(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103074410 B
(45)授权公告日 2016.12.07

(21)申请号 201210428780.0

(22)申请日 2007.06.15

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 103074410 A

(43)申请公布日 2013.05.01

(30)优先权数据
PA200600821 2006.06.16 DK
PCT/DK2006/00581 2006.10.16 DK
PA2007/00571 2007.04.19 DK
60/814,115 2006.06.16 US

(62)分案原申请数据
200780027901.8 2007.06.15

(73)专利权人 尤尼森斯繁殖技术公司
地址 丹麦奥胡斯

(72)发明人 尼尔斯·B·拉姆辛
于尔根·伯恩特森

(74)专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270
代理人 武晨燕 迟姗

(51)Int.Cl.
C12Q 1/02(2006.01)
C12N 5/073(2010.01)

(56)对比文件

Thorir Hardarson等.Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation.《Human Reproduction》.2001,第16卷(第2期),313-318.

D. S. Gonzales等.Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle.《Journal of Reproduction and Fertility》.1995,第105卷1-8.

D. S. Gonzales等.Prediction of the developmental potential of hamster embryos in vitro by precise timing of the third cell cycle.《Journal of Reproduction and Fertility》.1995,第105卷1-8.

S.Ziebe等.Embryo morphology or cleavage stage: how to select the best embryos for transfer after in-vitro fertilization.《Human Reproduction》.1997,第12卷(第7期),1545-1549.

审查员 张丽华

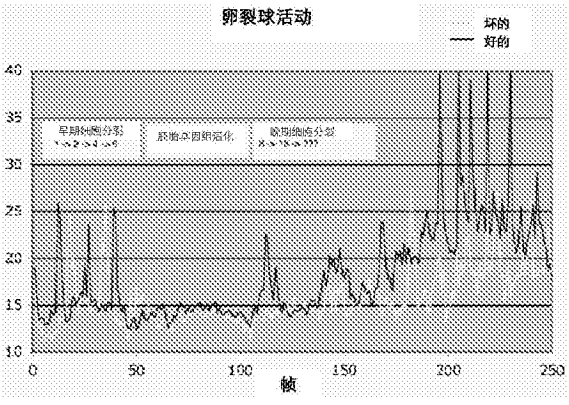
权利要求书1页 说明书19页 附图9页

(54)发明名称

基于卵裂球分裂和运动的胚胎质量评估

(57)摘要

本发明涉及测定胚胎质量的系统和方法,其包括监测胚胎一段时间期间,所述时间期间的长度足以包括至少一个细胞分裂期和至少一部分分裂间期,以及测定所述至少一个细胞分裂期的长度;和/或ii)测定在细胞分裂期内细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布;和/或iii)测定分裂间期的持续时间;和/或iv)测定在分裂间期内细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布,从而获得胚胎质量测量。因此,基于所观察到的细胞分裂以及伴随的细胞和细胞器运动的计时、持续时间、空间分布以及程度,可促进对体外受精(IVF)后被植入的最佳胚胎的选择。



CN 103074410 B

1.用于测定胚胎质量以选择适于移植的胚胎的方法,其包括

—监测多个胚胎一段时间,所述时间的长度足以包括至少一部分分裂间期,并测定

• 细胞分裂间期的长度,和

—利用上述细胞分裂参数来确定胚胎质量测量,其中

• 基本上同步的细胞分裂是高胚胎质量的指示,其中所述基本上同步的细胞分裂为从2细胞期到4细胞期或从4细胞期到8细胞期,和

—选择具有最高胚胎质量测量的一个或多个胚胎。

2.根据权利要求1所述的方法,其中胚胎被监测包括至少两个分裂间期的时间。

3.根据权利要求2所述的方法,其中各分裂间期的长度被测定。

4.根据权利要求1-3任一项所述的方法,其中基本上不同步的细胞分裂是低胚胎质量的指示。

5.根据权利要求1-3任一项所述的方法,其中通过缩时显微镜设备监测胚胎。

6.根据权利要求1-3任一项所述的方法,其中通过分析缩时显微镜设备采集的缩时图像系列测定细胞分裂期的持续时间和分裂间期的持续时间。

7.根据权利要求1-3任一项所述的方法,其中在培养放置在培养基中的所述胚胎期间监测胚胎。

8.根据权利要求1-3任一项所述的方法,其中胚胎是人胚胎。

9.一种用于选择适于移植的胚胎的方法,所述方法包括根据权利要求1-8中任一项所定义监测胚胎,获得胚胎质量测量,并选择具有最高胚胎质量测量的胚胎。

基于卵裂球分裂和运动的胚胎质量评估

[0001] 本申请是申请日为2007年6月15日、发明名称为“基于卵裂球分裂和运动的胚胎质量评估”的中国专利申请号200780027901.8的分案申请。

技术领域

[0002] 本发明涉及基于所观察的细胞分裂以及伴随的细胞和细胞器运动的计时、持续时间、空间分布和程度，选择用于体外受精的胚胎的方法和系统。

背景技术

[0003] 不育症影响全球8千多万人。据估计，10％的夫妇患有原发性或继发性不育症(Vayena等，2001)。体外受精(IVF)是一种有效的内科疗法，其可以提供给以其他方式不能具有怀孕机会的夫妇。这是一种将卵(卵母细胞)从女性卵巢中取出然后在实验室与精子受精的过程。在该过程中所创造的胚然后被放置到潜在植入的子宫内。为避免多胎妊娠和多胞胎，仅仅移植几个胚胎(通常少于四个并且理想地仅为一个(Bhattacharya等，2004))。选择用于移植的适当胚胎在任何IVF处理中是关键的步骤。目前的选择程序大部分完全基于在发育过程的不同时间点处对胚胎的形态学评价，特别是在移植时利用标准立体显微镜进行的评价。然而，广泛认识到，该评价过程需要定性的以及定量的改进。

[0004] 早期细胞分裂。一种有前景的新方法是利用′早期分裂′至2-细胞期(即在授精/注射后25-27h之前)作为质量指示。在该方法中，在受精后25-27小时视觉观察胚胎，以确定是否第一细胞分裂已经完成。几项研究证明，在个体胚胎的早期卵裂以及随后的发育潜能之间存在强的关联(Shoukir等，1997；Sakkas等，1998，2001；Bos-Mikich等，2001；Lundin等，2001；Petersen等，2001；Fenwick等，2002；Neuber等，2003；Salumets等，2003；Windt等，2004)。几位观察者已经指出需要更频繁的观察。然而，频繁的视觉观察由于伴随从温育器转移至倒置显微镜，引起可能阻碍或者甚至使胚胎发育停止的生理应激。其也是耗时的并且难以并入IVF临床的日常工作中。

[0005] 几位研究者已经在胚胎发育过程中进行了缩时图像采集。这主要通过将研究用显微镜放置在温育器内部或者将“温育器载物台(stage)”构建到具有自动图像采集的显微镜镜台上来进行。“温育器”保持可接受的温度(37℃)、湿度(＞90％)和气体组成(5％CO2和在一些情况下减少的氧浓度)。缩时图像的手动评估已经产生了关于定时以及连续细胞分裂起始之间的时间间隔的重要信息(Grisart等，1994，Holm等，1998，Majerus等，2000，Holm等，2002，Holm等，2003，Lequarre等，2003，Motosugi等，2005)。

[0006] 在申请中或在本申请中所引用的所有专利和非专利参考文献因此也通过参考以其全部并入。

发明内容

[0007] 本发明涉及基于所观察到的细胞分裂以及伴随的细胞和细胞器运动的计时、持续时间、空间分布以及程度，有助于选择体外受精(IVF)后所植入的最佳胚胎的方法和系统。

[0008] 因此，在第一方面，本发明涉及用于测定胚胎质量的方法，其包括监测胚胎一段时间期间，所述时间期间的长度足以包括至少一个细胞分裂期和至少一部分分裂间期(inter-division period)，以及测定：i)所述至少一个细胞分裂期的持续时间；和/或ii)测定在细胞分裂期内细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布；和/或iii)测定分裂间期的持续时间；和/或iv)测定在分裂间期内细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布，从而获得胚胎质量测量。

[0009] 所得到的胚胎质量测量然后可以被用于鉴定和选择适于移植到女性子宫中的胚胎以便提供妊娠和活产婴儿。

[0010] 因此，在进一步的方面，本发明涉及选择适合用于移植的胚胎的方法，所述方法包括如上述定义监测胚胎，获得胚胎质量测量，并选择具有最高胚胎质量测量的胚胎。

[0011] 在进一步的方面，本发明涉及系统，该系统具有实施上述方法的装置。所述系统可以是任何合适的系统，诸如包括计算机代码部分的计算机，该计算机构成执行上述方法的装置。所述系统可以进一步包括用于在不同时间间隔下获取胚胎图像的装置，诸如在于2006年10月16日提交的名称为“细胞群变化之测定(Determination of a change in a cell population)”的在审PCT申请中所述的系统。

[0012] 在又一方面，本发明涉及数据载体，该数据载体包括计算机代码部分，所述数据载体构成用于执行上述方法的装置。

附图说明

[0013] 图1：两个代表性牛胚胎的卵裂球活动。“好的”发育成孵化的胚泡。“坏的”从不发育成胚泡。

[0014] 图2：41个牛胚胎的卵裂球活动。卵裂球活动以假-凝胶-图像显示，其中活动峰由黑色条带表示，无活动是白色的，每个泳道对应单个胚胎。黑色带型图案或拖尾反应胚胎内细胞活动的期间。“好的”胚胎发育成上面所示的胚泡，“坏的”胚胎不发育成胚泡期。对于好的胚胎观察到更清晰的初始条带(通常为三个)。

[0015] 图3：13个代表性牛胚胎的卵裂球活动。“好”胚胎发育成由绿色曲线表示的孵化胚泡。“坏的”胚胎从不发育成以红色显示的胚泡。X-轴是帧数，y-轴是卵裂球活动。图像采集始于受精后24小时并以2帧/小时进行。通过向卵裂球活动值添加30，绿色曲线已经在y-轴上被移位。

[0016] 图4：所有获得帧的平均卵裂球活动(亮区＝高卵裂球活动，暗区＝低卵裂球活动)。

[0017] 图5：21个牛胚胎的卵裂球活动，其不发育成高质量胚泡。用于划分卵裂球活动模式的三个曲线部分被标明。

[0018] 图6：18个牛胚胎的卵裂球活动，其不发育成高质量胚泡。用于划分卵裂球活动模式的三个曲线部分被标明。

[0019] 图7：13个代表性胚胎的手动检测与自动检测的细胞分裂之间的关联性。大约10％的细胞分裂通过该算法未被检测到，但是其它的对应性是优良的。

[0020] 图8：好和坏胚胎的手动检测的细胞分裂。

[0021] 图9：衍生参数的估计。右上角中的图显示作为帧数函数的原始卵裂球活动。绿色

和蓝色直线分别表示第二和第三时间间隔的开始。在右下角中的图显示如上所述的衍生参数。垂直的红线分别表示峰或谷内最高或最低活动值的时间和值。

[0022] 图10:来自94个胚胎的卵裂球活动分析的衍生参数(见上图)。发育成质量好的扩张胚细胞的胚胎以红色显示(好实例),不发育成质量好的扩张胚细胞的胚胎以蓝色显示(坏实例)。

[0023] 图11:前五个PCA轴的PCA绘图。红色点是具有好质量的胚胎,而蓝色是具有坏质量的胚胎。

[0024] 图12:94个不同胚胎在时段3(即受精后76至96小时)的卵裂球活动基线值。该等级是给定的牛胚胎在温育7天后的卵裂球质量量度。等级1胚胎品质最佳并且具有比等级5显著更高的基线值,等级5是最低的品质并且经常是闭锁的(attretic)。

具体实施方式

[0025] 定义

[0026] 细胞分裂期:从在细胞膜中第一次观察到凹入(表明胞质分裂开始)到胞质细胞分裂完成使得随后的子细胞的细胞质被分离成两个个体细胞的时间期间。

[0027] 分裂间期(Inter-division period):从一个细胞分裂期结束到随后的细胞分裂期开始的时间期间。

[0028] 分裂周期:在连续细胞分裂开始之间的时间间隔,即从一个细胞分裂期开始到随后的细胞分裂开始。

[0029] 细胞位置的重排=细胞运动(见下述)。

[0030] 细胞运动:细胞中心以及外部细胞膜的运动。细胞器在细胞内的内部运动不是细胞运动。外部细胞膜是动态结构,因此细胞界限将连续轻微地改变位置。然而,这些轻微的变动不被认为是细胞运动。细胞运动是指细胞的重心及其位置相对于其他细胞改变以及指细胞分裂。细胞运动可以通过计算运动细胞的两个连续数字图像之间的差异来量化。此类量化的实例详细描述在于2006年10月16日提交的名称为“细胞群变化之测定”的在审PCT中。然而,测定细胞重心和/或细胞质膜位置运动的其他方法可以通过例如利用FertiMorph软件(丹麦哥本哈根的ImageHouse Medical)以便半自动描绘在通过胚胎的连续光学狭样区中每一卵裂球的界限来预见。

[0031] 细胞器运动:可以通过显微镜观察胚胎内的内部细胞器以及细胞器膜的运动。在本申请的上下文中细胞器运动不是细胞运动。

[0032] 运动:物体的空间重排。运动通过很多不同参数来表征和/或量化和/或描述,所述参数包括但不限于:运动的程度、运动中所涉及的面积和/或体积、旋转、平移向量、运动的方向、运动的速度、大小调整(resizing)、膨胀/收缩等。细胞或细胞器运动的不同量度因此可以被用于不同的目的,一些目的反映出运动的程度或强度,一些反映出运动物体的空间分布,一些反映出运动所经历的轨迹或体积。

[0033] 胚胎:在一些情况中术语“胚胎”被用于描述在受精后八周变成胎儿前移植入子宫后的受精卵母细胞。根据该定义,受精的卵母细胞在进行移植前通常被称为胚前期(pre-embryo)。然而,贯穿该专利申请,我们将使用更宽的术语胚胎定义,其包括胚前期阶段。因此其包括从卵母细胞受精到桑葚胚、胚泡期孵化和植入的所有发育阶段。

[0034] 胚胎质量是所述胚胎在转移之后在子宫中成功植入和发育的能力的量度。高质量的胚胎在转移后将在子宫中成功植入和发育，而低质量胚胎将不会。

[0035] 胚胎成活力是所述胚胎在转移后在子宫内成功植入和发育的能力的量度。高成活力的胚胎在转移后将在子宫内成功植入和发育，而低成活力的胚胎将不会。成活力和质量在本文中被互换使用。

[0036] 胚胎质量(或成活力)测量是意欲反映胚胎质量(或成活力)的参数，以便具有高质量参数值的胚胎具有高的概率成为高质量(或成活力)的胚胎，以及具有低的概率成为低质量(或成活力)的胚胎。然而具有相关的低质量(或成活力)参数值的胚胎仅具有具备高质量(或成活力)胚胎的低概率以及具有成为低质量(或成活力)胚胎的高概率。

[0037] 胚胎

[0038] 胚胎近似球形并且由一个或多个由明胶样外壳包围的细胞(卵裂球)组成，无细胞的基质被称为透明带。透明带执行多种功能，直到胚胎孵化为止，并且透明带是用于胚胎评价的好标志。该带是球状且半透明的，并且应当清晰地区别于细胞碎片。

[0039] 当通过精细胞(精子)的融合或注射而使卵母细胞受精时，形成胚胎。该术语传统也用于孵化后(即透明带的破裂)和随后的植入。对于人类而言，受精的卵母细胞在前八周传统上被称为胚胎。之后(即在八周之后，以及当所有主要器官已经被形成时)其被称为胎儿。然而，胚胎与胎儿之间的差别通常未被充分限定。

[0040] 在胚胎发育期，卵裂球数目几何增加(1-2-4-8-16-等)。同步的细胞分裂通常被保持到胚胎中的16-细胞期。之后，细胞分裂变成不同步的，并且最终个体细胞拥有它们自己的细胞周期。对于牛胚胎：组成胚胎的卵裂球在16-细胞期成为球形细胞前应当是容易识别的，。在大约32-细胞期(桑葚胚期)，胚胎经历压缩(compaction)，因为当黏着蛋白被表达时发生细胞间粘附。结果是，经过该阶段后，难于评价胚胎中的个体细胞的数目。对于人胚胎，压缩发生地稍微更早，并且在16细胞期，个体卵裂球不易识别。在不育症治疗中所产生的人胚胎通常在桑葚胚期前被转移至受体，而其他哺乳动物胚胎在转移至受体或排出之前通常被实验培养到进一步的发育阶段(扩张胚泡)。在一些情况中，人胚胎在移植之前也被培养到胚泡期，在有很多好质量胚胎或者需要长时间的温育来等待植入前遗传诊断(PGD)的结果时，这种情况被优选地进行。因此，术语胚胎被用来表示以下的各个阶段——受精卵母细胞、受精卵(zygote)、2-细胞、4-细胞、8-细胞、16-细胞、桑葚胚、胚泡、扩张胚泡和孵化胚泡，以及位于其间的所有阶段(例如3-细胞或5-细胞)。

[0041] 质量测定

[0042] 基于一种或多种胚胎的测定，本发明提供胚胎质量测量[见上述胚胎质量测量的定义]，诸如：i)至少一个细胞分裂期的持续时间；和/或ii)测定在细胞分裂期期间细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布；和/或iii)测定分裂间期的持续时间；和/或iv)测定分裂间期期间细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布，从而获得胚胎质量测量。

[0043] 本发明依赖于这样的观察：除每一细胞分裂前后短的时间间隔，细胞位置在细胞分裂之间通常是相对固定的(即很少的细胞运动)，此时一个细胞分裂成两个，导致分裂细胞以及周围细胞的短暂但是相当大的重排(即显著的细胞运动)。

[0044] 本发明的特定用途是评价发育中的胚胎的图像系列(缩时图像)。这些缩时图像可以通过差分成像来分析(见于2006年10月16日提交的名称为“细胞群变化之测定”的在审

PCT申请)。得到的差分图像可以用于量化在图像系列中连续帧之间发生的变化量。

[0045] 本发明可以被应用于差分图像数据的分析,其中作为细胞运动结果的细胞界限改变的位置(即细胞膜)使得衍生自该差分图像的一系列参数暂时增加(见于2006年10月16日提交的名称为"细胞群变化之测定"的在审PCT申请)。这些参数包括(但不限于)平均绝对强度或方差的增加。细胞分裂及其持续时间以及相关的细胞重排因此能够通过差分图像中所有像素的标准偏差上的暂时变化——即增加或减少,或者通过在于2006年10月16日提交的名称为"细胞群变化之测定"的在审PCT申请中所列举的"卵裂球活动"的任何其他衍生参数进行检测。然而,所述选择标准也可以被用于视觉观察和分析缩时图像以及与胚胎发育有关的其他暂时分辨的数据(例如代谢产物的排泄或摄取,物理或化学外观变化,衍射,散射,吸收等)——这些数据如在2006年10月16日提交的名称为"细胞群变化之测定"的在审PCT申请所定义,与卵裂球活动无关。

[0046] 特别感兴趣的是细胞分裂的开始、强度和持续时间,它们在衍生参数值中可以被量化为波峰或波谷。这些极限——波峰或波谷——通常表示细胞分裂事件。这些事件的定时和持续时间以及在这些事件过程中以及之间所观察到的参数值用来表征胚胎以及评价其发育潜能。和通常峰的大小一样,每个峰的形状也提供另外的信息。峰也可以表示卵裂球的突然崩溃以及同时发生的细胞死亡。然而,通过事件前后峰形状以及基线值的变化区分细胞分裂与细胞死亡事件也是可能的。大多数参数的基线通常不受细胞分裂的影响,而细胞溶解通常伴随着基线值的显著变化(对于大多数参数,溶解后减小)。

[0047] 另一特别感兴趣的是细胞和细胞器运动的空间分布。缺乏运动的透明带内的体积(或类似地,保持静止的胚胎投影2D图像中的面积)表示胚胎内的"死亡"区。这些不能动的"死亡"区越多越大,成功胚胎发育的可能性越低。在缩时系列胚胎图像内缺乏任何类型运动(即既无细胞运动也无细胞器运动)的大片面积表明低的成活力。细胞器运动通常应当在整个胚胎中是可检测的,即使当仅比较两个或几个连续的帧时也是如此。细胞运动可以更集中在特别是胚胎发育的后期中,然而,当评价很多连续的帧时,细胞运动应当在透明带内在整个体积内是可检测的,这表明胚胎内所有卵裂球都分裂并改变位置。

[0048] 因此,胚胎质量测量包括关于在至少一个细胞分裂和/或一个分裂间期的至少一部分期间细胞和细胞器运动的信息,诸如:i)所述至少一个细胞分裂期的持续时间;和/或ii)测定在细胞分裂期内细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布;和/或iii)测定分裂间期的持续时间;和/或iv)测定在分裂间期内细胞或细胞器运动的程度和/或空间分布。在优选的实施方式中,胚胎质量测量包括本文所述的两个或多个测定信息,诸如三个或多个本文所述的测定。在更优选的实施方式中,胚胎质量测量包括本文所述的所有测定的信息。具体而言,胚胎质量测量包括关于细胞分裂期长度和分裂间期长度的信息,或者胚胎质量测量包括关于细胞分裂期中的运动以及分裂间期中的运动方面的信息。在另一实施方式中,胚胎质量测量包括关于期间的长度以及在该相同期间内的运动方面的信息。

[0049] 胚胎质量测量基于下面的观察:

[0050] a)突然的细胞分裂——其中真正的细胞质分裂进展迅速并且随后发生的其他卵裂球位置的重排也迅速发生(例如,尖的卵裂球活动峰),预示着高质量的胚胎。延长的胞质分裂持续时间以及其他卵裂球随后广泛的空间重排(即细胞运动)表示胚胎质量差(例如宽的卵裂球活动峰)。(实施例1)

[0051] b)细胞分裂之间很少的卵裂球位置重排表示高质量胚胎，而可见的细胞分裂之间的运动经常表示胚胎质量差。(实施例1)

[0052] c)细胞分裂之间延长的细胞位置重排(例如宽的卵裂球活动峰)通常与差的胚胎质量、不同步的细胞分裂和大量断裂有关。(实施例1)

[0053] d)当胚胎基因组被活化并且蛋白质合成从母体转向胚胎转录时，对于大多数哺乳动物而言，观察到非常少的细胞运动的静息期间。如果该期间具有：i)早期开始，ii)非常低的活动(＝很少的细胞运动＝静息的)，和iii)早期终止，则其是高质量胚胎的强有力的象征。在坏胚胎中静息期间的开始经常被延迟，并且有时被细胞运动中断。坏胚胎也可以在“静息”期具有升高的细胞运动基线水平，而无可检测的细胞分裂。(实施例2)

[0054] e)在随后停止发育的劣质胚胎中，经常观察到特定的且始终不移动的区域，其持续不变并最终导致发育停止。此类不移动的区域可与大量断裂或卵裂球死亡和溶解有关。如果这些区域在给定的发育期大于给定的百分比，则胚胎具有非常低的存活可能性。在高质量胚胎中，在每一胞质分裂事件之后很快发生的细胞活动最初分布在整个胚胎表面上(即所有的卵裂球轻微移动)，仅在桑葚胚期的压缩之后观察到局部运动(实施例3)。

[0055] f)细胞器运动的均匀空间分布通常发现于有活力的高质量胚胎中；而缺乏活动的“死亡”区通常发现于低质量胚胎中。已经对细胞运动进行了类似的观察，但是在较长时间-窗口期间进行的观察是测定细胞运动的空间均匀性所必需的(实施例3)。

[0056] g)在不同时间间隔中细胞运动的量是胚胎质量的优良指标。质量相关的参数可以从不同时间段中的平均运动的比率和/或不同时间段中标准偏差的比率计算。胚胎选择程序可以基于这些参数的值来建立(实施例4)。

[0057] h)细胞运动和细胞器运动的基线水平逐渐或突然的减小通常与低胚胎质量和发育停止的高度可能性相关。基线水平的变化可与不活动区/区域的出现相关(见上述(e)和(f))。(实施例6)

[0058] i)首次细胞分裂的早期开始是高胚胎质量的象征。首次(和随后细胞分裂)的晚期开始表示低质量胚胎。然而，对于大多数胚胎而言，单独首次细胞分裂的确切开始不提供明确的胚胎质量指示(实施例4)。

[0059] j)对于描述细胞和细胞器运动的大部分衍生参数，可以定义正常范围，使得在该正常范围之外的值(例如异常高的或异常低的)都表明坏的胚胎质量(实施例6)。

[0060] k)连续的细胞分裂之间的间隔是胚胎成活力的重要(以及种类特异的)指标，一个实例是1→2和2→4细胞分裂之间的间隔的比率与2→4和4→8细胞分裂之间的间隔之间的比率。这些间隔的比率应当在活胚胎的给定范围内。

[0061] I)在后期(例如2→4，4→8)的同步进行的细胞分裂主要发现于高质量胚胎中，而对于低质量胚胎经常观察到不同步的细胞分裂(例如2→3→4→5→6→7→8)(实施例1)。

[0062] 下面的测定产生最高的胚胎质量测量：

[0063] • 短的细胞分裂期，其中短的被定义为小于2小时。

[0064] • 在分裂间期很少的细胞运动，其中很少的被定义为视觉上不存在超出常规的振荡和细胞器运动的细胞位置变化，所述常规的振荡和细胞器运动总是促成差分图像。很少的细胞运动暗示细胞的重心是固定的(运动＜3μm)并且细胞质膜很大程度上是不移动的(＜3μm)。

[0065] • 首次细胞分裂期的早期开始，即对于人胚胎而言，在受精后25小时之前(对于牛胚胎而言，在受精后30小时之前)。

[0066] • 在分裂间期中短的细胞运动期，其中短的被定义为小于3小时。

[0067] • 在透明带内细胞运动随时间均匀的分布，即不存在在较长时间期间内未观察到细胞运动(即＞24小时)的胚胎的不活动区域/区/体积。此类不移动的区域可能是由于死亡的或濒死的卵裂球和碎片，其可阻碍进一步的发育。

[0068] • 细胞运动的基线值持续的轻微的增加。

[0069] • 所有衍生参数在特定胚胎的正常范围内。

[0070] 胚胎质量测量越接近最高质量测量，胚胎的质量越高。

[0071] 神经网络或者其他定量模式识别算法可以用于评价上述复杂的细胞运动模式。此类网络可以用来发现最佳质量的胚胎用于IVF治疗中的移植。实施例6描述了在胚胎发育期间从“卵裂球活动”(见于2006年10月16日提交的名称为“细胞群变化之测定”的在审PCT申请)获得的胚胎发育的关键参数，并随后利用不同的数学模型(线性，主成分分析，Markov模型等)评价所述衍生参数。

[0072] 其他测量

[0073] 最终的分析步骤可以包括比较所进行的观察与不同质量和发育能力的胚胎的类似观察，以及比较给定胚胎的参数值与在同一胚胎上进行的其他定量测量。这可以包括与在线测量诸如卵裂球运动性、呼吸率、氨基酸摄取等的比较。卵裂球活动性分析、呼吸率以及其他定量参数的结合数据组有可能改进胚胎选择并使胚胎学家能够可靠地选择用于移植的最佳胚胎。

[0074] 因此，在一个实施方式中，根据本发明的方法可以结合其他测量，以便评价正在讨论的胚胎，并且可以用于选择用于移植至受体的有能力的胚胎。

[0075] 此类其他测量可以选自呼吸率、氨基酸摄取、运动性分析、卵裂球活动、形态、卵裂球大小、卵裂球粒化(blastomere granulation)、断裂、卵裂球颜色、极体定向、核化、纺锤体形成和完整性以及很多其他定量测量。呼吸测量可以如在PCT公布号WO2004/056265中所述进行。

[0076] 培养基

[0077] 在优选的实施方式中，在细胞群培养的过程中进行观察，诸如其中细胞群被放置在培养基中。培养细胞群的方法在本领域是已知的。培养胚胎的实例描述在PCT公布号WO2004/056265中。

[0078] 数据载体

[0079] 本发明进一步涉及数据载体，其包含直接可装载在数字处理设备的存储器中的计算机程序以及包含构成用于执行如上所述的本发明方法的装置的计算机代码部分。

[0080] 数据载体可以是磁盘或光盘或者可以是EEPROM或Flash类型的电子卡的形状，并且被设计成装载到现有的数字处理装置中。

[0081] 胚胎的选择或鉴定

[0082] 本发明进一步提供选择用于移植的胚胎的方法。该方法暗示已经如上所述对胚胎进行监测，以测定胚胎中的变化，以便测定细胞分裂何时发生以及任选测定是否已经发生细胞死亡以及测定细胞分裂的质量和胚胎的总体质量。优选选择具有基本同步的细胞分

裂、产生差分图像的清晰衍生参数的胚胎，以及更优选选择无细胞死亡的胚胎。

[0083] 选择或鉴定方法可以结合如上所述的其他方法，以便评价胚胎的质量。胚胎的形态学评价的重要标准是：(1)胚胎的形状，包括卵裂球的数目和断裂的程度；(2)透明带的存在和质量；(3)大小；(4)颜色和结构；(5)对与胚胎发育期有关的胚胎年龄的了解；和(6)卵裂球膜完整性。

[0084] 移植然后可以通过本领域技术人员已知的任何合适的方法进行。

[0085] 实施例1

[0086] 材料和方法.从得自屠宰场的卵巢抽取牛未成熟卵丘-卵母细胞复合体(COCs)，选择并在四孔皿中成熟24h(Nunc，Roskilde，丹麦)。每孔含有400μL的碳酸氢盐缓冲的TCM-199培养基(Gibco BRL，Paisley，UK)，该培养基补充以15％牛血清(CS；Danish Veterinary Institute，Frederiksberg，丹麦)、10IU/mL eCG和5IU/mL hCG(Suigonan Vet；Intervet Scandinavia，Skovlunde，丹麦)。使胚胎在38.5℃在5％CO2于增湿空气中在矿物油下成熟。利用冻融的Percoll-选择精子在改良的Tyrode′s培养基中进行受精。

[0087] 在22h后，通过涡旋去除卵丘细胞，并将假定的受精卵转移至400μl培养基——该培养基由含有氨基酸、柠檬酸和肌醇(SOFaaci)并补充抗生素(硫酸庆大霉素，10mg/ml)的合成的输卵管液体和5％CS组成——中，并在38.5℃下于具有最大湿度的5％CO2、5％O2、90％N2气体下温育。

[0088] 温育器系统已经在以前予以详细地描述，并且已经证明适于体外胚胎培养(Holm等，1998)。简言之，将4-孔培养皿放置在倒置Nikon TMD显微镜(Diaphot，DFAA/S，哥本哈根，丹麦)的显微镜镜台上(MultiControl2000扫描台，Marzhauser，德国)。通过空气温度控制器(Air-Therm™，World Precision Instruments，Aston，UK)调节的黑色有机玻璃温育箱围绕镜台固定。具有开放底部的塑料盖被放在培养皿上，并将已经经过放置在温育器箱内部的洗气瓶之后的增湿的气体混合物导入该半封闭培养室中。

[0089] 该培养箱先前已经证明可用于体外胚胎培养(Holm等，1998，2003)，其提供稳定的温度和湿度条件。在试验期间我们每周例行的体外胚胎生产用作该基本培养系统完整性的对照。

[0090] 照相机系统.缩时记录通过图像分析软件(ImagePro™，Unit One，Birkerød，丹麦)指挥，该图像分析软件控制扫描台在x-轴、y-轴和z-轴的运动、所连接的高度光敏录像摄像机的操作(WAT-902H，Watec，DFAA/S，Copenhagen，丹麦)以及缩时顺序在计算机硬盘上的记录和存储。在整个7天的培育期内每个胚胎的缩时图像(总放大率：x265)在30分钟间隔下以最小光顺序进行记录。在记录之间，胚胎被移出光场。

[0091] 手动分析缩时图像系列由记录首次出现下列卵裂/胚胎阶段——2-细胞、4-细胞、8-细胞、16-细胞——的时间和具有可见的相干细胞群和桑葚胚的时间：最大的致密桑葚胚，胚泡的第一扩张，胚泡的崩溃以及胚泡的孵化组成。

[0092] 基于自动化计算机的分析由计算差分图像的标准偏差组成，该标准偏差计算为两个连续帧之间的差异。为避免校准的人为产物以及其他问题，使用下面的详细步骤：

[0093] 1)图像采集。(见上述)。

[0094] 2)通过从序列中的每个图像中扣除人为产物的散焦参考图像，去除固定位置的人为产物(照相机灰尘)。

[0095] 3)移位以补偿不精确的镜台运动(stage movement)。非常简单的校准图像的方法是比较原始差分图像与在给定方向移动原始图像之一后以单像素计算的差分图像。如果改变位置之后计算的差分图像的方差低于原始的差分图像的方差,则改变位置产生改进的校准。通过系统地尝试所有可能的移动方向以及所有相关的移动幅度,能够得到校准的时间序列。然而,在目前的情况下,我们使用由Thevenaz等1998开发的高级ImageJ macro进行图像校准。

[0096] 4)鉴定感兴趣区(ROI)和外部参考区域。由于布朗运动排列问题等,比较胚胎内的细胞运动与胚胎外的"运动"是有利的。这是通过描绘胚胎并比较胚胎内的差分图像与胚胎外类似区域中计算的差分完成的。描绘胚胎通常手动完成。参比区域:我们选择无任何胚胎的图像区域。

[0097] 5)计算强度差。

[0098] 6)计算各差分图像的衍生参数。计算几种差分参数,但是证明最有益的参数是差分图像中所有像素的强度标准偏差。该参数在下面被称为"卵裂球活动"。

[0099] 7)鉴定和测定卵裂球活动的峰的形状。

[0100] 8)计算诊断相关时间间隔的卵裂球活动的标准偏差和平均值。见实施例4。

[0101] 试验设计.大约20牛胚胎于Nunc-4孔皿的单孔中一起温育7天,每30分钟采集图像。该试验被重复5次,总计产生99个牛胚胎的缩时图像系列。

[0102] 结果:

[0103] 基于发育胚胎的缩时图像系列的定性评价,(基本通过使它们作为电影演示很多次进行观察并记录变化),我们观察到:高质量胚胎的指标是突然的细胞分裂,其中真正的细胞质分裂进展迅速,并且跟着发生的其他卵裂球位置的重排快速发生,接着为很少细胞位置重排的静息"期间",直到下一次细胞质分裂突然开始。坏胚胎经常在细胞质分裂之后以及胞质细胞分裂之间显示出延长的卵裂球位置重排。为定量和记录这些观察,我们从缩时图像系列计算卵裂球活动,如在上面定义的PCT申请中所述。代表性的卵裂球活动示于图1中。

[0104] 一些观察的活动是由于不同步的细胞分裂(例如2→3→4→5→6→7→8)和断裂,这与所观察的高质量胚胎的同步细胞分裂(例如2→4,4→8)相反。

[0105] 41个胚胎卵裂球活动以假-凝胶-图像展示在图2中,其中活动峰以黑带表示,不活动是白色的。

[0106] 实施例2

[0107] 材料和方法.与实施例1相同

[0108] 结果

[0109] 在哺乳动物胚胎中的最初蛋白质合成使用来自卵母细胞的母体mRNA,但是在数次细胞分裂之后,胚胎基因组被激活、转录和翻译。从母体基因组向胚胎基因组的转变在胚胎发育中是关键的步骤。对于牛而言该期间发生在8-细胞期并具有相对长的持续时间,对于人胚胎而言,该转变发生在4至8细胞期的早期并具有较短的持续时间。

[0110] 当胚胎基因组被激活并且蛋白质合成从母体转向胚胎基因时,对于大多数哺乳动物而言,观察到非常少的细胞运动的静息期间。如果该期间具有:i)早期开始,ii)非常低的活动(=很少的细胞运动=静息的),和iii)早期终止,则其是高质量胚胎的强有力的象征。

在坏胚胎中静息期间经常被延迟，并且有时被细胞运动中断。显示13个不同胚胎的卵裂球活动的实例示于图3中。

[0111] 实施例3

[0112] 材料和方法.与实施例1相同

[0113] 结果.在随后停止发育的坏胚胎中，经常观察到特定的且始终不移动的区域，其持续不变并最终导致发育停止。此类不移动的区域可与大量断裂或卵裂球死亡和溶解有关。如果这些区域在给定的发育期大于给定的百分比，则胚胎具有非常低的存活可能性。在高质量胚胎中，在每一胞质分裂事件之后很快跟着发生的细胞活动最初分布在整个胚胎表面上(即所有的卵裂球轻微移动)，仅在桑葚胚期的压缩之后观察到局部运动。

[0114] 发育成胚泡的胚胎诸如图4中的左侧板具有均匀分布的卵裂球活动。不具有均匀分布的卵裂球活动的胚胎诸如图4中的右侧板从不发育成胚泡。

[0115] 实施例4

[0116] 材料和方法.与实施例1相同

[0117] 结果.在不同时间间隔中细胞运动的量是胚胎质量的好指标。质量相关的参数可以从不同时间段中的平均运动的比率和/或不同时间段中标准偏差的比率计算。胚胎选择程序可以基于这些参数的值来建立。不同阶段(＝部分)的实例示于图5和图6上。在这种情况下，部分1是受精之后32至60小时的时间段，部分2是受精之后的60至75小时，部分3是受精之后的75至96小时。

[0118] 基于不同部分中的卵裂球活动和/或卵裂球活动的标准偏差，能够对胚胎进行分类。在此种情况下，我们使用下述选择标准，其基于：• R1＝对于给定胚胎，胚泡活动模式的部分1与部分3中的平均胚泡活动之间的比率

[0119]

表 1 基于不同时间段卵裂球活动的平均值的比例和标准偏差的胚胎选择

部分	时间(h)	帧	部分 2	时间(h)	帧	部分 3	时间(h)	帧
部分 1	32	73		60	129		75	159
	60	129		75	159		96	201

坏胚胎

标准 1	平均	部分 1		16.2	17.0	12.7	15.3	14.7	17.6	21.7	16.7	17.4	15.8	16.2	19.3	15.4	18.9	12.9	15.4	15.4	16.6	16.2	13.8	20.1
	平均	部分 3		13.8	15.5	8.8	14.4	14.4	14.9	15.9	13.7	14.6	11.3	12.3	14.3	12.8	13.5	10.9	12.0	12.2	8.5	13.9	10.5	16.6
	比率 <		1.15	1.17	1.09	1.44	1.07	1.02	1.18	1.37	1.22	1.19	1.41	1.32	1.35	1.20	1.40	1.18	1.28	1.25	1.96	1.17	1.31	1.21
标准 2	StDeV	部分 2		0.655	0.709	1.473	0.628	0.425	1.405	0.579	0.752	0.693	0.99	1.934	1.582	1.06	0.495	0.737	0.498	0.489	1.364	0.671	3.352	0.898
	StDeV	部分 3		3.138	0.983	1.584	1.094	1.377	1.206	2.917	1.157	0.944	1.977	1.354	2.092	1.086	0.581	0.605	1.644	1.703	2.029	2.319	4.546	1.05
	比率 <		0.50	0.209	0.721	0.930	0.574	0.309	1.165	0.198	0.650	0.734	0.500	1.429	0.756	0.976	0.852	1.219	0.303	0.287	0.672	0.289	0.737	0.855
组合				[illegible]	[illegible]	[illegible]	好	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]	[illegible]

好胚胎

标准 1	平均	部分 1		15.6	15.2	15.3	15.9	17.4	15.8	16.0	16.1	16.0	15.6	17.1	14.7	15.6	19.7	19.7	15.8	15.2	16.6
	平均	部分 3		16.3	15.9	15.8	15.9	17.3	15.1	14.8	16.6	14.0	15.6	14.0	15.0	12.1	17.9	17.8	15.3	15.0	14.8
	比率 <		1.15	0.96	0.95	0.97	1.00	1.01	1.05	1.08	0.97	1.14	1.00	1.22	0.98	1.29	1.10	1.11	1.03	1.02	1.12
标准 2	StDeV	部分 2		0.909	0.519	0.444	0.524	0.632	0.75	0.518	0.581	0.699	0.703	0.92	0.79	0.413	0.888	0.909	0.551	0.504	0.473
	StDeV	部分 3		1.824	2.347	2.211	1.544	2.88	2.25	1.328	2.662	1.433	1.536	2.045	2.558	0.677	2.103	3.043	2.075	1.671	1.71
	比率 <		0.50	0.498	0.221	0.201	0.339	0.219	0.333	0.390	0.218	0.488	0.458	0.450	0.309	0.609	0.422	0.299	0.265	0.302	0.277
组合				好	好	好	好	好	好	好	好	好	好	[illegible]	好	[illegible]	好	好	好	好	好

表 1 选择标准的应用基于 R1 =胚泡活动模式的部分 1 与部分 3 中的平均胚泡活动之间的比率。(B) R2 =胚泡活动模式的部分 2 与部分 3 中的胚泡活动标准偏差之间的比率

[0120] • R2＝对于给定胚胎，胚泡活动模式的部分2与部分3中的胚泡活动标准偏差之间的比率

[0121] 如果(R1＜1.15和R2＜0.50),则其是“好的”胚胎,否则其是“坏的”胚胎。利用这些标准,根据其随后如何发育,39个胚胎中所有36个胚胎被正确分类。

[0122] 实施例5

[0123] 材料和方法.与实施例1相同

[0124] 结果.下面图7显示自动与手动测定细胞分裂开始之间的好的一致性。非常早的首次细胞分裂的开始预示高胚胎质量。非常晚的首次(以及随后的细胞分裂)开始表示低质量胚胎。然而,对于大多数胚胎而言,单独首次细胞分裂的确切开始不提供胚胎质量的明确指示,如在下面图7中所示。尽管对于差的胚胎细胞分裂的平均开始被延迟,大的固有标准偏差使得绝对值成为不佳的选择标准,除在极端情况下之外,(例如,在30小时之前的第一次分裂表明好的胚胎)。35小时之后的第一次分裂表明差的胚胎,但是所调查的大多数牛胚胎具有不易被解释的中间分裂时间。

[0125] 实施例6a

[0126] 材料和方法.与实施例1相同

[0127] 结果.典型的时间系列的卵裂球活动由温育过程中每小时数个测量组成(例如,在前2至3天期间——其是诊断上感兴趣的时间窗,对于每个所测量的胚胎为大约150个数据点)。大多数统计方法对分析具有此类高维数的数据具有困难。因此,重要的是通过选取衍生参数找到用于降低维数的有利方法。为实现此种目的,在开始图像采集之后,卵裂球活动被分为三个间隔:0-32、32-52和52-72小时(图8)。在这些间隔的每一个中,利用下面的方法发现三个峰:第一峰是最高的卵裂球活动。第二峰是在第一峰之前或之后至少3.5h的最高卵裂球活动值。第三峰是距第一峰和第二峰至少3.5h的最高活动。从每个峰得到下面的参数:时间,峰值,以及从该峰之前0.5h到该峰之后1.5h的活动值的平均值。另外,两个峰之间的波谷通过最小值、最小值的时间和平均值来描述(有关衍生参数的实例见图9)。如果不同胚胎的衍生参数被归一化为相同的方差和平均值,则对于不会适当发育的胚胎所发现的异常值(即太高或太低)变得显而易见(差的胚胎＝图10中是蓝色的点)。发育良好的胚胎(红色的点)具有较窄范围的值。可以基于上述衍生参数来开发胚胎质量的统计模型。如果已经根据最终发育对每个胚胎进行评价,则存在很多不同的统计方法用于分析衍生参数与最终发育之间的关系。这些方法包括:线性和非线性模型、贝叶斯网络、神经网络、隐马尔科夫模型、最近邻法、主成分分析及其他。下面的图11显示了数据的主成分分析的(PCA)的实例。

[0128] 随着新数据被产生,统计模型可以被评价和/或延伸。为便于此,重要的是发现有利的数据结构和衍生参数集合。

[0129] 甚至非常简单的单独参数的分析诸如参数39＝在第三时间段中的卵裂球活动的基线值(受精后76至96小时)在某种程度上可以挑选出异常的和无活力的胚胎。基于这个单一参数,在72%的准确性下自动选择好质量胚胎因此是可能的。

[0130] 实施例6B

[0131] 材料和方法.与实施例1相同

[0132] 结果.典型的卵裂球活动的时间系列由温育期间每小时几个测量组成(例如,在前2至3天期间——其是诊断上感兴趣的时间窗,对于每个所测量的胚胎为大约150数据点)。大多数统计方法对分析具有此类高维数的数据具有困难。因此,重要的是通过选取衍生参数找到用于降低维数的有利方法。为实现此种目的,在开始图像采集之后,卵裂球活动被分

为三个间隔:0-32、32-52和52-72小时(图8)。选择三个时间间隔来反映牛胚胎的三个发育期。阶段1:从1-细胞到8-细胞的初始细胞分裂。阶段2:静息期,具有相对很少的活动和运动。据认为在此阶段胚胎基因组被激活。在一些胚胎中,静息期在8-细胞水平开始,在其他胚胎中,在16-细胞阶段开始,但是在所有发育的胚胎中,其是一个无细胞分裂的延长期。阶段3:继续细胞分裂,发育成桑葚胚。在该阶段计算单独的卵裂球通常是不可能的,但是缩时图像显示细胞分裂已经重新开始。在这三个反映三个发育期的时间间隔中的每一个中,卵裂球活动中的三个峰利用下面的方法来鉴定:第一峰是最高的卵裂球活动。第二峰是在第一峰之前或之后至少3.5h的最高卵裂球活动值。第三峰是从第一峰和第二峰至少3.5h的最高活动。

[0133] 从每个峰得到下面的参数:发生的时间,峰值,以及从该峰之前0.5h到该峰之后1.5h的活动值的平均值。另外,两个峰之间的波谷通过最小值、最小值的时间和平均值来描述(有关衍生参数的实例见图8)。

[0134] 关于三个阶段中的每一个,我们因此得到下面的参数:

[0135] 1峰1,值

[0136] 2峰1时间

[0137] 3峰1平均

[0138] 4谷1,值

[0139] 5谷1时间

[0140] 6谷1平均

[0141] 7峰2,值

[0142] 8峰2时间

[0143] 9峰2平均

[0144] 10谷2,值

[0145] 11谷2时间

[0146] 12谷2平均

[0147] 13峰3,值

[0148] 14峰3时间

[0149] 15峰3平均

[0150] 另外,我们计算该阶段中的卵裂球活动的平均值和标准偏差:

[0151] 16平均值

[0152] 17StDev

[0153] 我们也利用上述参数中的一些来描述峰形状,其反映出胚胎细胞分裂事件的持续时间或同步性。卵裂球活动中尖锐峰(即迅速同步化的细胞分裂)的特征在于低的峰平均值与峰值之比,然而较高的比率反映出峰平均值与峰值更类似的较宽峰。峰平均值除以峰值将总是<1,值接近1表示宽峰,值接近0表示非常陡的峰。

[0154] 18(峰1平均-平均值)/(峰1,值-平均值)=(P1-P16)/(P3-P16)

[0155] 19(峰2平均-平均值)/(峰2,值-平均值)=(P7-P16)/(P9-P16)

[0156] 20(峰3,平均-平均值)/(峰3,值-平均值)=(P13-P16)/(P15-P16)

[0157] 最后,我们计算第一峰与第二峰之间的时间比以及第二峰与第三峰之间的时间

比。

[0158] 21(峰2,时间-峰1,时间)/(峰3,时间-峰2,时间)=(P8-P2)/(P14-P8)

[0159] 上面所示的21个参数的参数集合被用于快速分析,因为其仅包括可以从第一阶段即孵育32小时得出的信息。

[0160] 小的数据集含有可以被用于将胚胎分类为有活力和无活力的重要信息。然而,如果下面两个时间间隔的数据可得,则对于两个下述阶段可以重复该分析。我们没有计算下述阶段的比率(即形状特征以及峰之间的间隔)但是仅计算了峰和谷(即,15个参数/阶段)。最后,总平均值、总标准偏差(StDev)和总最小值与最大值被包括在下面所示的59个参数的整个参数集合中:

[0161] 总平均值

[0162] 卵裂球活动的总标准偏差

[0163] 卵裂球活动的总最小值

[0164] 卵裂球活动的总最大值

[0165] SEG1平均值

[0166] SEG1StDev

[0167] SEG1峰L值

[0168] SEG1峰1pos

[0169] SEG1峰1平均

[0170] SEG1谷1,值

[0171] SEG1谷1pos

[0172] SEG1谷1平均

[0173] SEG1峰2,值

[0174] SEG1峰2pos

[0175] SEG1峰2平均

[0176] SEG1谷2,值

[0177] SEG1谷2pos

[0178] SEG1谷2平均

[0179] SEG1峰3,值

[0180] SEG1峰3pos

[0181] SEG1峰3平均

[0182] SEG2平均值

[0183] SEG2StDev

[0184] SEG2峰1,值

[0185] SEG2峰1pos

[0186] SEG2峰1平均

[0187] SEG2谷1平均

[0188] SEG2谷1pos

[0189] SEG2谷1平均

[0190] SEG2峰2,值

[0191] SEG2峰2pos

[0192] SEG2峰2平均

[0193] SEG2谷2,值

[0194] SEG2谷2pos

[0195] SEG2谷2平均

[0196] SEG2峰3,值

[0197] SEG2峰3pos

[0198] SEG2峰3平均

[0199] SEG3平均值

[0200] SEG3StDev

[0201] SEG3峰1,值

[0202] SEG3峰1pos

[0203] SEG3峰1平均

[0204] SEG3谷1,值

[0205] SEG3谷1pos

[0206] SEG3谷1平均

[0207] SEG3峰2,值

[0208] SEG3峰2pos

[0209] SEG3峰2平均

[0210] SEG3谷2,值

[0211] SEG3谷2pos

[0212] SEG3谷2平均

[0213] SEG3峰3,值

[0214] SEG3峰3pos

[0215] SEG3峰3平均

[0216] SEG1峰1比率

[0217] SEG1峰2比率

[0218] SEG1峰3比率

[0219] SEG1谷1谷2比率

[0220] 如果不同胚胎的衍生参数值被归一化为相同的方差和平均值,则对于不会适当发育的胚胎而言,异常值的发现(即太高或太低)变得显而易见(差的胚胎=图10中是蓝色的点)。图中的参数与上述顺序相同但是在末尾省略了四个比率参数。发育良好的胚胎(红色的点)具有较窄范围的值。

[0221] 可以基于上述衍生参数来开发胚胎质量的统计模型。如果已经根据最终发育对每个胚胎进行评价,则存在很多不同的统计方法,用于分析衍生参数与最终发育之间的关系。这些方法包括但不限于:线性和非线性模型、贝叶斯网络、神经网络、隐马尔科夫模型、最近邻法、主成分分析及其他。下面的图10显示了数据的主成分分析的(PCA)的实例。

[0222] 线性模型应用的实例示于实施例7中。

[0223] 随着新数据被产生,统计模型可以被评价和/或延伸。为便于此,重要的是发现有

利的数据结构和衍生参数集合。

[0224] 甚至非常简单的单独参数的分析诸如参数39＝在第三时间段中的卵裂球活动的基线值(受精后76至96小时)在某种程度上可以挑选出异常和不存活的胚胎。基于这个单一参数,在72％的准确性下自动选择好质量胚胎因此是可能的。

[0225] 实施例7.基于自动化检测或胚胎学家检测的胚胎选择的比较

[0226] 设计.在恒定的温度、湿度和CO2下培养7天的95个牛胚胎被放置在缩时显微镜中。从受精后24小时至96小时采集图像,每小时两次。评价图像分析程序正确鉴定随后(即7天后)发育成扩张胚泡的38个胚胎的能力,并基于每一胚胎的相同的145个图像,同由受过训练的胚胎学家作出的质量评价进行比较。

[0227] 材料&方法.从得自屠宰场的卵巢抽取牛未成熟卵丘-卵母细胞复合体,在受精24h之前成熟22h。然后去除卵丘细胞,并将假定的受精卵转移并在合成的输卵管液体培养基中培养。在固定到倒置Nikon显微镜镜台上的温育箱内采集缩时图像,该显微镜镜台安装有灵敏摄像机。

[0228] 结果.全自动图像分析程序基于在缩时系列中的连续图像之间观察到的运动产生了细胞卵裂球活动的定量测量。卵裂球活动与细胞分裂之间的关联通过比较缩时图像系列的自动和手动分析进行确认。卵裂球活动中显著的峰被发现与细胞分裂相关。细胞分裂确切的开始和持续时间基于所记录的峰的位置、形状和大小可以被量化。给定胚胎的卵裂球活动模式因此可以被简化为一组对应主峰的峰高度、位置和宽度的关键参数,以及描述峰之间的卵裂球活动水平的类似参数。在简单的线性模型中对于每个胚胎使用了总计55个参数来将胚胎分类为“有活力的”或“无活力的”。在所观察到的胚胎模式的子集上校正模型并在不同的独立子集上进行评价。相同的图像缩时系列由熟练的胚胎学家进行评价,以尝试预测胚胎是否将发育成扩张胚泡。

[0229] 尽管该模型仅仅是具有有限精确度的简单线性模型,应当注意,全自动化的分析在预测哪些胚胎将发育成扩张胚泡方面(出错率:20％,95个错误19个)优于受过训练的胚胎学家(出错率:26％,94个错误24个),而且,自动化分析也具有更少的假阳性(45个中13个＝29％,相对于手动分析(60中23个,38％))。假阳性是据认为具有高活力然而却停止发育并且在7-天观察期内从不达到扩张胚泡期的胚胎。此类胚胎的移植不可能导致妊娠。

[0230] 牛胚胎试验阶段1-3

[0231] 从受精后24小时至96小时每30分钟采集图像

[0232] 在7天＝终点之后评价的结果(N＝94,胚泡率＝40％)

[0233]

结果	手动评价		图像分析	
	好	差	好	差
扩张胚泡	37	1	32	6
停止的发育	23	33	13	44
不正确分类	26％		20％	
假阳性&阴性	38％	3％	29％	12％

[0234] 参考文献

[0235] 文章

[0236] Belien JAM,Baak JPA,Van Diest PJ and Van Ginkel AHM(1997)Counting mitoses by

[0237] image processing in feulgen stained breast cancer sections:The influence of resolution.Cytometry28:135-140

[0238] Bhattacharya S and Templeton A(2004).What is the most relevant standard of success in assisted reproduction?Redefining success in the context of elective single embryo transfer:evidence,intuition and financial reality.Human reproduction page1-4

[0239] Bos-Mikich A,Mattos ALG and Ferrari AN(2001)Early cleavage of human embryos:an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome.Hum Reprod16,2658-2661.

[0240] Curl CL1Harris T1Harris PJ,Allman BE1Bellair CJ,Stewart AG and Delbridge LMD(2004)Quantitative phase microscopy:a new tool for measurement of cell culture growth and confluency in situ.Pflugers Arch-Eur J Physiol448:462-468

[0241] Eccles BA and Klevecz RR(1986)Automatic digital image analysis for identification of mitotic cells in synchronous mammalian cell cultures.Pubmed,anal quant cytol histol8:138-47

[0242] Fenwick J,Platteau P,Mucdoch AP and Herbert M(2002)Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of human preimplantation embryos in vitro.Hum reprod17,407-412

[0243] Grisart B,Massip a and Dessy F(1994)Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium.Pubmed,J.Reprod fertile101(2):257-64

[0244] Haney S.M,Thompson PM,Cloughesy TF,Alger JR and Toga AW(2001)Tfacking tumor growth rates in Patients with Malignant gliomas:A test of two algorithms.AJNR An J Neuroradiol22:73-82

[0245] Christina Hnida(2004)Computer-assisted,multilevel,morphometric analysis of biomarkers of embryonic quality.PhDthesis,University of Copenhagen

[0246] Holm P,Booth PJ and Callesen H(2002)Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo-and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media.Reproduction123:553-565

[0247] Holm P,Booth PJ and Callesen H(2003)Developmental kinetics of bovine nuclear transfer and parthenogenetic embryos.Cloning and stem cell Vol5number2

[0248] Holm P,Shukri NN,Vajta G,Booth P,Bendixen C and Callesen H(1998) Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro produced embryos in relation to their in vitro viability and sex.Theriogenology50:1285-1299

[0249] Lundin K,Bergh C and Harderson T(2001)Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF.Hum Reprod16,2652-2657

[0250] Majerus V,Lequarre AS,Ferguson EM,Kaidi S,Massip A,Dessy F and Donnay I(2000)Characterization of embryos derived from calf oocytes:Kinetics of cleavage,cell

[0251] allocation to Inner cell mass,and trophectoderm and lipid metabolism.Molecular reproduction and development57:346-352

[0252] Motosugi N,Bauer T,Polanski Zbigniew,Solter D and Hiiragi T(2005) Polafity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned.Genes&development19:1081-1092

[0253] Oberholzer M,Ostreicher M,Christen H and Bruhlmann M(1996)Methods in quantitative image analysis.Pubmed,histochem cell boil105:333-55

[0254] Petersen CG,Mauri AL,Ferreira R,Baruffi RLR and Franco Jr JG(2001) .Embryo selection by the first cleavage parameter between25and27hours after ICSl.J Assist Reprod Genet18,209-212

[0255] Sakkas D,Percival G,D′arcy Y,Sharif K and Afnan M(2001)Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the2-cell stage before transfer improves embryo selection.Fertil Steril76,1150-1156

[0256] Sakkas D,Shoukir Y,Chardonnens D,Bianchi PG and Campana A(1998)Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm injection as an indicator ofembryo viability.Hum Reprod13,182-187

[0257] Salumets A,Hyden-Granskog C,Suikkari A-M,Tiitinen A and Tuuri T(2002) The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality.Hum Reprod16,2177-2181

[0258] Shoukir Y,Campana A,Farley T and Sakkas D(1997)Early cleavage of in-vitro fertilized embryos to the2-cell stage:a novel indicator of embryo quality and viability.Hum Reprod12,1531-1536

[0259] Vayena E,Rowe PJ and Griffin PD(2001)Current practices and controversies in assisted reproduction:Report of a meeting on″Medical,Ethical and Social aspects of assisted reproduction″held at WHO headquarters in Geneva,Switzerland.

[0260] Windt M-L,Krueger TF,Coetzee K and Lombard CJ(2004)Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embryos versus slower dividing embryos.Hum Reprod Vol19No5pp1155-1162

[0261] 书籍

[0262] John C Russ(2002;The Image Processing Handbook,CRC press,4′th Edition ISBN:084931142X

[0263] 专利

[0264] Bongiovanni Kevin Paul,Audi Paul Patrick,Fortin Christophers,McPhillips Kenneth(24/02/2005)Automatic target detection and motion analysis form image data.US2005041102

[0265] Cecchi Michael D1Mezezi Monica(24/07/2003)Biological specimen-culturing system and method with onboard specimen development sensors.US2003138942

[0266] Iwasaki Masahiro,Imagawa Taro(28/04/2005)Monitoring device.WO2005039181

[0267] Myers James Carrol(25/06/2004)A method of searching recorded digital video for areas of acf/V/ïy MXA03003268,US6434320(B1)

[0268] Klevecz Robert R.,Eccles Beverly A.(09/02/1988)Method and apparatus for automatic digital image analysis.US4724543

[0269] Tago Akira,Tsuj ii Osamu(18/05/2005)Radiographic image processing method and apparatus.EP1531422.

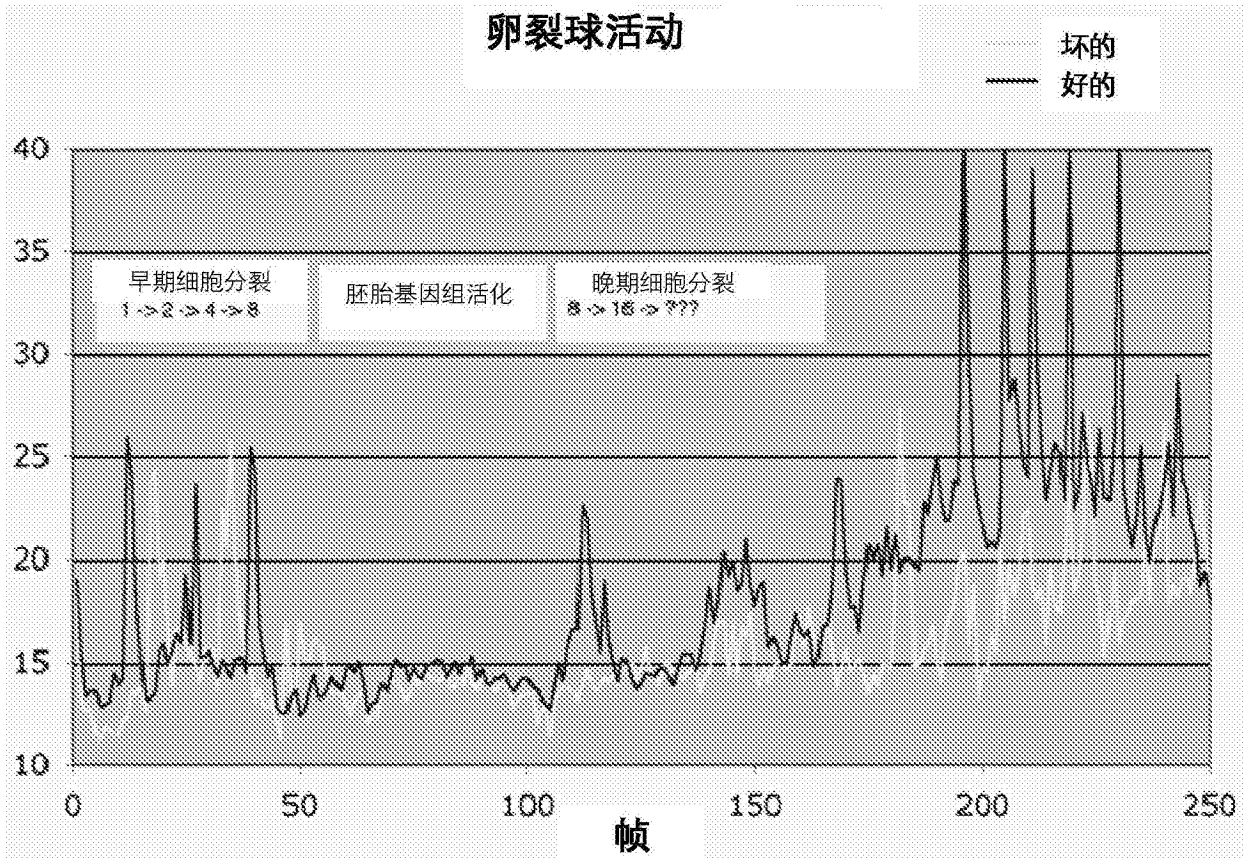

卵裂球活动
坏的
好的
40
35
30
25
20
15
10
早期细胞分裂
1 -> 2 -> 4 -> 8
胚胎基因组活化
晚期细胞分裂
8 -> 16 -> ???
0
50
100
150
200
250
帧

图1

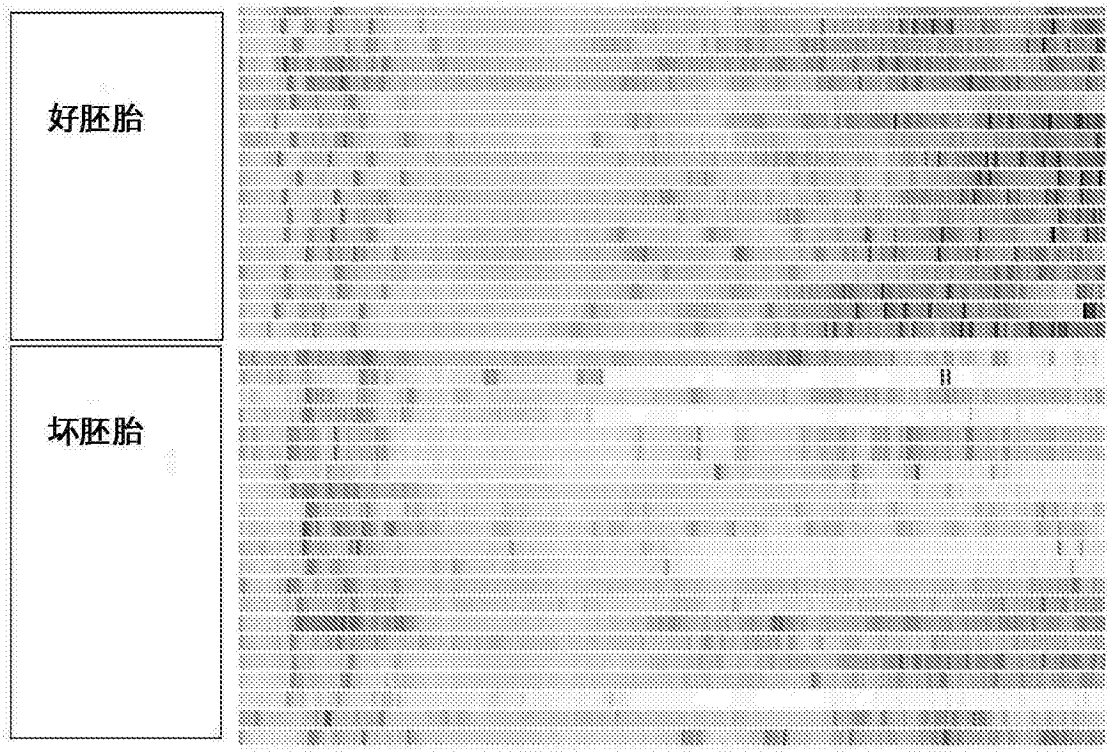

好胚胎
坏胚胎

图2

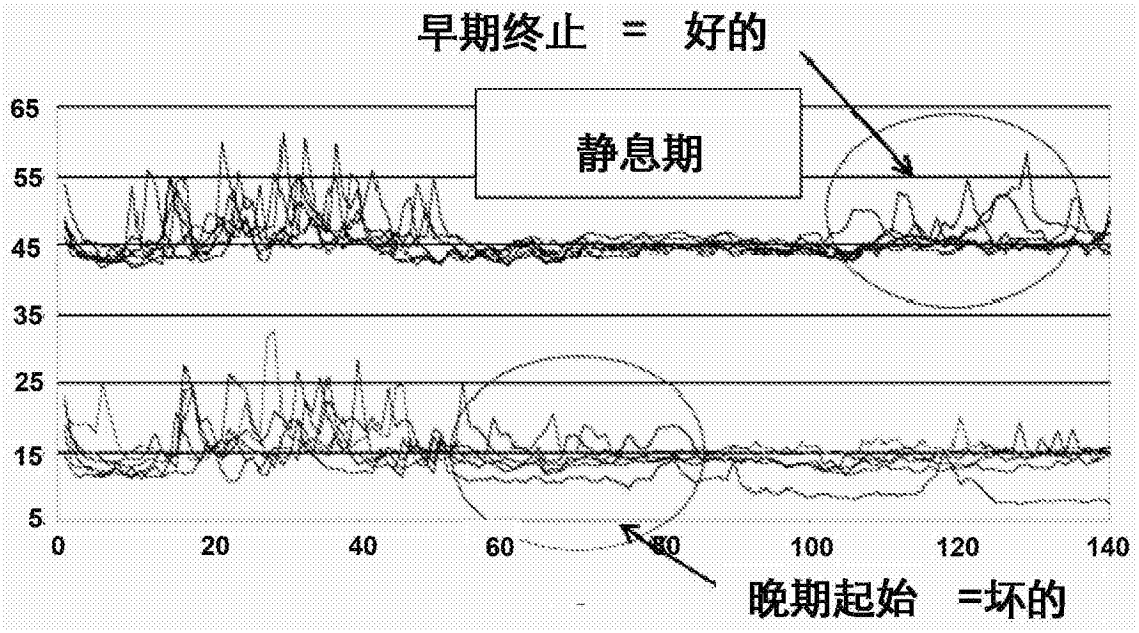

早期终止 = 好的
静息期
65
55
45
35
25
15
5
0
20
40
60
80
100
120
140
晚期起始 =坏的

图3

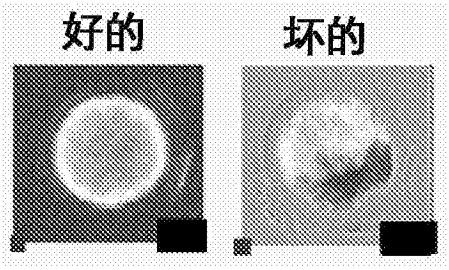

好的
坏的

图4

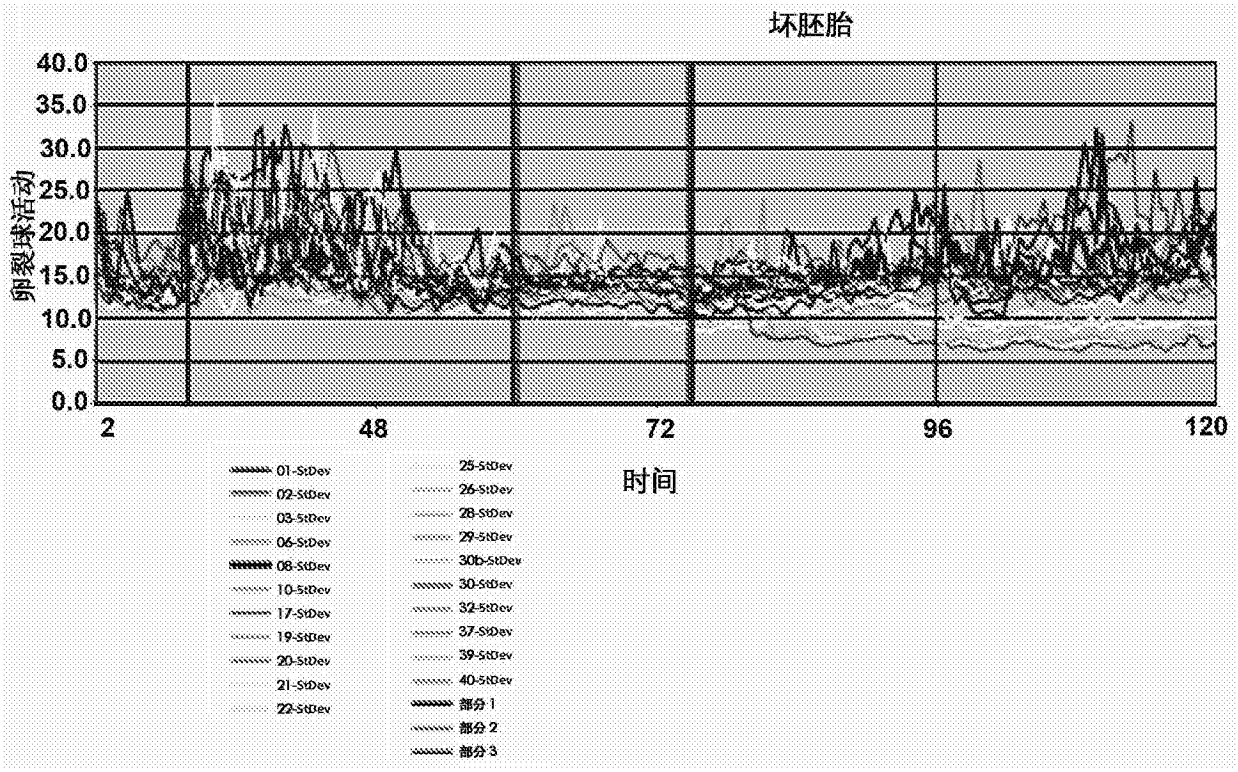

坏胚胎
卵裂球活动
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
2
48
72
96
120
时间
01-StDev
02-StDev
03-StDev
06-StDev
08-StDev
10-StDev
17-StDev
19-StDev
20-StDev
21-StDev
22-StDev
25-StDev
26-StDev
28-StDev
29-StDev
30b-StDev
30-StDev
32-StDev
37-StDev
39-StDev
40-StDev
部分 1
部分 2
部分 3

图5

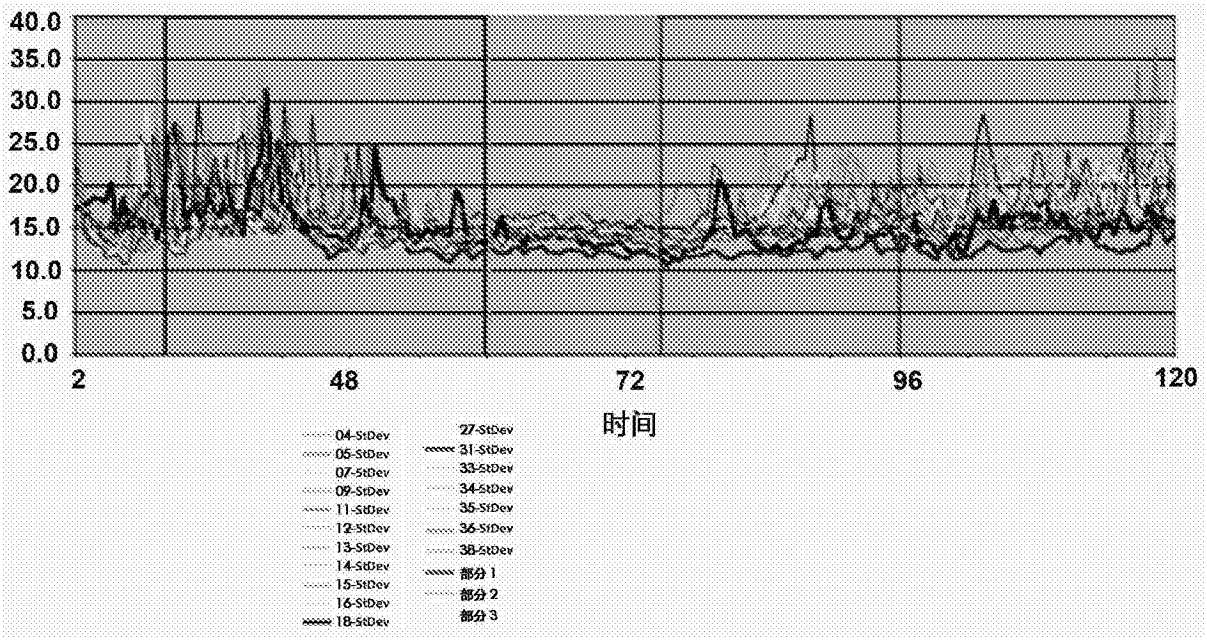
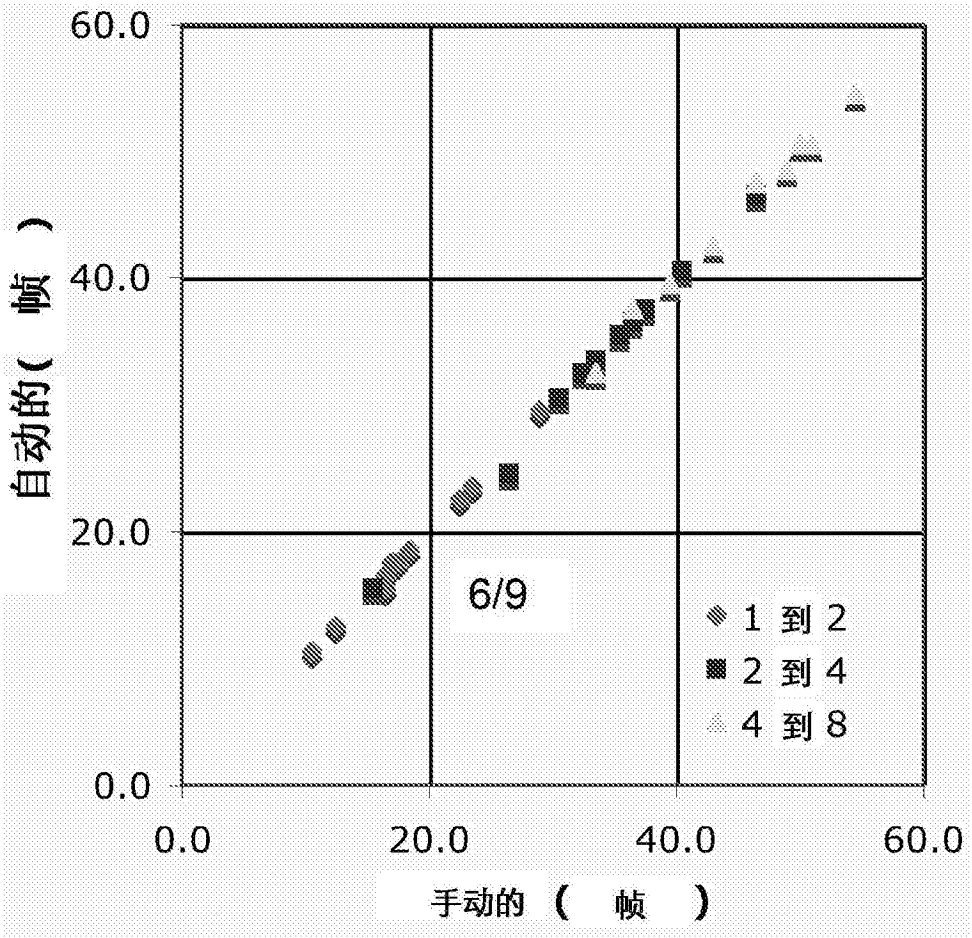

40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
2
48
72
96
120
时间
04-StDev
05-StDev
07-StDev
09-StDev
11-StDev
12-StDev
13-StDev
14-StDev
15-StDev
16-StDev
18-StDev
27-StDev
31-StDev
33-StDev
34-StDev
35-StDev
36-StDev
38-StDev
部分 1
部分 2
部分 3

图6



	手动分析				自动分析		
	1 to 2	2 to 4	4 to 8		1 to 2	2 to 4	4 to 8
1	23.5	40.5	54.5		23.5	40.5	54.5
2	29.0	46.5	66.5		29.5	46.5	
3	16.5	32.5			16.5	32.5	
4	10.5	26.5	36.5		10.5	24.5	37.5
5	12.5	27.5	39.5		12.5		39.5
6	18.5	35.5	50.0		18.5	35.5	
7	16.5	32.5	46.5		16.5	32.5	47.5
8	18.5	36.5	50.0		18.5	36.5	50.5
9	1.5	15.5	33.5			15.5	32.5
10	17.5	32.5	48.5		17.5	32.5	
11	22.5	37.5	51.0		22.5	37.5	50.5
12	16.5	30.5	43.0		15.5	30.5	42.5
13	17.0	33.5	49.0		17.5	33.5	48.5

图7

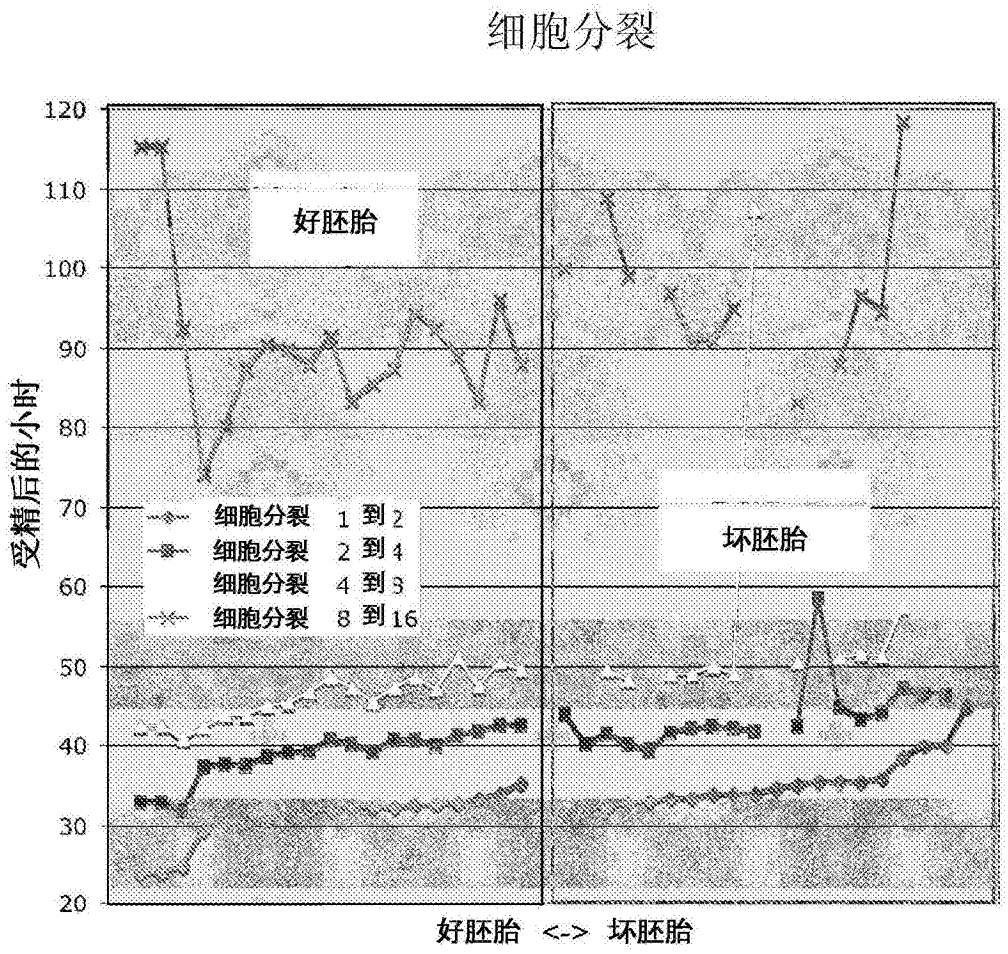

细胞分裂
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
受精后的小时
好胚胎
坏胚胎
细胞分裂 1 到 2
细胞分裂 2 到 4
细胞分裂 4 到 8
细胞分裂 8 到 16
好胚胎 <-> 坏胚胎

图8

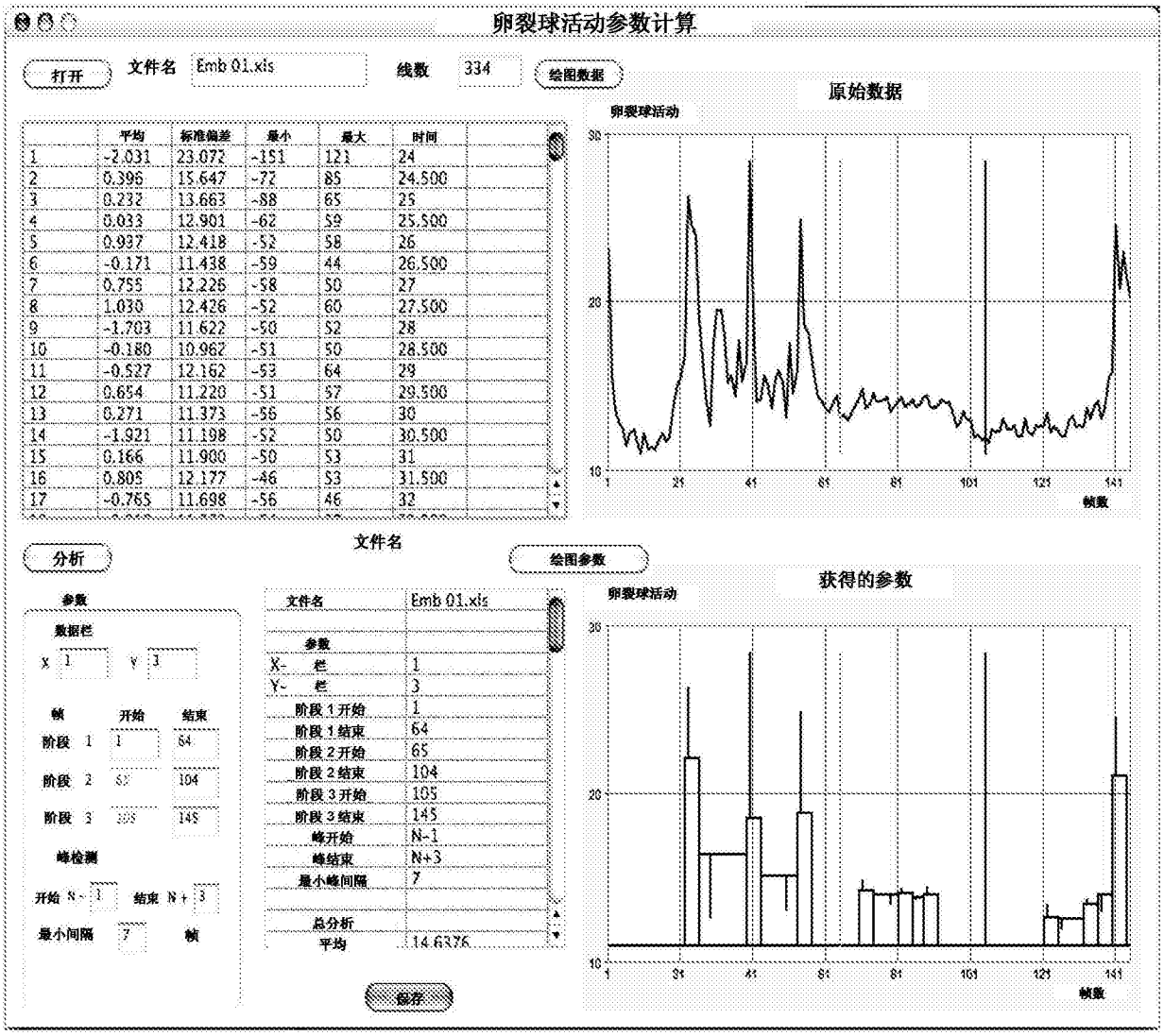

卵裂球活动参数计算
打开
文件名
Emb 01.xls
线数
334
绘图数据
原始数据
卵裂球活动
帧数
分析
文件名
绘图参数
获得的参数
参数
数据栏
帧
开始
结束
阶段 1
阶段 2
阶段 3
峰检测
开始 N-
结束 N+
最小间隔
帧
保存

图9

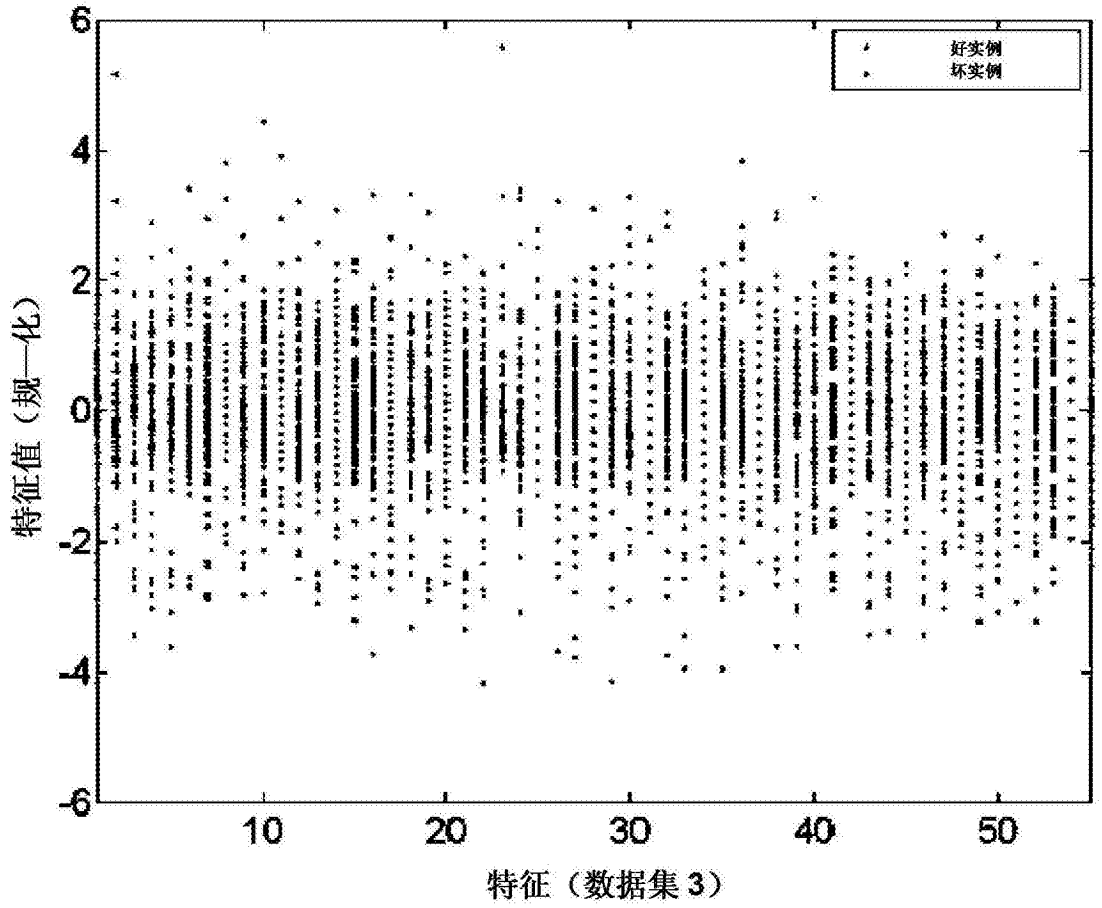


图10

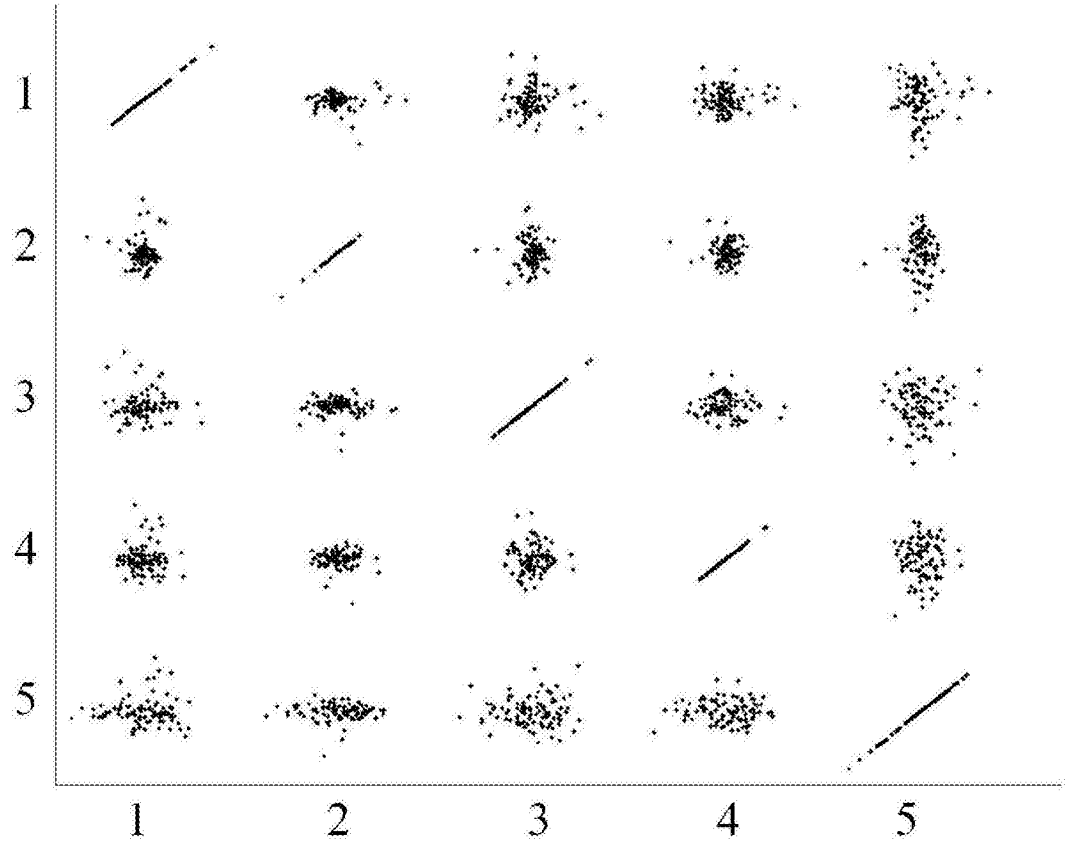


图11

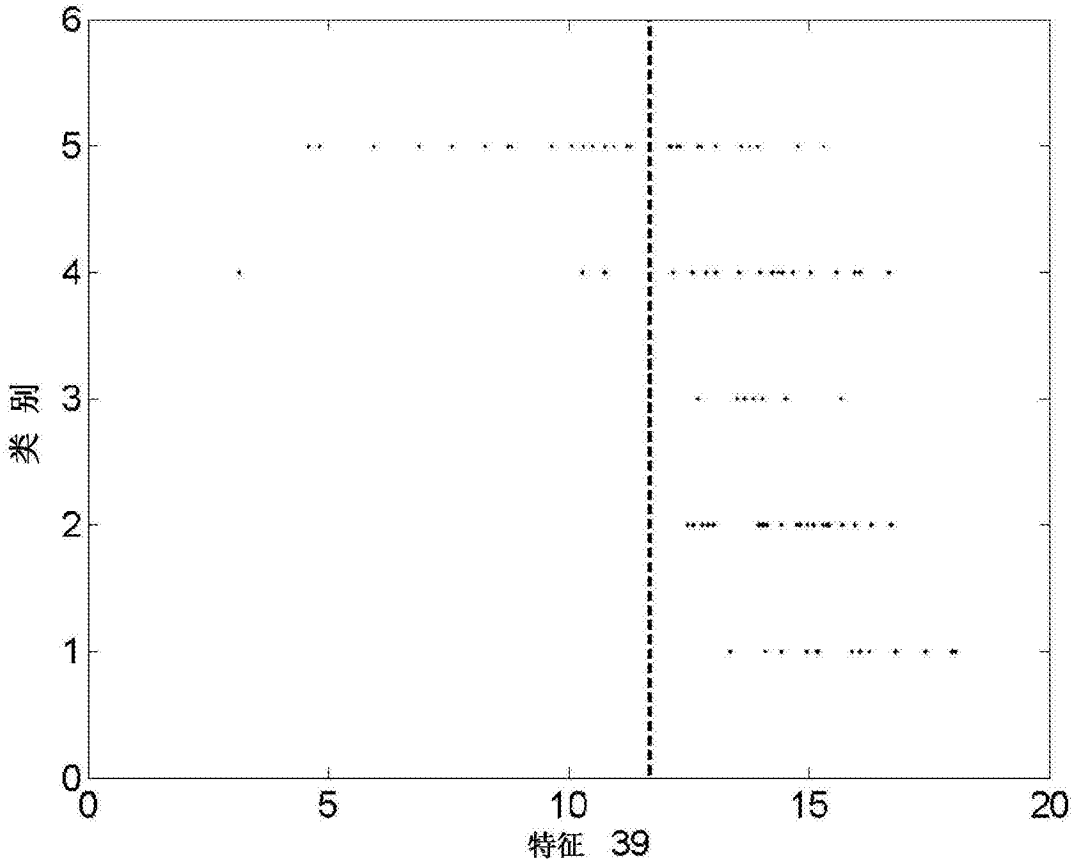


图12