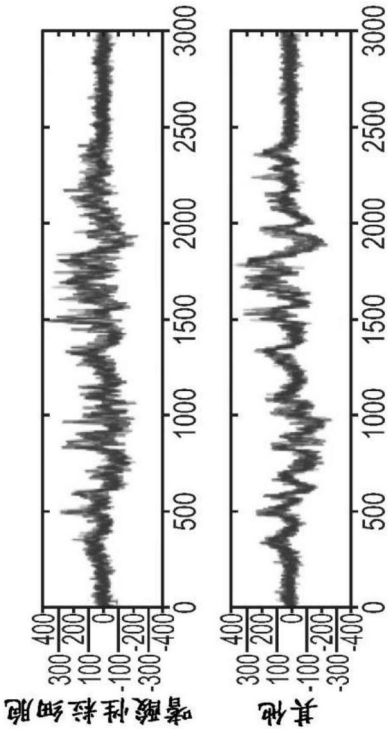


图20E

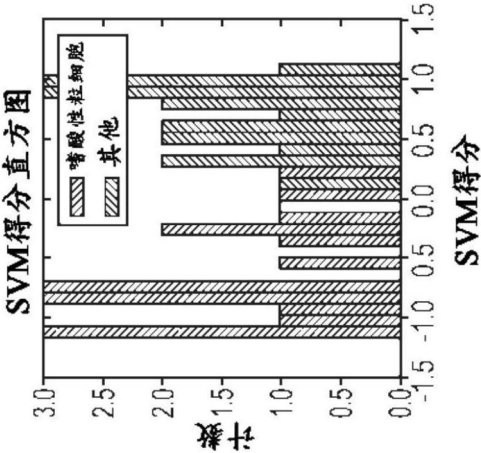


图20F

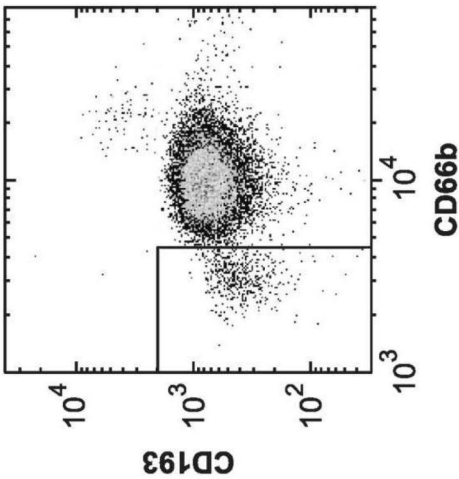


图20G

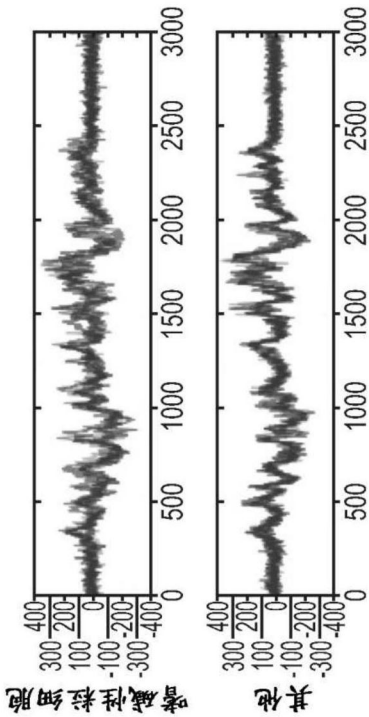


图20H

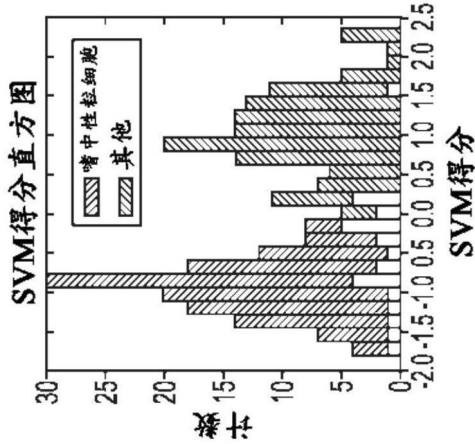


图20I

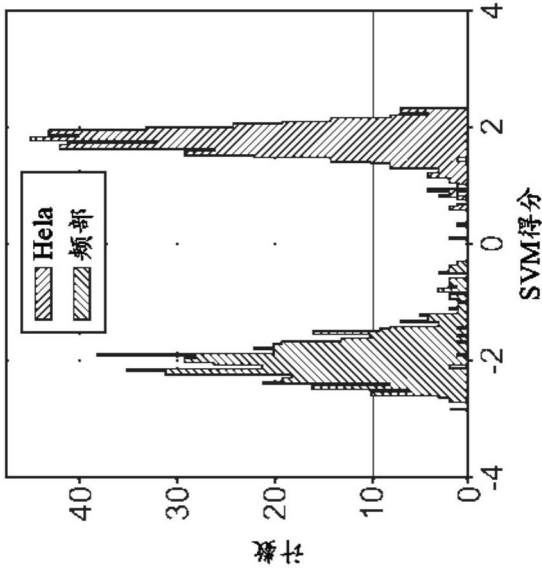


图21A

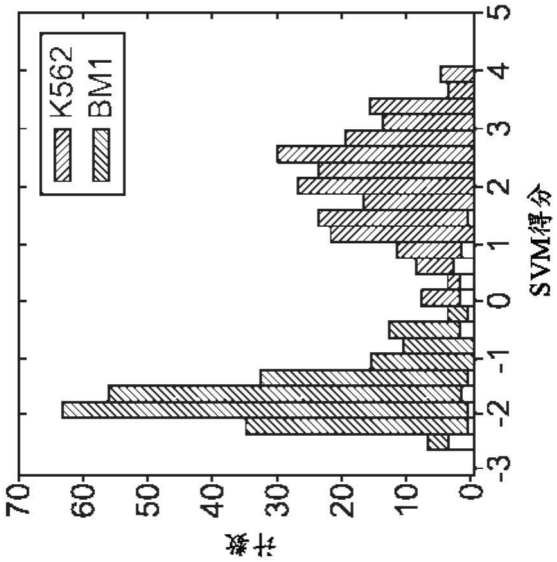


图21B

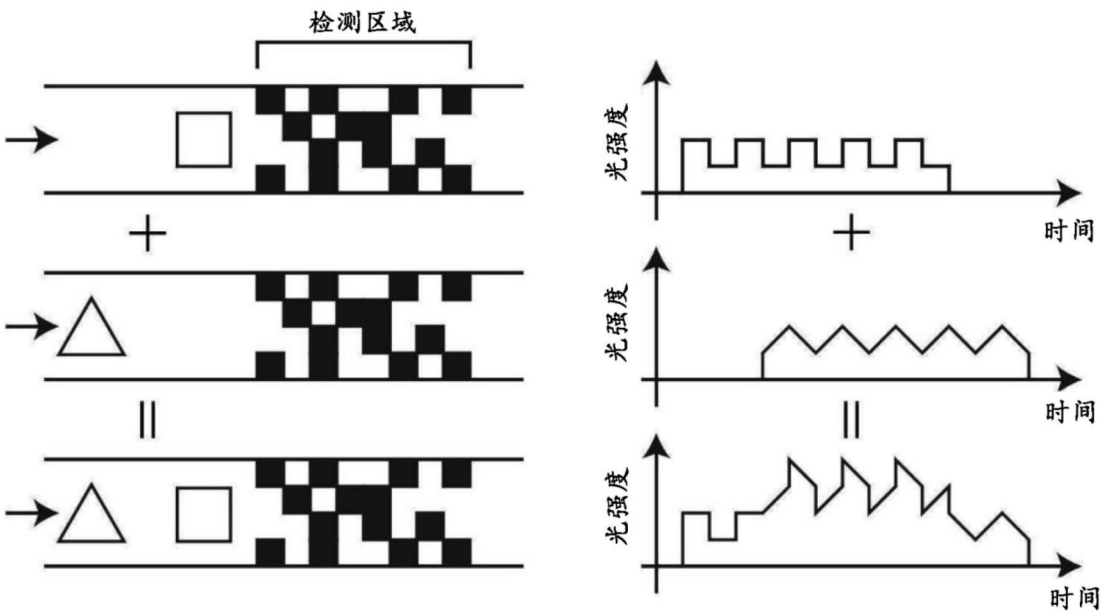


图22A

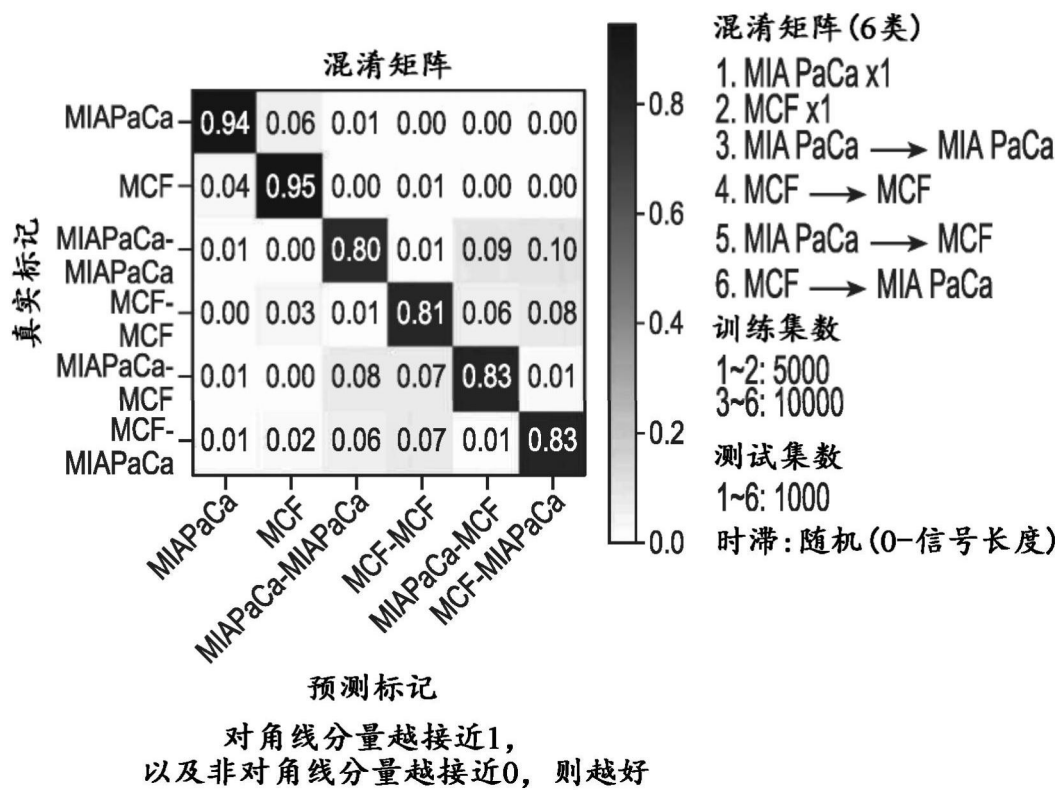


图22B