(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 111052147 B
(45)授权公告日 2024.08.02

(21)申请号 201980003309.7
(22)申请日 2019.01.22
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111052147 A
(43)申请公布日 2020.04.21
(30)优先权数据
N2020622 2018.03.20 NL
62/621,564 2018.01.24 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.12.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/014574 2019.01.22
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/147581 EN 2019.08.01
(73)专利权人 伊鲁米纳公司
地址 美国加利福尼亚州
专利权人 伊鲁米纳剑桥有限公司

(72)发明人 G·M·斯金纳 G·W·埃文斯 S·S·洪

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
专利代理师 李春辉
(51)Int.Cl.
G06V 10/10(2022.01)
G02B 21/00(2006.01)
G02B 21/36(2006.01)
G02B 5/18(2006.01)
G01N 1/28(2006.01)
B82Y 15/00(2011.01)

(56)对比文件
US 2016124208 A1,2016.05.05
US 2017370836 A1,2017.12.28

审查员 周峰

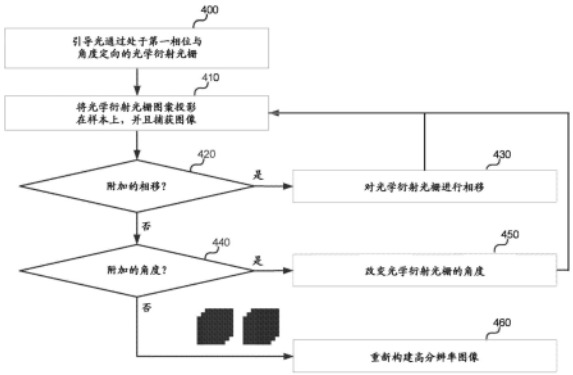
权利要求书2页 说明书18页 附图16页

(54)发明名称

具有纳米阱的图案化阵列的降维结构化照明显微术

(57)摘要

描述了用于通过使用图案化流动池来减少生物样本的结构化照明成像中所需的角度数目的技术,其中图案化流动池的纳米阱以例如方形阵列或不对称阵列布置。因此,减少了对生物样本的细节进行解析所需的图像数目。还描述了使用图案化流动池将结构化照明成像与线扫描组合的技术。



CN 111052147 B

1.一种对生物样本进行成像的方法,包括:

将光学图案投影到生物样本上,并且捕获覆盖在所述生物样本上的所述光学图案的第一图像;

第一次使投影的所述光学图案相对于所述生物样本相移,并且捕获覆盖在所述生物样本上的经相移的所述光学图案的至少第二图像;

第二次使投影的所述光学图案相对于所述生物样本相移,并且捕获覆盖在所述生物样本上的经相移的所述光学图案的至少第三图像,其中捕获的所述第一图像、捕获的所述至少第二图像和捕获的所述至少第三图像覆盖至少三个相位;以及

基于捕获的所述第一图像、捕获的所述至少第二图像以及捕获的所述至少第三图像,重新构建表示所述生物样本的高分辨率图像,

其中所述生物样本被包含在不对称图案化流动池中,所述不对称图案化流动池包括多个细长的纳米阱。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述多个细长的纳米阱中的每个细长的纳米阱是椭圆形形状或矩形形状的。

3.根据权利要求1所述的方法,其中所述多个细长的纳米阱中的每个细长的纳米阱被定向为使得:沿着所述不对称图案化流动池的第一轴线,分辨率被增加,以解析表示所述生物样本的信息。

4.根据权利要求3所述的方法,其中所述多个细长的纳米阱中的每个细长的纳米阱被定向为使得:沿着所述不对称图案化流动池的第二轴线,分辨率不被增加,以解析表示所述生物样本的信息。

5.根据权利要求1所述的方法,其中所述第一图像以及所述至少第二图像的捕获包括执行线扫描成像。

6.根据权利要求5所述的方法,还包括:引导光通过处于第一相位和第一角度定向的光学衍射光栅,其中被投影到所述生物样本上的所述光学图案是光学衍射光栅图案,所述光学衍射光栅图案是由被引导通过所述光学衍射光栅的所述光生成的,其中使投影的所述光学图案相对于所述生物样本相移包括使所述光学衍射光栅相移。

7.根据权利要求6所述的方法,其中所述光学衍射光栅的所述相移包括沿着所述第一角度定向使所述光学衍射光栅相移。

8.根据权利要求7所述的方法,其中所述光学衍射光栅的所述相移垂直于所述线扫描成像的方向发生。

9.根据权利要求1所述的方法,将光学图案投影到生物样本上包括:

引导光通过处于第一相位和第一角度定向的光学衍射光栅,其中被投影到所述生物样本上的所述光学图案是光学衍射光栅图案,所述光学衍射光栅图案是由被引导通过所述光学衍射光栅的所述光生成的,其中使投影的所述光学图案相对于所述生物样本相移包括使所述光学衍射光栅相移。

10.一种对生物样本进行成像的系统,包括:

激光源,发射光束;

光学衍射光栅,被适配为在发射的所述光束通过所述光学衍射光栅时,生成光学衍射光栅图案;以及

相机组件,被适配为捕获覆盖在生物样本上的光学衍射光栅图案的多个图像,所述多个图像反映了所述光学衍射光栅相对于所述生物样本的三个相位;以及

处理器,被适配为基于所述多个图像的组合,重新构建表示所述生物样本的高分辨率图像,

其中所述生物样本位于流动池中,所述流动池包括被定向在不对称阵列中的多个纳米阱,所述多个纳米阱包括多个细长的纳米阱。

11.根据权利要求10所述的系统,其中所述多个纳米阱中的每个纳米阱是椭圆形形状或矩形形状的。

12.根据权利要求11所述的系统,其中所述多个纳米阱中的每个纳米阱被定向为使得:沿着所述流动池的第一轴线,分辨率被增加,以解析表示所述生物样本的信息。

13.根据权利要求12所述的系统,其中所述多个纳米阱中的每个纳米阱被定向为使得:沿着所述流动池的第二轴线,分辨率不被增加,以解析表示所述生物样本的信息。

14.根据权利要求10所述的系统,其中所述相机组件包括时间延迟积分线扫描相机组件。

15.根据权利要求14所述的系统,其中所述生物样本被容纳在流动池中,所述流动池的不同部分被所述光学衍射光栅的所述三个相位的表示同时地覆盖。

16.根据权利要求14所述的系统,其中所述光学衍射光栅包括三个相位步进元件,其中所述三个相位步进元件中的每个相位步进元件被适配为在发射的所述光束通过所述相位步进元件时,生成光学衍射光栅图案,其中所述相机组件被适配为捕获覆盖在所述生物样本上的、由所述三个相位步进元件中的每个相位步进元件生成的光学衍射光栅图案的图像。

17.根据权利要求16所述的系统,其中所述相机组件包括三个图像传感器,所述三个图像传感器中的每个图像传感器被适配为捕获由所述相位步进元件中的相应相位步进元件生成的所述光学衍射光栅图案的所述图像。

具有纳米阱的图案化阵列的降维结构化照明显微术

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年1月24日提交的并且标题为“Reduced Dimensionality Structured Illumination Microscopy With Patterned Arrays Of Nanowells”的美国临时专利申请号62/621,564、以及于2018年3月20日提交的并且标题为“Reduced Dimensionality Structured Illumination Microscopy With Patterned Arrays Of Nanowells”的荷兰专利申请号N2020622的优先权。前述申请中的每个前述申请的全部内容通过引用的方式并入本文。

背景技术

[0003] 生物学研究中的许多最新发展得益于用于对核酸进行分析和测序的改进方法。例如,人类基因组计划已确定了人类基因组的整个序列,希望它将引起范围从疾病处理到基础科学发展的领域的进一步发现。最近,已报道了许多新的DNA测序技术,这些技术基于对未扩增或扩增的单个分子(以平面阵列形式或呈珠形)的大规模平行分析。

[0004] 在这种新的测序技术中用于分析核酸序列的方法通常基于荧光核苷酸或寡核苷酸的检测。结构化照明显微术(SIM)描述了一种这样的测序技术,通过该测序技术,空间结构化(即,图案化)的光可以用于对样本成像,以将显微镜的横向分辨率提高两倍或更多。在样本成像期间,可以在各种图案相位(例如,在0°、120°和240°)采集样本的图像,其中通过绕光学轴线旋转图案定向(例如,旋转60°和120°)来重复该过程。所捕获的图像(例如,九个图像,一个图像针对每个图案相位处的每个定向角)可以被组装为具有经扩展的空间频率带宽的单个图像。单个图像可以重新变换到真实空间中,以生成具有比显微镜通常可以分辨的分辨率高的分辨率的图像。

[0005] 在SIM系统的通常实现中,线性偏振光束被引导通过光学衍射光栅,光学衍射光栅将光束衍射成两个或更多分离的阶,该两个或更多分离的阶可以被投影在成像的样本上,作为正弦干涉条纹图案。在这些实现中,通过绕光学轴线旋转光学衍射光栅来控制所投影的光学衍射光栅图案的定向,同时通过使光学衍射光栅跨轴线横向地移动来调节图案的相位。在这样的系统中,光学衍射光栅被安装在平移台上,平移台进而被安装在旋转台上。附加地,在光栅处接收到由光源发射的光之前,这种系统使用线性偏振器来将由光源发射的光偏振。

[0006] 图1A图示了样本100和投影到样本100上的光学衍射光栅图案102的一个示例。尽管样本100可以包括不可分辨的较高空间频率,但是在样本100上覆盖具有已知较低空间频率的光学衍射光栅图案102会导致莫尔条纹。这有效地将不可分辨的较高空间频率移动到显微镜可分辨的较低空间频率。如上所述,利用光学衍射光栅图案102相对于样本100的不同定向/角度和相位来捕获样本100的图像,产生可以被组合成单个图像的图像,该单个图像被重新变换到真实空间中,以生成具有较高分辨率的图像。

发明内容

[0007] 本文所公开的系统和方法的示例针对用于以下的技术:减少使用SIM、特别是借助图案化流动池来对荧光样本进行解析所需的维度和图像数目,以及利用光束相对于荧光样本的移动来实现可以与线扫描技术一起使用的SIM实现。

[0008] 根据一种实现,一种对生物样本进行成像的方法包括:将光学图案投影到生物样本上,并且捕获覆盖在生物样本上的光学图案的第一图像。附加地,方法可以包括:使投影的光学图案相对于生物样本相移,并且捕获覆盖在生物样本上的经相移的光学图案的至少第二图像。再进一步地,该方法可以包括:基于捕获的第一图像以及捕获的至少第二图像,重新构建表示生物样本的高分辨率图像。

[0009] 在一些示例中,生物样本被容纳在不对称图案化流动池中,不对称图案化流动池包括多个细长的纳米阱。在一些示例中,多个细长的纳米阱中的每个细长的纳米阱是椭圆形形状或矩形形状的。在一些示例中,多个细长的纳米阱中的每个细长的纳米阱被定向为使得:沿着不对称图案化流动池的第一轴线,分辨率被增加,以解析表示生物样本的信息。在一些示例中,多个细长的纳米阱中的每个细长的纳米阱被定向为使得:沿着不对称图案化流动池的第二轴线,分辨率不被增加,以解析表示生物样本的信息。

[0010] 在一些实现中,第一图像以及至少第二图像的捕获包括执行线扫描成像。该方法还可以包括:引导光通过处于第一相位和第一角度定向的光学衍射光栅,其中被投影到生物样本上的光学图案是光学衍射光栅图案,光学衍射光栅图案是由被引导通过光学衍射光栅的光生成的,其中使投影的光学图案相对于生物样本相移包括使光学衍射光栅相移。光学衍射光栅的相移可以包括沿着第一角度定向使光学衍射光栅相移。光学衍射光栅的相移可以垂直于线扫描成像的方向发生。

[0011] 在一些示例中,该方法还可以包括:在重新构建高分辨率图像之前,执行光学衍射光栅的第三相移,将光学衍射光栅图案投影到生物样本上,并且捕获覆盖在生物样本上的经相移的光学衍射光栅图案的至少第三图像。

[0012] 在一些示例中,一种对生物样本进行成像的方法包括:引导光通过处于第一相位和第一角度定向的光学衍射光栅;以及将由被引导通过光学衍射光栅的光生成的光学衍射光栅图案投影到生物样本上,并且捕获覆盖在生物样本上的光学衍射光栅图案的第一图像。该方法还可以包括:使光学衍射光栅相移,将光学衍射光栅图案投影到生物样本上,并且捕获覆盖在生物样本上的经相移的光学衍射光栅图案的至少第二图像。再附加地,方法可以包括:将光学衍射光栅重新定向到第二角度定向,将光学衍射光栅图案投影到生物样本上,并且捕获覆盖在生物样本上的光学衍射光栅图案的第三图像。另外,方法可以包括:使光学衍射光栅相移,将光学衍射光栅图案投影到生物样本上,并且捕获覆盖在生物样本上的经相移的光学衍射光栅图案的至少第四图像。此外,方法可以包括:基于捕获的第一图像、至少第二图像、第三图像、以及至少第四图像,重新构建表示生物样本的高分辨率图像。

[0013] 在一些示例中,生物样本被容纳在方形阵列图案化流动池中,方形阵列图案化流动池包括多个纳米阱。

[0014] 在一些示例中,系统可以包括:激光源,发射光束;光学衍射光栅,被适配为在发射的光束通过光学衍射光栅时,生成光学衍射光栅图案;以及相机组件。相机组件可以被适配为:捕获覆盖在生物样本上的光学衍射光栅图案的多个图像,多个图像反映了光学衍射光

栅相对于生物样本的三个相位。系统还可以包括处理器,处理器被适配为基于多个图像的组合,重新构建表示生物样本的高分辨率图像。

[0015] 在一些示例中,生物样本位于流动池中,流动池包括被定向在不对称阵列中的多个纳米阱。在一些示例中,多个纳米阱中的每个纳米阱是椭圆形形状或矩形形状的。在一些示例中,多个纳米阱中的每个纳米阱被定向为使得:沿着流动池的第一轴线,分辨率被增加,以解析表示生物样本的信息。在一些示例中,多个纳米阱中的每个纳米阱被定向为使得:沿着流动池的第二轴线,分辨率不被增加,以解析表示生物样本的信息。

[0016] 在一些示例中,相机组件包括时间延迟积分线扫描相机组件。在一些示例中,生物样本被容纳在流动池中,流动池的不同部分被光学衍射光栅的三个相位的表示同时地覆盖。

[0017] 在一些示例中,系统的光学衍射光栅包括三个相位步进元件,其中三个相位步进元件中的每个相位步进元件被适配为在发射的光束通过相位步进元件时,生成光学衍射光栅图案,其中相机组件被适配为捕获覆盖在生物样本上的、由三个相位步进元件中的每个相位步进元件生成的光学衍射光栅图案的图像。在一些示例中,相机组件包括三个图像传感器,三个图像传感器中的每个图像传感器被适配为捕获由相位步进元件中的相应相位步进元件生成的光学衍射光栅图案的图像。

[0018] 根据另一种实现,系统可以包括:激光源,发射光束;光学衍射光栅,被适配为在发射的光束通过光学衍射光栅时,生成光学衍射光栅图案;以及相机组件,被适配为捕获覆盖在生物样本上的光学衍射光栅图案的多个图像,多个图像反映了光学衍射光栅相对于生物样本的三个相位、以及光学衍射光栅相对于生物样本的两个角度定向。系统还可以包括处理器,处理器被适配为基于多个图像的组合,重新构建表示生物样本的高分辨率图像。

[0019] 在一些示例中,生物样本位于流动池中,流动池包括被定向在方形阵列中的多个纳米阱。

[0020] 在一些示例中,多个纳米阱中的每个纳米阱被定向为使得:沿着流动池的第一轴线和第二轴线,分辨率被增加,以解析表示生物样本的信息。

[0021] 应当理解,前述概念和下面更详细讨论的附加概念的所有组合(假设这种概念不相互矛盾)被认为是本文公开的发明主题的一部分。特别地,出现在本公开的结尾处的所要求保护的主题的所有组合被认为是本文公开的发明主题的一部分。

[0022] 通过以下结合附图的详细描述,所公开技术的其他特征和方面将变得显而易见,附图以示例方式图示了根据所公开技术的实现的特征。本发明内容不旨在限制本文所述的任何发明的范围,本文所述的任何发明由权利要求和等同物限定。

附图说明

[0023] 根据一个或多个各种实现,参考以下附图来详细描述本公开。提供附图仅出于说明的目的,并且附图仅描绘了通常实现或示例实现。

[0024] 图1A图示了被用于降低样本的频率图案来允许增加分辨率的结构化照明的一个示例。

[0025] 图1B图示了在一个示例中对用于成像的样本进行解析所需的角度数目。

[0026] 图2图示了结构化照明成像系统的一个示例。

[0027] 图3A图示了六边形流动池图案的一个示例。

[0028] 图3B图示了方形阵列流动池图案的一个示例,使用该示例导致降维结构化照明成像。

[0029] 图3C图示了不对称阵列流动池图案的一个示例,使用该示例导致降维结构化照明成像。

[0030] 图4是图示了可以针对降维结构化照明成像而实现的示例操作的流程图。

[0031] 图5图示了线扫描成像系统的一个示例。

[0032] 图6A-图6C图示了在一个示例中,结构化照明图案在一个维度上的相移。

[0033] 图6D图示了不对称图案化流动池的一个示例,该不对称图案化流动池具有同时被经相移的结构化照明图案覆盖的不同部分。

[0034] 图7图示了使用经常规图案化的流动池的线扫描操作的一个示例。

[0035] 图8图示了使用静止结构化照明图案的线扫描成像系统的一个示例。

[0036] 图9图示了使用对照明光束进行调制的静止结构化照明图案的线扫描操作的一个示例。

[0037] 图10是图示可以针对与线扫描成像结合使用的降维结构化照明成像而实现的示例操作的流程图。

[0038] 图11图示了可以用于实现本公开中所描述的实现的各种特征的一个示例计算部件。

[0039] 图12图示了示例实现,其中光栅以及阱图案以微小的角度偏移被配置,其中三个细的照明区域被相对远离地投影到样本上。

[0040] 附图不是穷举的,并且不将本公开限制为所公开的精确形式。

具体实施方式

[0041] 如本文所使用的,对于由衍射光栅发射的衍射光,术语“阶”或“阶数”旨在表示整数个波长的数目,该数目表示针对相长干涉的来自衍射光栅的相邻狭缝的光的路径长度差。术语“零阶”或“零阶极大值”旨在指代其中没有衍射的由衍射光栅发射的中心亮条纹。术语“一阶”旨在指代在零阶条纹的两侧的所发射的两个亮条纹,其中路径长度差为±1个波长。

[0042] 如本文中所使用的,对于样本,术语“斑点”或“特征”旨在表示图案中可以根据相对位置与其他点或区域区分开的点或区域。个体斑点可以包括特定类型的一个或多个分子。例如,斑点可以包括具有特定序列的单个目标核酸分子,或者斑点可以包括具有相同序列(和/或其互补序列)的若干核酸分子。

[0043] 如本文所使用的,术语“图块”通常指代样本的相同区域的一个或多个图像,其中一个或多个图像中的每个图像表示相应的颜色通道。图块可以形成一个成像周期的成像数据集的成像数据子集。

[0044] 如本文中所使用的,术语“x-y平面”旨在表示由笛卡尔坐标系中的直线轴线x和y限定的二维区域。当参考检测器和由检测器观察的对象使用时,该区域可以进一步被指定为与检测器和被检测对象之间的观察方向正交。当在本文中用来提及线扫描器时,术语“y方向”指代扫描方向。

[0045] 如本文中所使用的,术语“z坐标”旨在表示指定沿着与x-y平面正交的轴线的点、线或区域的位置的信息。在特定实现中,z轴线正交于检测器所观察的对象的区域。例如,光学系统的聚焦方向可以沿着z轴线被指定。

[0046] 如本文所使用的,术语“对线进行扫描”旨在表示检测对象的x-y平面中的二维截面,该截面是矩形或长方形,并且引起截面和对象之间的相对移动。例如,在荧光成像的情况下,在扫描的给定时间点,可以特定地激发具有矩形或长方形形状的对象的区域(在排除其他区域的情况下)和/或可以特定地采集从该区域的发射(在排除其他区域的情况下)。

[0047] 本文所公开的实现针对被配置为具有方形或不对称图案的流动池。回想SIM依赖于空间结构化(即,图案化)的光来对样本成像,以将显微镜的横向分辨率提高两倍或更多。还回想传统上,样本在多个图案相位和多个定向/角度处的图像用于实现横向分辨率的期望增加。

[0048] 图1B在一个示例中总体上图示了由显微镜物镜产生的可观察的倒易空间区域(它类似于其衍射图案),以及它如何在边缘处受到物镜可以透射的最高空间频率(2NA/λ)的限制(图形120)。如图所示,中心斑点表示零阶分量。图形122中图示了表示平行线图案的零阶和一阶衍射分量。如果图案间距处于分辨率极限,则一阶斑点出现在可观察场的边缘处(在k_0边界上)。由于混频,可观察区域除包含空间频率的正常图像(中心圆)外,还包含以原始场的边缘为中心的两个新的偏移频率图像(图形124)。这些偏移图像包含使用常规显微镜无法观察到的较高的空间频率。如图形126所示,在120°定向处从三个相位制备的图像集,最终经过处理后,生成真实图像,该真实图像包含的空间分辨率是宽场荧光显微术中可以观察到的空间分辨率的两倍。

[0049] 然而,通过将流动池配置为具有方形或不对称图案(例如,不是六边形图案),因为解析衬底所需要的分辨率提升变为各向异性的,因此通过使用更受约束的SIM角度集来构建各向异性光学传递函数(OTF)变得足以解析衬底至充分的程度,所以需要较少的图像。即,具有方形或不对称纳米阱图案的流动池允许流动池的一个或多个轴线与待增加其分辨率的一个或多个轴线对准,该流动池具有更紧密节距(即,紧邻纳米阱之间的距离)并涉及增加的分辨率。在方形图案化流动池的一个示例中,仅需要关于两个轴线增加分辨率。因此,仅需要六个图像(跨三个相位在两个角度中的每个角度处的图像)。在不对称图案化流动池的情况下,只需样本的三个图像来实现增加的分辨率(跨三个相位在一个角度处的图像)。

[0050] 通过将对样本进行解析所需的角度的数目减少到期望程度,减少了完成样本成像所需的图像的数目。例如,在4-染料化学的上下文中,系统可能需要采集36个图像,来生成用于碱基称呼的4个图像(如下所述)。还可以减少存储或缓存所捕获的图像所需的存储(例如,磁盘)空间量。再附加地,还可以减少将图像组装成单个图像并且然后将该单个图像重新变换/重新构建为具有期望分辨率的图像所需的处理和/或计算能力。

[0051] 再进一步地,SIM的常规实现与利用线扫描技术对样本成像的测序系统不兼容。线扫描可以指代使用逐行对流动池成像的像素线来构筑连续图像(与具有捕获整个对象(例如,流动池)的静止图像的像素二维阵列的相机或传感器相反)。适用于测序系统的一个特殊类型的线扫描是时间延迟积分(TDI)线扫描。

[0052] 利用多角度SIM实现,需要固定的视场来采集角度/相位图像组合中的每个组合。

然而,当仅关于单个角度拍摄图像时,如本文所公开的其中不对称图案化的流动池用作样本衬底的实现中的情况,可以使用TDI线扫描来捕获覆盖三个SIM图案相位的样本图像。即,SIM图案可以相对于不对称图案化的流动池进行移动,以生成对流动池中的样本进行解析而仅沿着一个轴线增加分辨率所需的三个相位。

[0053] 在一些实现中,TDI线扫描可以与SIM技术结合使用,以通过使用TDI线扫描相机或传感器沿着流动池捕获图像(称为“条带(swath)”)来对样本成像。即,可以对利用第一相位中的SIM图案进行图案化的流动池,执行TDI线扫描。SIM图案可以移位至第二相位,并且TDI线扫描可以重复。SIM图案可以移位至第三相位,并且TDI线扫描可以再次重复。以这种方式,捕获每个图案相位处的样本图像。

[0054] 备选地,可以利用SIM图案的不同相位来将流动池的不同部分图案化。例如,在流动池的第一部分处,SIM图案可以位于第一位置中,在流动池的第二部分处,SIM图案可以移位至第二位置,并且在流动池的第三部分处,SIM图案可以移位至第三位置。因此,当相机或传感器捕获条带时,在单个TDI线扫描中捕获跨三个SIM图案相位中的每个SIM图案相位的样本图像。

[0055] TDI线扫描的一些实现可以利用三芯片TDI成像器来实现,其中投影的条纹图案的三个相位可以在一次扫描中被指定。这种实现可以使用三部分衍射光栅来实现,其中衍射光栅的每个部分对应于特定相位。例如,三元件衍射光栅(其中每个元件相位步进)可以在相同的衬底上形成。凭借该实现,除了沿着扫描方向的移动之外,可以不需要光栅或样本的移动。

[0056] 在再一些其他实现中,代替将SIM图案相对于样本/流动池移位,在SIM图案保持静止的同时移动样本/流动池。应当理解,样本位于/放置在流动池中,从而导致样本根据组成流动池的纳米阱进行图案化。如上所述,当实现TDI线扫描时,样本/流动池已经在移动。因此,可以利用样本/流动池的该移动来避免必须移位SIM图案。即,样本/流动池相对于静止SIM图案(考虑合适的定向)的移动生成对样本进行解析所需的必要相位。

[0057] 在一些实现中,光栅与阱图案可以以微小的角度偏移被配置,其中三个细的照明区域被相对远离地投影到样本上。在每个照明线内,阱可以保持主要与光栅同相,但是在照明区域之间的距离可以足以使得:通过第二照明区域,它们是λ/3异相,以用于相移。在这种实现中,在照明线之间的间距可以使得更容易地具有三个彼此邻近的图像传感器(例如,三个TDI扫描器芯片)。该示例情景由图12图示。

[0058] 在详细描述本文所公开的系统和方法的各种实现之前,描述可用于实现本文所公开的技术的示例环境是有用的。一个这样的示例环境是图2所示的用空间结构化的光照射样本的结构化照明成像系统200的环境。例如,系统200可以是利用空间结构化的激发光来对生物样本成像的结构化照明荧光显微系统。

[0059] 在图2的示例中,光发射器250被配置为输出光束,该光束由准直透镜251准直。经准直的光由光结构化光学组件255进行结构化(图案化),并且由二向色镜260借助物镜242而被引导到样本容器210的样本上,样本容器210被定位在台270上。在荧光样本的情况下,样本响应于结构化激发光而发出荧光,并且所产生的光由物镜242收集,并被引导至相机系统240的图像传感器,以检测荧光。

[0060] 在下文中进一步描述的各种实现中的光结构化光学组件255包括一个或多个光学

衍射光栅,以生成被投影到样本容器210的样本上的衍射光(例如,条纹)的正弦图案。衍射光栅可以是一维或二维的透射、反射或相位光栅。如以下参考特定实现的进一步描述,在系统200中,衍射光栅不必包括旋转台。在一些实现中,在成像系统的操作期间,衍射光栅可以固定(例如,不旋转或不线性移动)。例如,在下面进一步描述的特定实现中,衍射光栅可以包括基本上或确切地/完美地彼此垂直定向的两个固定的一维透射衍射光栅(例如,水平衍射光栅和竖直衍射光栅)。

[0061] 在每个成像周期期间,系统200利用光结构化光学组件255来采集处于各种相位处的多个图像,该多个图像沿着样本平面(例如,沿着x-y平面)横向位移,其中该过程通过绕光学轴线(即,关于样本的x-y平面)旋转图案定向来重复一次或多次。然后可以对所捕获的图像进行空间重新构建,来生成更高分辨率的图像(例如,图像的横向空间分辨率是个体图像的横向空间分辨率的大约两倍)。

[0062] 在系统200中,光发射器250可以是非相干光发射器(例如,发射由一个或多个激发二极管输出的光束)或者是相干光发射器(诸如,由一个或多个激光器或激光二极管输出光的发射器)。如系统200的示例所示,光发射器250包括用于引导待输出的光束的光纤252。然而,可以使用光发射器250的其他配置。在多通道成像系统(例如,使用多个波长的光的多通道荧光显微镜)中利用结构化照明的实现中,光纤252可以光学耦合到多个不同的光源(未示出),每个光源发射不同波长的光。尽管系统200被图示为具有单个光发射器250,但是在一些实现中,可以包括多个光发射器250。例如,下面将进一步讨论,在利用多个臂的结构化照明成像系统的情况下,可以包括多个光发射器。例如,可以发射对应于不同波长(例如,蓝色、绿色、红色或其他颜色)的光。在一些示例中,可以使用一个光发射器/光源。在一些示例中,可以使用两个或更多光发射器/光源。

[0063] 在一些实现中,系统200可以包括管透镜256,管透镜256可以包括沿着z轴线铰接来调整结构化光束形状和路径的透镜元件。例如,可以将管透镜的部件铰接,以考虑容器210中样本的样本厚度的范围(例如,不同的盖玻片厚度)。

[0064] 在系统200的示例中,流体输送模块或设备290可以将试剂(例如,荧光标记的核苷酸、缓冲剂、酶、裂解试剂等)的流引导至(并通过)样本容器210和废物阀220。样本容器210可以包括一个或多个在其上提供样本的衬底。例如,在分析大量不同核酸序列的系统的情况下,样本容器210可以包括在其上结合、附接或关联待测序的核酸的一个或多个衬底。衬底可以包括可以附接核酸的任何惰性衬底或基质(诸如例如,玻璃表面、塑料表面、胶乳、葡聚糖、聚苯乙烯表面、聚丙烯表面、聚丙烯酰胺凝胶、金表面和硅晶片)。在一些应用中,衬底在跨样本容器210、以矩阵或阵列形式形成的多个位置处的通道或其他区域内。系统200还可以包括温度站致动器230和加热器/冷却器235,其可以可选地调节样本容器210内的流体的条件温度。

[0065] 在特定实现中,样本容器210可以被实现为图案化流动池,其包括半透明盖板、衬底以及在它们之间容纳的液体,并且生物样本可以位于半透明盖板的内表面处或衬底的内表面处。流动池可以包括在衬底中被图案化为限定阵列(例如,六边形阵列、矩形阵列等)的大量(例如,数千、数百万或数十亿或更多)的阱或区域。每个区域可以形成生物样本(例如,DNA、RNA或另一基因组材料)的簇(例如,单克隆簇),例如使用通过合成的测序,可以对该生物样本进行测序。流动池可以进一步划分为多个间隔开的巷道(例如,八个巷道),每个巷道

包括六边形的簇阵列。

[0066] 样本容器210可以安装在样本台270上,以提供样本容器210相对于物镜242的移动和对准。样本台可以具有一个或多个致动器,以允许其在三个维度中的任何维度上移动。例如,就笛卡尔坐标系而言,可以提供致动器来允许样本台相对于物镜在X、Y和Z方向上移动。这可以允许将样本容器210上的一个或多个样本位置定位成与物镜242光学对准。可以通过移动样本台本身、物镜、成像系统的一些其他部件或上述的任何组合,来实现样本台270相对于物镜242的移动。进一步的实现还可以包括将整个成像系统在静止样本之上移动。备选地,可以在成像期间固定样本容器210。

[0067] 在一些实现中,可以包括聚焦(z轴线)部件275,以控制光学部件在聚焦方向(通常称为z轴线或z方向)上相对于样本容器210的定位。聚焦部件275可以包括物理地耦合到光学台或样本台或两者的一个或多个致动器,以相对于光学部件(例如,物镜242)移动样本台270上的样本容器210,以提供用于成像操作的适当聚焦。例如,诸如例如通过与台直接或间接地机械、磁性、流体或其他附接或接触,致动器可以物理地耦合至相应台。一个或多个致动器可以被配置为:在将样本台保持在同一平面内(例如,保持基本上或完美地垂直于光学轴线的水平面或水平姿态)的同时,在z方向上移动台。可以理解,由于例如制造公差、操作限制等,根据一些示例或实现,可能无法实现完美的垂直、平行或其他定向。但是,对于本文所公开的技术的目的而言,基本上垂直、平行或其他定向应理解为是指足以实现本文所述和/或预期的期望分辨率或其他相关效果的定向。一个或多个致动器还可以被配置为使得台倾斜。这样做可以例如使得样本容器210可以动态地调平,以考虑其表面中的任何斜度。

[0068] 在进行成像的样本位置处,从测试样本发出的结构化光可以借助二向色镜260引导到相机系统240的一个或多个检测器。在一些实现中,可以包括具有一个或多个发射过滤器的过滤器切换组件265,其中一个或多个发射过滤器可以用于使特定的发射波长通过、并阻挡(或反射)其他波长。例如,一个或多个发射过滤器可以用于在成像系统的不同通道之间切换。在特定实现中,发射过滤器可以被实现为将不同波长的发射光引导至相机系统240的不同图像传感器的二向色镜。

[0069] 相机系统240可以包括一个或多个图像传感器,以监测和跟踪样本容器210的成像(例如,测序)。相机系统240可以被实现为例如电荷耦合设备(CCD)图像传感器相机,但是可以使用其他图像传感器技术(例如,有源像素传感器)。来自相机系统240的输出数据(例如,图像)可以被传送到实时分析模块(未示出),该实时分析模块可以被实现为如下文进一步描述的软件应用,该软件应用可以重新构建在每个成像周期期间捕获的图像,以创建具有较高空间分辨率的图像。如下面将描述的,相机系统240还可以被实现为TDI CCD相机,以实现线扫描技术。

[0070] 尽管未示出,但是可以提供控制器来控制结构化照明成像系统200的操作,包括使系统200的各种光学部件同步。控制器可以被实现为控制系统操作的各个方面,诸如例如,光结构化光学组件255的配置(例如,衍射光栅的选择和/或线性平移)、管透镜256的移动、聚焦、台移动和成像操作。在各种实现中,可以使用硬件、算法(例如,机器可执行指令)或前述的组合来实现控制器。例如,在一些实现中,控制器可以包括具有相关联的存储器的一个或多个CPU或处理器。作为另一示例,控制器可以包括控制操作的硬件或其他电路(诸如,计算机处理器和其上存储有机器可读指令的非暂态计算机可读介质)。例如,该电路可以包括

以下中的一个或多个:现场可编程门阵列(FPGA)、专用集成电路(ASIC)、可编程逻辑设备(PLD)、复杂可编程逻辑设备(CPLD)、可编程逻辑阵列(PLA)、可编程阵列逻辑(PAL)或其他类似的处理设备或电路。作为又一示例,控制器可以包括该电路与一个或多个处理器的组合。

[0071] 图3A图示了根据本文公开的实现可以被成像的图案化流动池300的一个示例配置。在该示例中,流动池300被图案化为具有在成像运行期间可以被同时成像的有序斑点或特征302的六边形阵列(参见304)。为了便于说明,流动池300被图示为具有数十到数百个斑点302。然而,如本领域技术人员可以理解的,流动池300可以具有数千、数百万或数十亿个被成像的斑点302。此外,在一些情况下,流动池300可以是多平面样本,该多平面样本包括在成像运行期间被采样的斑点302的多个平面(基本上或完美地垂直于聚焦方向)。在特定的实现中,流动池300可以被图案化为具有被划分为巷道的数百万或数十亿个阱。在该特定实现中,流动池的每个阱可以包含使用通过合成的测序来进行测序的生物材料。

[0072] 如上面提到的,在一些示例中,为了使用图案化流动池300对样本进行解析,需要至少九个图像来实现必要的分辨率。这是因为图案化流动池300中的纳米阱的六边形阵列是高频图案,其中纳米阱之间的节距紧密并且不可分辨。特别地,在该示例中,存在两个因素,该两个因素可以确定需要多少个图像来对样本进行充分解析。

[0073] 第一因素是期望的光通带的副本数目。返回参考图1B,图形122示出了在不使用SIM的情况下的正常通带。图形124图示了创建光通带的一个副本的示例。这可以改进在一个维度上的分辨率,而图形126/图形306(图3A)图示了创建光通带的三个副本的示例,这导致在两个维度上相当均一的分辨率改进。

[0074] 第二因素是用于对每个光通带的相位进行解调的图像数目。尽管从理论上讲,仅需要两个图像(来获得实部和虚部),但通常使用三个图像来获得更好的噪声平均。

[0075] 应理解,当将图像从空间频率转译到傅立叶空间时(由显微镜在物镜后焦平面处生成的原始数据的分析是基于傅立叶分析),傅立叶变换包含3个分量或轴线。即,根据物镜数值孔径和照明的平均波长,光在物镜后焦平面处的衍射创建衍射屏障,衍射屏障所指定的最大分辨率在横向(x,y)维度上约为200nm,并且在轴向(z)维度上约为500nm。因此,当在图案化流动池300中使用纳米阱的六边形阵列时,使用SIM以三个角度拍摄图像。同样如上所述,为了获得必要的分辨率,必须在三个角度中的每个角度处跨三个相位拍摄图像,其中需要三个相位来确保观察到成像区域上的所有部分(即,以覆盖SIM图案的整个波长),从而产生九个图像。这导致在所有三个轴线308上的分辨率增加。

[0076] 然而,在一个示例中,使用另一类型的图案化流动池(例如,流动池310),其中纳米阱312被图案化到方形阵列(参见314)上,仅需要两个角度来实现增加的分辨率,增加的分辨率沿着方形阵列的轴线对准。图形316图示了这种情况的示例,其中仅创建了两个光通带副本,并且仅需要两个光通带副本来实现期望的分辨率增加。换言之,在这种情况下,沿着方形阵列的两个轴线(x和y),通过将SIM图案或条纹与期望增加分辨率的那些方向对准,可以对方形图案化流动池(例如,流动池310)进行解析。可以理解,沿着相邻纳米阱312之间的任何对角线路径,将存在一些分辨率提升,使得对角相邻纳米阱将彼此可分辨。然而,在沿着x和y轴线的纳米阱312之间,节距(P_x、P_y)足够窄,以至于需要使用SIM来提高分辨率(即,x和y轴线上的空间频率太高而无法解析)。

[0077] 通过使用方形图案化流动池(诸如,流动池310),使用SIM的常规测序系统的维数要求可以降低一个维度,其中分辨率仅在两个轴线318上增加。即,不是捕获在三个相位上各覆盖三个角度的九个图像,而是仅需要捕获在三个相位上各覆盖两个角度的六个图像,来对流动池310内容纳的样本进行充分解析。尽管流动池310的堆积密度降低,这还是有利的。例如,对比具有相同节距的六边形阵列,堆积密度的降低可能仅为11%。然而,对比具有700nm节距的非SIM六边形阵列,根据各种示例实现SIM可以导致具有350nm节距的方形图案化阵列的堆积密度增加例如356%。

[0078] 通过使用再一类型的图案化流动池(在该示例中为不对称图案化流动池),可以将使用SIM的常规测序系统的维数要求再多降低一个维度。图3C图示了图案化流动池320,其纳米阱被不对称地图案化。在该实现中,每个纳米阱322被成形或配置为形成细长结构。如本文所使用的,术语细长结构指代其中沿着第一轴线的尺寸大于沿着第二轴线的尺寸的形状。在该示例中,x轴线比沿着另一轴线(在此示例中为y轴线)的纳米阱322的长度或高度窄。应理解,尽管图3C所示的实现使用椭圆形纳米阱,但是可以使用其他类型(例如,矩形)的细长纳米阱。可以使用产生图案的任何形状的纳米阱,从而仅沿着一个轴线的样本与使用SIM的分辨率增加相关联。在一些实现中,条纹宽度w至少基本上等于或略大于的图案化特征的尺寸可以是圆形特征的直径、方形特征的边的长度、矩形特征的较长边或较短边的长度、椭圆特征沿着其长轴线或短轴线的直径、或不规则形状特征沿着特征的一个轴线(例如,x或y轴线)的最长尺寸。在一些实现中,纳米阱可以备选地成形为方形或圆形,但是它们之间具有不对称间距。在各种实现中,不对称图案化流动池可以指代:其中初级频率分量在距零频率分量不同的距离处的阵列;其晶胞可以由各种节距限定的阵列;或者其中阵列的频率分量可以由光学传递函数解析的阵列,该光学传递函数比传统的三角度SIM OTF更不对称。

[0079] 以这种方式,可以沿着一个方向或轴线(即,y轴线)对样本进行解析,而沿着另一方向或轴线(即,x轴线),SIM用于增加分辨率以便对样本进行解析。即,沿着x轴线,不对称图案化流动池320的节距P_x窄或紧密,必需增加分辨率,而沿着y轴线,不对称图案化流动池320的节距P_y较大。因此,仅在一个方向上/沿着一个轴线318增加了分辨率,并且仅捕获三个图像,以便对流动池320的纳米阱内容纳的样本进行充分解析。因此,如图形352所示,仅创建一个光通带副本,并且需要仅一个光通带副本来增加分辨率。

[0080] 图4是流程图,其图示了可在诸如图2的结构化照明成像系统200的测序系统中执行的示例操作,以使用方形或不对称图案化流动池对样本进行测序。在操作400处,可以开启与以第一相位定向的第一光学衍射光栅图案相对应的光源。在操作410处,将处于第一定向的光学衍射光栅图案投影到样本上,并且捕获图像。即,返回参考图2,光发射器250可以输出光束,该光束由准直透镜251准直。经准直的光由光结构化光学组件255进行结构化(图案化),并且由二向色镜260借助物镜242引导到样本容器210的样本上,样本容器210被定位在台270上。在该实现中,样本容器210包括具有方形或不对称图案的图案化流动池,诸如,分别为流动池310或320(图3B和图3C)。在荧光样本的情况下,在方形或不对称图案化流动池中容纳的样本响应于结构化激发光而发出荧光,并且所得的光被物镜242收集,并引导到相机系统240的图像传感器,以检测荧光。

[0081] 在操作420处,可以执行检查,以确定是否需要附加的相移。如果是,则在操作430

处,对光学衍射光栅进行相移,并且操作返回至操作410,在操作410处,将(经相移的)光学衍射光栅图案投影到样本上,并捕获图像。如前所述,通常执行三个相移,来捕获整个成像区域,在该实现中,捕获方形图案化流动池的整个区域。

[0082] 如果不需要附加的相移,则在操作440处,可以执行检查,以确定是否需要附加的角度,并且在操作450处,改变光学衍射光栅的角度。操作返回到操作410,在操作410处,将光学衍射光栅图案(在改变角度后)投影到样本上,并捕获图像。操作进行到操作420,其中如果在420处需要附加的相移,则在操作430处对光学衍射光栅进行相移。再次,操作返回到操作410,在操作410处,光学衍射光栅图案(在新的角度和新的相位处)被投影到样本上,并捕获图像。再次,在该实现中,需要三个相位上的图像来捕获方形图案化流动池的整个区域。应当理解,用于控制结构化照明成像系统200的系统操作的各方面的前述控制器可以被配置有执行上述功能(例如,检查是否需要光学衍射光栅图案的附加相移或定向,来对所使用的特定类型的流动池进行成像)的指令。

[0083] 在方形图案化流动池(例如,流动池310(图3B))的情况下,需要两个角度处的图像,来增加沿着流动池310的两个轴线的分辨率。因此,在利用(在光学衍射光栅图案的三个相移上)与两个角度相对应的两个定向上投影的光学衍射光栅图案捕获图像之后,在操作460处,(通过将总共六个图像组合、并将它们重新变换到真实空间中)重新构建高分辨率图像。可以在系统中完成该高分辨率图像的重新构建,或者在某些示例中,可以使用分离的处理实体来执行重新构建。

[0084] 在其中图案化流动池是不对称流动池的实现中,上述方法不需要涉及改变角度。再次,利用不对称流动池,SIM用于仅沿着一个轴线增加分辨率。因此,光学衍射光栅仅需要被相移三次,从而允许针对三个相移捕获图像。因此,一旦在操作420处不需要其他相移,则方法进行到操作460,在操作460处可以仅使用三个捕获的图像来重新构建高分辨率图像。

[0085] 如前所述,当使用可以利用降维SIM实现的特定图案化流动池时,线扫描技术(诸如,TDI线扫描)可以用于对那些图案化流动池中容纳的样本成像。图5是图示了可以在各种实现中用于对样本成像的一个示例性两通道线扫描成像系统500的框图。

[0086] 如在图2的结构化照明成像系统200的情况下,线扫描成像系统500可以用于核酸的测序,其中核酸被附接在阵列中的固定位置(即,诸如流动池320的流动池的阱)处,并且阵列可以重复成像。在这样的实现中,线扫描成像系统500可以获得两个不同颜色通道中的图像,该两个不同颜色通道可以用于将特定核苷酸碱基类型与另一核苷酸碱基类型区分开。更具体地,线扫描成像系统500可以实现被称为“碱基称呼”的过程,碱基称呼通常指代在成像周期中确定针对图像的给定斑点位置的碱基称呼(例如,腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)或胸腺嘧啶(T))的过程。在两通道碱基称呼期间,从两个图像中提取的图像数据可以用于通过将碱基身份编码为两个图像的强度的组合,来确定四个碱基类型中的一个的存在。对于两个图像中的每个图像中的给定斑点或位置,可以基于信号身份的组合是否是[开,开]、[开,关]、[关,开]或[关,关]来确定碱基身份。

[0087] 再次参考线扫描成像系统500,系统包括线生成模块LGC 510,线生成模块LGC 510具有设置在其中的两个光源511和512。光源511和512可以是相干光源(例如,输出激光束的激光二极管)。光源511可以发射第一波长(例如,红色波长)的光,并且光源512可以发射第二波长(例如,绿色波长)的光。从激光源511和512输出的光束可以被引导通过一个或多个

光束成形透镜513。在一些实现中,可以使用单个光成形透镜来将从两个光源输出的光束成形。在其他实现中,单独的光束成形透镜可以用于每个光束。在一些示例中,光束成形透镜是鲍威尔透镜,使得光束被成形为线图案。LGC 510或其他光学部件成像系统的光束成形透镜被配置为将由光源511和512发射的光成形为线图案(例如,通过使用一个或多个鲍威尔透镜或其他光束成形透镜、衍射或散射部件)。例如,在一些实现中,由光源511和512发射的光可以被发送通过光学衍射光栅,以生成可以被投影到样本上的光学衍射光栅图案(SIM图案)。

[0088] LGC 510可以进一步包括镜514和半反射镜515,镜514和半反射镜515被配置为引导光束通过单个接口端口,引导到发射光学模块(EOM)530。光束可以穿过快门元件516。EOM 530可以包括物镜535和z台536,z台536使物镜535在纵向上靠近或远离目标550移动。例如,目标(例如,图案化流动池)550可以包括液体层552和半透明盖板551,并且生物样本可以位于半透明盖板的内表面处以及位于液体层下方的衬底层的内表面处。z台然后可以移动物镜,以将光束聚焦到流动池的任一内表面上(例如,聚焦在生物样本上)。生物样本可以是DNA、RNA、蛋白质或本领域已知的对光学测序有响应的其他生物材料。

[0089] EOM 530可包括半反射镜533,以将从聚焦跟踪模块(FTM)540发射的聚焦跟踪光束反射到目标550上,然后将从目标550返回的光反射回到FTM 540中。FTM 540可以包括聚焦跟踪光学传感器,以检测所返回的聚焦跟踪光束的特性,并生成反馈信号来优化物镜535在目标550上的聚焦。

[0090] EOM 530还可以包括半反射镜534,以引导光通过物镜535,同时允许从目标550返回的光通过。在一些实现中,EOM 530可以包括管透镜532。透射通过管透镜532的光可以穿过过滤器元件531并进入相机组件520。相机组件520可以包括一个或多个光学传感器521(例如,TDI线扫描传感器),以检测响应于入射光束而从生物样本发射的光(例如,响应于从光源511和512接收的红色光和绿色光的荧光)。在一个示例中,LGC(例如上述的LGC)可以借助衍射光栅将光投影,以生成线性条纹图案。

[0091] 来自相机组件520的传感器的输出数据可以被传送到实时分析电路525。在各种实现中,实时分析电路525执行用于以下操作的计算机可读指令:分析图像数据(例如,图像质量评分、碱基称呼等)、将光束的特性(例如,聚焦、形状、强度、功率、亮度、位置)报告或显示给图形用户界面(GUI)等。这些操作可以在成像周期期间实时执行,以将下游分析时间最小化、并在成像运行期间提供实时反馈和故障排除。在实现中,实时分析电路525可以是通信地耦合到成像系统500并控制成像系统500的计算设备(例如,计算设备1100)。在下面进一步描述的实现中,实时分析电路525可以附加地执行用于校正从相机组件520接收的输出图像数据中的失真的计算机可读指令。

[0092] 图6A-图6C表示不对称图案化流动池的TDI线扫描的一个示例表示,其中SIM被用于增加沿着流动池的一个轴线的分辨率。特别地,图6A图示了不对称图案化流动池620(其可以是不对称图案化流动池320(图3C)的一个实现)),其上覆盖有SIM图案630。可以沿着y轴线执行TDI线扫描,以逐行捕获不对称图案化流动池620的图像。在第一相位中,利用SIM图案630来捕获在图6A中捕获的图像。

[0093] 例如,线扫描成像系统500可以与系统的光学元件配合使用LGC 510,以利用具有在红色光谱内的波长的光对样本(覆盖有SIM图案,即光学衍射光栅图案)进行线扫描,并利

用具有在绿色光谱内的波长的光对样本进行线扫描。响应于线扫描,位于样本的不同斑点处的荧光染料可以发出荧光,并且所产生的光可以由物镜535收集,并且被引导到相机组件520的图像传感器,以检测荧光。例如,每个斑点的荧光可以由相机组件520的几个像素进行检测。从相机组件520输出的图像数据然后可以被传送到实时分析电路525来进行处理(例如,以将图像组合以形成条带)。

[0094] 图6B图示了覆盖有SIM图案630的不对称图案化流动池620。然而,在图6B中,SIM图案630已沿着x轴线相移(与需要分辨率增加来对样本进行解析的轴线对准)。如上所述,线扫描成像系统500可以与系统的光学元件配合使用LGC 510,来对样本(覆盖有经相移的SIM图案630)进行线扫描。图像可以被捕获并且从相机组件520输出,并且再次传送到实时分析电路525以进行处理。

[0095] 图6C图示了覆盖有SIM图案630的不对称图案化流动池620。在图6C中,SIM图案630已沿着x轴线相移到第三相位(与需要分辨率增加以对样本进行解析的轴线对准)。再次,线扫描成像系统500可以与系统的光学元件配合使用LGC 510,来对样本(覆盖有经相移的SIM图案630)进行线扫描。图像可以被捕获并且从相机组件520输出,并且再次传送到实时分析电路525以进行处理。根据每个相位/相移捕获的图像可以通过实时分析电路525被组合成单个图像,并被重新变换到真实空间中,以生成沿着x轴线(在该示例中)具有较高分辨率的图像。

[0096] 在另一实现中,如图6D所示,流动池620的不同部分可以被在其不同相位中的SIM图案630覆盖。即,第一相位630A中的SIM图案沿着流动池620的下部覆盖,第二相位630B中的相同SIM图案沿着流动池620的中部覆盖,并且再次,第三相位630A中的相同SIM图案沿着流动池620的上部覆盖。因此,线扫描成像系统500对覆盖有不同相位(630A-630B)的SIM图案的流动池620进行线扫描,使得线扫描成像系统500在单次运行中可以根据SIM图案的每个必要相位对整个流成像。在一些实现中,可以将线扫描成像系统500修改为具有多个LGC和多个相机或传感器/相机组件(例如,三个),其中每一个借助三个光学衍射光栅(相同、但以不同相位定向)生成并输出光,以生成SIM图案的三个相位。以这种方式,每个相机或传感器/相机组件能够同时捕获流动池620沿着不同SIM图案相位的图像。

[0097] 如上面所提到的,在再一些其他实现中,可以在SIM图案保持静止的同时移动样本/流动池。当实现TDI线扫描时,样本/流动池已在移动。因此,可以利用样本/流动池的该移动来避免必须将SIM图案移位。即,样本/流动池相对于静止SIM图案的移动生成解析样本所需的必要相位。

[0098] 图7图示了类似于六边形阵列图案化流动池300(图3A)的另一示例性图案化流动池720。在常规的结构化照明成像系统中,流动池720可以例如在y轴线的方向上进行线扫描。由LGC(例如,LGC 510(图5))输出到流动池720中的样本上的光束强度被示出为沿着x轴线(未示出,但基本上或确切地垂直于线扫描方向)较宽且均匀。然而,沿着y轴线,光束的强度较窄。随着激光束相对于流动池720移动,荧光图像由线扫描相机或传感器(例如,相机组件520(图5))在被光束照射的对应区域中捕获。

[0099] 然而,利用样本/流动池720已经在移动的事实,并且由于只需要一维SIM来解析不对称图案化流动池(例如,流动池320(图3C))中的样本,因此产生SIM图案的光学衍射光栅可以保持静止。即,需要必要的多个(例如,三个)相位来对样本进行充分解析。因此,在该实

现中,不需要常规的线扫描成像系统中的移动台或用于移动(例如旋转或平移)光学衍射光栅所需的其他元件。

[0100] 图8图示了使用静止光学衍射光栅的一个示例性线扫描成像系统800。应注意,为了便于说明,图8是简化图示,其中未示出所有特征/元件。然而,线扫描系统800可以是线扫描成像系统500的一个实现,其使用静止光学衍射光栅,以使所得的光学衍射光栅图案/SIM图案保持静止。

[0101] 在图8的示例中,光发射器(例如,激光器802)被配置为输出光束,该光束由准直透镜804进行准直。在一个实现中,激光器802发射绿色波长的光。经准直的光被二向色过滤器806引导通过静止光学衍射光栅812,经由另一二向色过滤器828引导至物镜830,并引导到样本容器832的样本上。在该实现中,样本容器830是不对称图案化流动池(诸如,流动池320(图3C))。

[0102] 第二光发射器(例如,激光器808)发射光(例如,红色波长),该光通过静止光学衍射光栅812,还经由二向色过滤器828,到达物镜830,并发射到样本容器832的样本上。样本容器832被定位在台840上,台840可以使样本容器832相对于来自激光器802和808的光束移动。在荧光样本的情况下,样本响应于结构化激发光(来自激光器802和808的激光束)发出荧光,并且所产生的光由物镜828收集,并被引导至相机814和820的图像传感器。

[0103] 二向色过滤器806用于使来自激光器802的绿色光束通过,然后继续穿过静止光学衍射光栅812,同时朝向静止光学衍射光栅812反射来自激光器808的红色光束。二向色过滤器828的功能类似,它允许来自激光器802和808的红色光束和绿色光束被反射到物镜830,同时允许相机814和820分别捕获利用绿色光和红色光发出荧光的图像。二向色过滤器816将来自发出荧光的样本的绿色光发射引导到相机814,而二向色过滤器822将来自发出荧光的样本的红色光发射引导到相机820。透镜818和824分别是用于相机814和820的准直透镜。二向色镜826将来自发出荧光的样本的绿色光发射和红色光发射引导至合适的相机。

[0104] 在线扫描系统800中,光学衍射光栅812是静止的。即,如先前所讨论的,通过结合SIM使用不对称图案化流动池,仅需要一个维度的结构化照明,并且可以通过沿着流动池移动光束来实现多个相位。换言之,激光束相对于样本/流动池的移动或样本/流动池相对于激光束的移动(导致样本和条纹激发图案之间的相对移动)是生成不同相位所需的全部。

[0105] 图9图示了图案化流动池920,图案化流动池920可以使用诸如线扫描系统800的线扫描成像系统进行线扫描。光学衍射光栅图案可以被投影到流动池920上,而流动池920根据线扫描成像技术移动。如前所述,流动池920相对于静止光学衍射光栅图案的移动创建必要的相移,并且在线扫描期间捕获的图像一旦被组合并重新变换到真实空间中就增加分辨率。

[0106] 特别地,光束沿着y轴线方向移动。再次,光束的强度沿着x轴线(未示出)是均匀的,但是沿着y轴线的强度由于通过静止光学衍射光栅(例如,静止光学衍射光栅812(图8))而被调制。随着光束相对于流动池920移动,光学衍射光栅图案移位。实际上,可以生成超过三个甚至几十个相移。结果,通过移动样本/流动池920而不是光学衍射光栅,可以实现沿着线扫描的轴线的分辨率的增加。在一些实现中,如上所述,在具有随机特征或周期性图案的表面上,该方向上的分辨率可以增加至少两倍。应当理解,因为可以将分辨率增加例如至少两倍,所以可以将流动池920中的纳米阱的密度提高两倍或更多。

[0107] 图10是图示示例操作的流程图,该示例操作可以在诸如线扫描成像系统500(图5)或线扫描成像系统800(图8)的线扫描成像系统中执行,以使用不对称图案化流动池对样本进行测序。在操作1000处,来自激光源(例如,激光源802和808)的光束被输出通过静止光学衍射光栅(例如,静止光学衍射光栅812)(对应于第一光学衍射光栅图案定向可以被开启)。在操作1010处,将光学衍射光栅图案投影到样本上,并且在操作1020处,对样本进行线扫描。可以如先前关于线扫描成像系统800(图8)所描述的那样执行线扫描。在操作1030处,根据上述线扫描技术移动样本,或者还如上所述,可以移动被引导的光,以实现样本与光学衍射光栅图案之间的相对运动。

[0108] 可以根据需要多次重复操作1020和1030,以捕获表示整个样本的图像。再次,由于样本相对于静止光学衍射光栅图案移动,因此可以跨增加分辨率所需的必要相移来捕获样本和光学衍射光栅图案的图像。在操作1040处,可以重新构建高分辨率图像。

[0109] 应当注意,为了防止在线扫描期间在光学衍射光栅图案和样本之间的运动模糊,激光源可以以脉冲方式操作。即,可以对激光源(例如,激光源802和808)进行脉冲化,使得在每次激发时,可以捕获线扫描图像。在一些实现中,光学衍射光栅图案相对于样本/流动池的定向可以被移位90°。在其他实现中,如图6A-图6C所示,如果光学衍射光栅图案的定向使得样本没有移动通过明暗区域(如果光学衍射光栅图案的定向移位90°,可能是这种情况),则由于样本相对于光学衍射光栅图案的移动移动通过相同的条纹强度,因此可能不需要激光源的脉冲化。

[0110] 应注意,虽然主要在使用衍射光栅以创建被投影到成像样本上的条纹图案的上下文中描述了本文所述的实现,但是在实现中,所投影的条纹图案不需要必定由衍射光栅创建。创建正弦条纹图案的任何方法可以是合适的。条纹图案的创建可以经由以下方式达成:在两个反向传播的、在所期望的干涉图案的点处彼此相干的光束之间的干涉;衍射光栅的相干或不相干成像;经由分束器分离的并且干涉的光束;在光管道或波导中反向传播的光束等。

[0111] 图11图示了示例计算部件,其可以用于实现本文所公开的系统和方法的各种特征(诸如,在系统200、500和/或800以及本文所述系统中实现的图4和图10中示出的方法的一个或多个方面的前述特征和功能)。例如,计算部件可以被实现为实时分析电路525。

[0112] 如本文所使用的,术语电路可以描述可以根据本申请的一个或多个实现执行的给定功能单元。如本文所使用的,可以利用任何形式的硬件或硬件和软件的组合来实现电路。例如,一个或多个处理器、控制器、ASIC、PLA、PAL、CPLD、FPGA、逻辑部件、软件例程或其他机构可以被实现为构成电路。在实现中,本文描述的各种电路可以被实现为分立电路,或者所描述的功能和特征可以在一个或多个电路之间部分或全部共享。换言之,本领域普通技术人员在阅读了本说明书之后可以理解,本文描述的各种特征和功能可以在任何给定的应用中实现,并且可以以各种组合和排列在一个或多个单独的或共享的电路中实现。即使可以将各种特征或功能元件独立描述或要求保护为单独的模块,但是本领域普通技术人员将理解,这些特征和功能可以在一个或多个共用软件和硬件元件之间共享,并且这种描述不应要求或暗示使用单独的硬件或软件部件来实现这样的特征或功能。

[0113] 在使用软件全部或部分地实现应用的部件或电路的情况下,在一个实现中,这些软件元件可以被实现为与能够执行关于其描述的功能的计算或处理模块一起操作。图11中

示出了一个这样的示例计算部件。根据该示例计算部件1000描述了各种实现。在阅读了本说明书之后,对于相关领域的技术人员而言,如何使用其他计算模块或架构来实现该应用将变得显而易见。

[0114] 现在参考图11,计算部件1000可以表示例如在以下内找到的计算或处理能力:台式计算机、膝上型计算机、笔记本计算机、和平板计算机;手持式计算设备(平板电脑、PDA、智能电话、蜂窝电话、掌上电脑等);大型机、超级计算机、工作站或服务器;或对于给定的应用或环境可以是所期望的或合适的任何其他类型的专用或通用计算设备。计算部件1000还可以表示嵌入在给定设备内或以其他方式可用于给定设备的计算能力。例如,可能在其他电子设备(诸如例如,数码相机、导航系统、蜂窝电话、便携式计算设备、调制解调器、路由器、WAP、终端、和可以包括某种形式的处理能力的其他电子设备)中找到计算部件。

[0115] 计算部件1000可以包括例如一个或多个处理器、控制器、控制模块或其他处理设备(诸如,处理器1004)。处理器1004可以使用通用或专用处理引擎(例如诸如,微处理器、控制器或其他控制逻辑)来实现。在所示的示例中,处理器1004被连接到总线1002,但是任何通信介质都可以用于便于与计算部件1000的其他部件的交互或进行外部通信。

[0116] 计算部件1000还可以包括一个或多个存储器模块(在本文中简称为主存储器1008)。例如,优选地,随机存取存储器(RAM)或其他动态存储器可以用于存储待由处理器1004执行的信息和指令。在执行待由处理器1004执行的指令期间,主存储器1008还可以用于存储临时变量或其他中间信息。计算部件1000可以同样包括耦合到总线1002以存储用于处理器1004的静态信息和指令的只读存储器(“ROM”)或其他静态存储设备。

[0117] 计算部件1000还可以包括一个或多个各种形式的信息存储机构1010,信息存储机构1010可以包括例如介质驱动器1012和存储单元接口1020。介质驱动器1012可以包括驱动器或其他机构来支持固定或可移除存储介质1014。例如,可以提供硬盘驱动器、固态驱动器、磁带驱动器、光盘驱动器、CD或DVD驱动器(R或RW)或其他可移除或固定介质驱动器。因此,存储介质1014可以包括例如硬盘、固态驱动器、磁带、盒、光盘、CD、DVD或蓝光、或由介质驱动器1012读取、写入或访问的其他固定或可移除介质。如这些示例所示,存储介质1014可以包括其中存储有计算机软件或数据的计算机可用存储介质。

[0118] 在备选示例中,信息存储机构1010可以包括用于允许将计算机程序或其他指令或数据加载到计算部件1000中的其他类似工具。这种工具可以包括例如固定或可移除存储单元1022和接口1020。这种存储单元1022和接口1020的示例可以包括程序盒和盒式接口、可移除存储器(例如,闪速存储器或其他可移除存储器模块)和存储器插槽、PCMCIA插槽和卡、以及其他固定或可移除存储单元1022和接口1020,其允许将软件和数据从存储单元1022传输到计算部件1000。

[0119] 计算部件1000还可以包括通信接口1024。通信接口1024可以用于允许软件和数据在计算部件1000和外部设备之间传输。通信接口1024的示例可以包括调制解调器或软调制解调器、网络接口(诸如,以太网、网络接口卡、WiMedia、IEEE 802.XX或其他接口)、通信端口(诸如例如,USB端口、IR端口、RS232端口Bluetooth®接口或其他端口)或其他通信接口。经由通信接口1024传输的软件和数据通常可以被承载在信号上,信号可以是电子信号、电磁信号(其包括光学信号)或能够由给定通信接口1024交换的其他信号。这些信号可以经由通道1028提供给通信接口1024。该通道1028可以承载信号,并且可以使用有线或无线通

信介质来实现。通道的一些示例可以包括电话线、蜂窝链路、RF链路、光学链路、网络接口、局域网或广域网、以及其他有线或无线通信通道。

[0120] 在本文中,术语“计算机可读介质”、“计算机可用介质”和“计算机程序介质”通常用于指代易失性或非易失性的非暂态介质(诸如例如,存储器1008、存储单元1022和介质1014)。这些和其他各种形式的计算机程序介质或计算机可用介质可以涉及将一个或多个指令的一个或多个序列运送给处理设备来执行。介质上体现的这种指令通常称为“计算机程序代码”或“计算机程序产品”(其可以以计算机程序或其他分组的形式进行分组)。当执行时,这种指令可以使得计算模块1000能够执行本文所讨论的本申请的特征或功能。

[0121] 尽管以上针对各种示例和实现进行了描述,但是应当理解,在一个或多个个体实现中描述的各种特征、方面和功能的适用性并不限于用于描述它们的特定实现,相反,可以独自地或以各种组合应用于本申请的一个或多个其他实现,而无论是否描述了这种实现以及这种特征是否作为所描述的实现的一部分被呈现。因此,本申请的广度和范围不应受到任何上述示例实现的限制。

[0122] 应当理解,前述概念的所有组合(假设这种概念并不相互矛盾)被认为是本文所公开的发明主题的一部分。特别地,出现在本公开的结尾处的所要求保护的主题的所有组合被认为是本文所公开的发明主题的一部分。

[0123] 在包括权利要求书的整个本公开中使用的术语“基本上”和“大约”用于描述和考虑例如由于处理的变化而引起的小的波动。例如,它们可以指代小于或等于±5%、例如小于或等于±2%、例如小于或等于±1%、例如小于或等于±0.5%、例如小于或等于±0.2%、例如小于或等于±0.1%、例如小于或等于±0.05%。

[0124] 在适用的范围内,本文中的术语“第一”、“第二”、“第三”等仅用于将由这些术语描述的相应对象表示为单独的实体,并且除非本文另有明确说明,否则并不意味着表示按时间顺序的意义。

[0125] 除非另有明确说明,否则本文档中使用的术语和短语及其变体应解释为开放式的,而不是限制性的。作为前述示例:术语“包括”应理解为“包括但不限于”等;术语“示例”用于提供所讨论项的示例实例,而不是其穷举或限制性的列表;术语“一(a)”或“一个(an)”应理解为“至少一个”、“一个或多个”等;并且诸如“常规”、“传统”、“普通”、“标准”、“已知”的形容词和类似含义的术语不应解释为将所描述的项限制为给定时间段或给定时间可用的项,而是应理解为涵盖现在或将来任何时候可用或已知的常规、传统、普通或标准技术。同样地,在本文档涉及本领域普通技术人员可能显而易见或已知的技术的情况下,这种技术涵盖现在或将来任何时候对于技术人员显而易见或已知的技术。

[0126] 在某些情况下,诸如“一个或多个”、“至少”、“但不限于”或其他类似短语的拓宽单词和短语的存在不应被理解为在可能不存在这种拓宽短语的情况下意指或要求较窄范围的情况。

[0127] 附加地,根据示例框图、流程图和其他图示描述了本文阐述的各种实现。在阅读本文档之后,对于本领域的普通技术人员将变得显而易见的是,可以在不限于所示出的示例的情况下实现所示出的实现及其各种备选方案。例如,框图及其随附的描述不应被解释为要求特定的架构或配置。

[0128] 尽管上面已描述了本公开的各种实现,但是应当理解,它们仅以示例的方式给出,

并且不具有限制性。同样,各个附图可以描绘用于本公开的示例架构或其他配置,完成示例架构或其他配置来帮助理解在本公开中可以包括的特征和功能。本公开不限于所示出的示例架构或配置,而是可以使用各种备选架构和配置来实现期望的特征。实际上,可以如何实现备选功能、逻辑或物理分割和配置来实现本公开的期望特征,对于本领域的技术人员将是显而易见的。另外,可以将除本文描述的那些以外的许多不同的组成部件名称应用于各种分割。附加地,关于流程图、操作说明和方法权利要求,除非上下文另外指出,否则本文呈现步骤的顺序不应要求实现各种实现方式来以相同顺序执行所记载的功能。

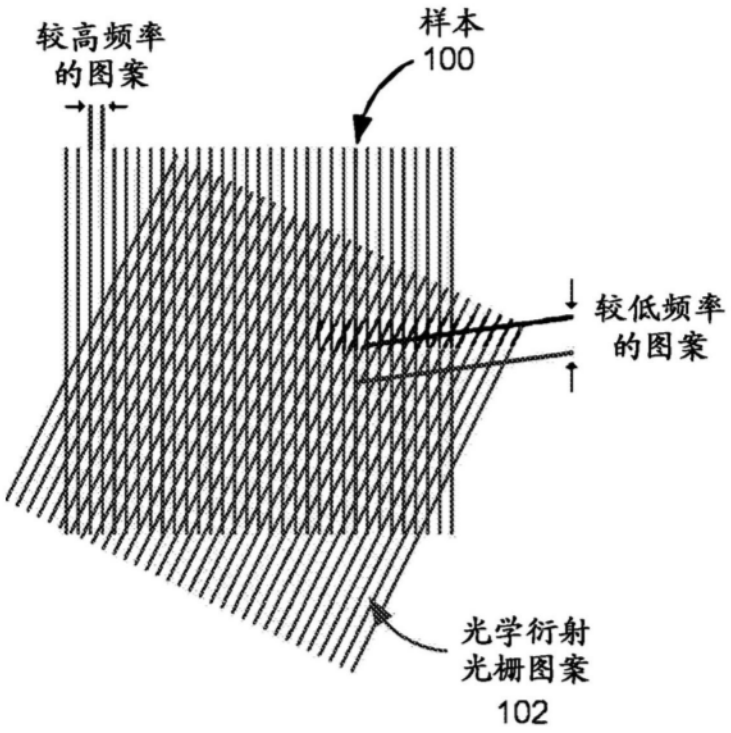


图1A

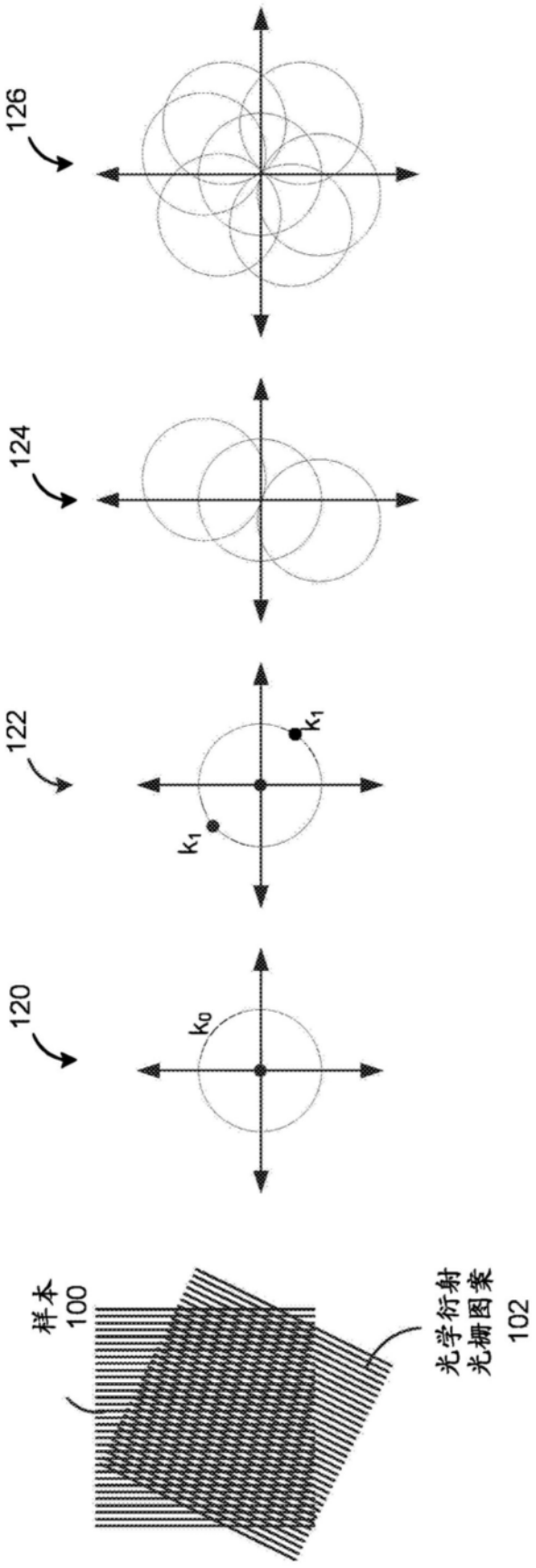


图1B

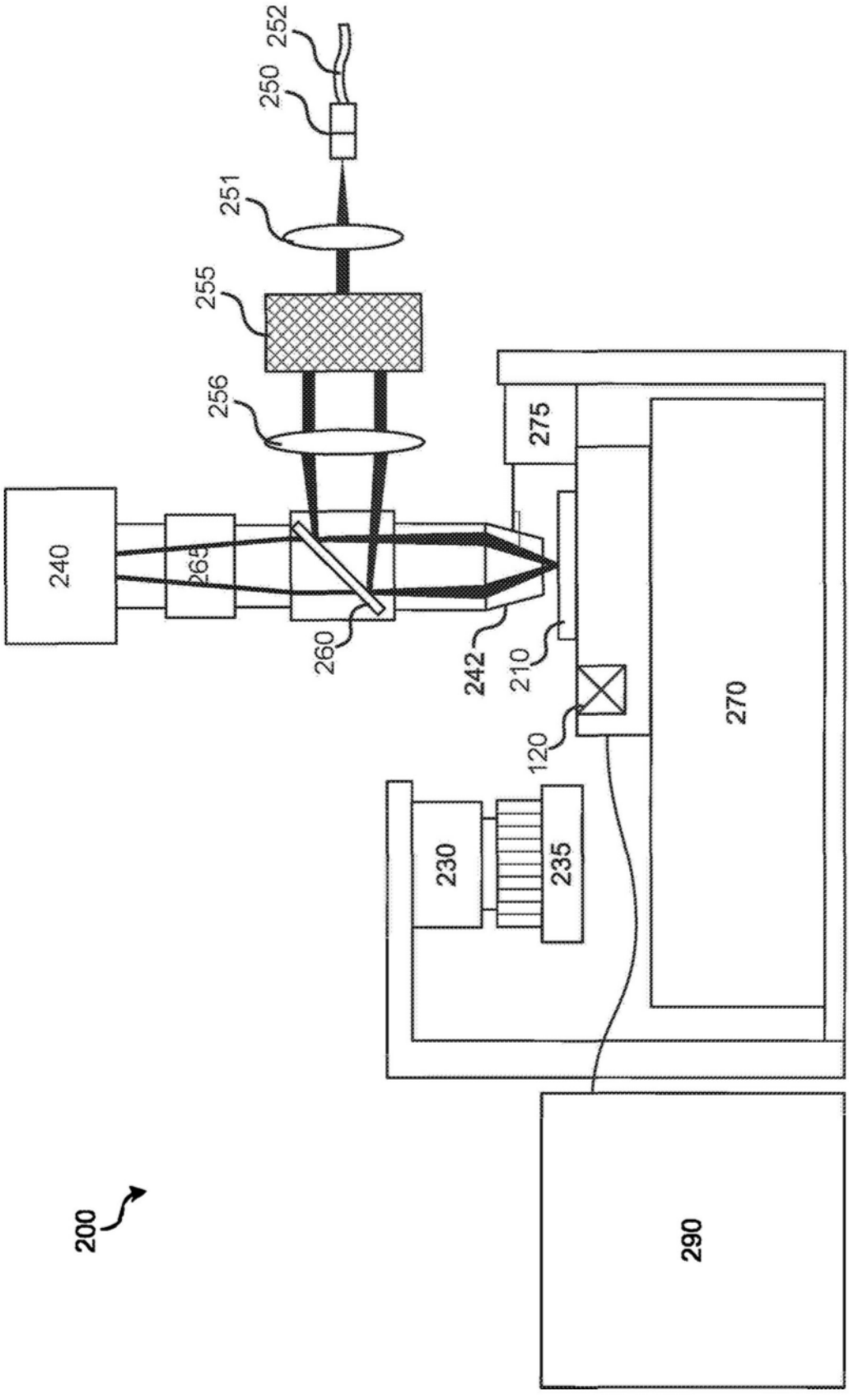

252
250
251
255
256
275
240
265
260
242
210
270
120
230
235
290
200

图2

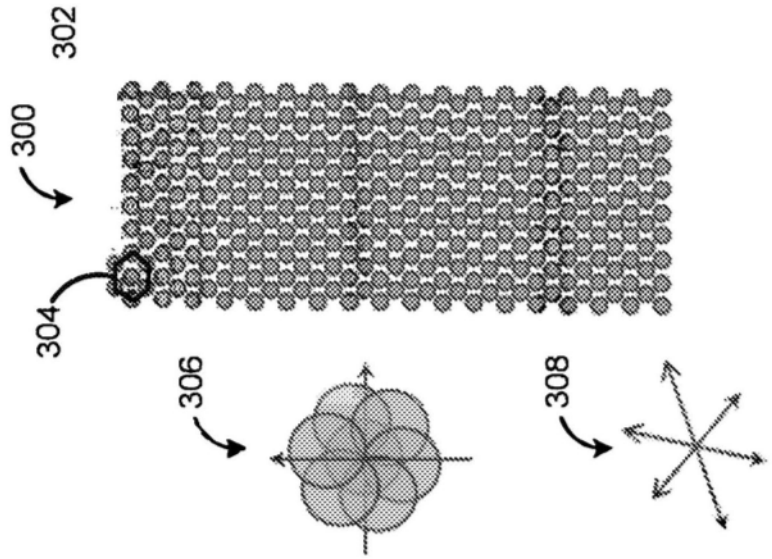


图3A

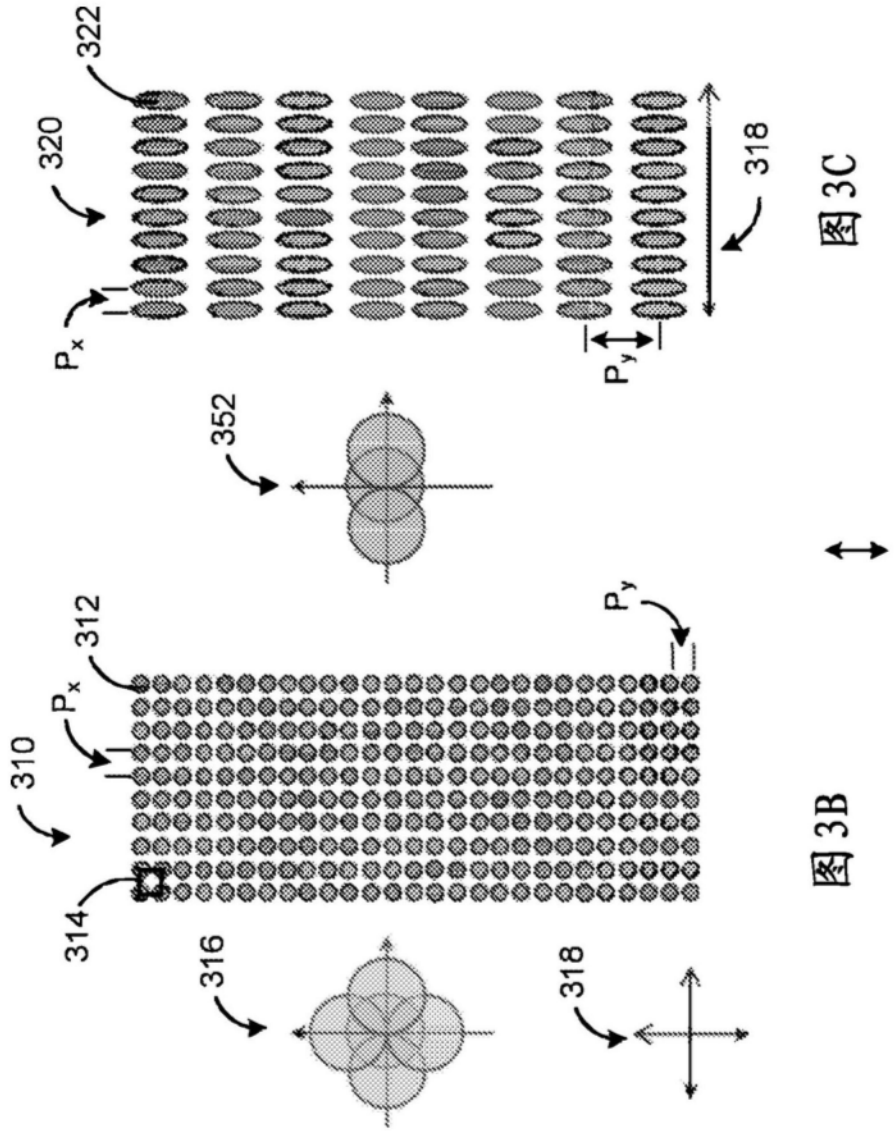


图 3C

图 3B

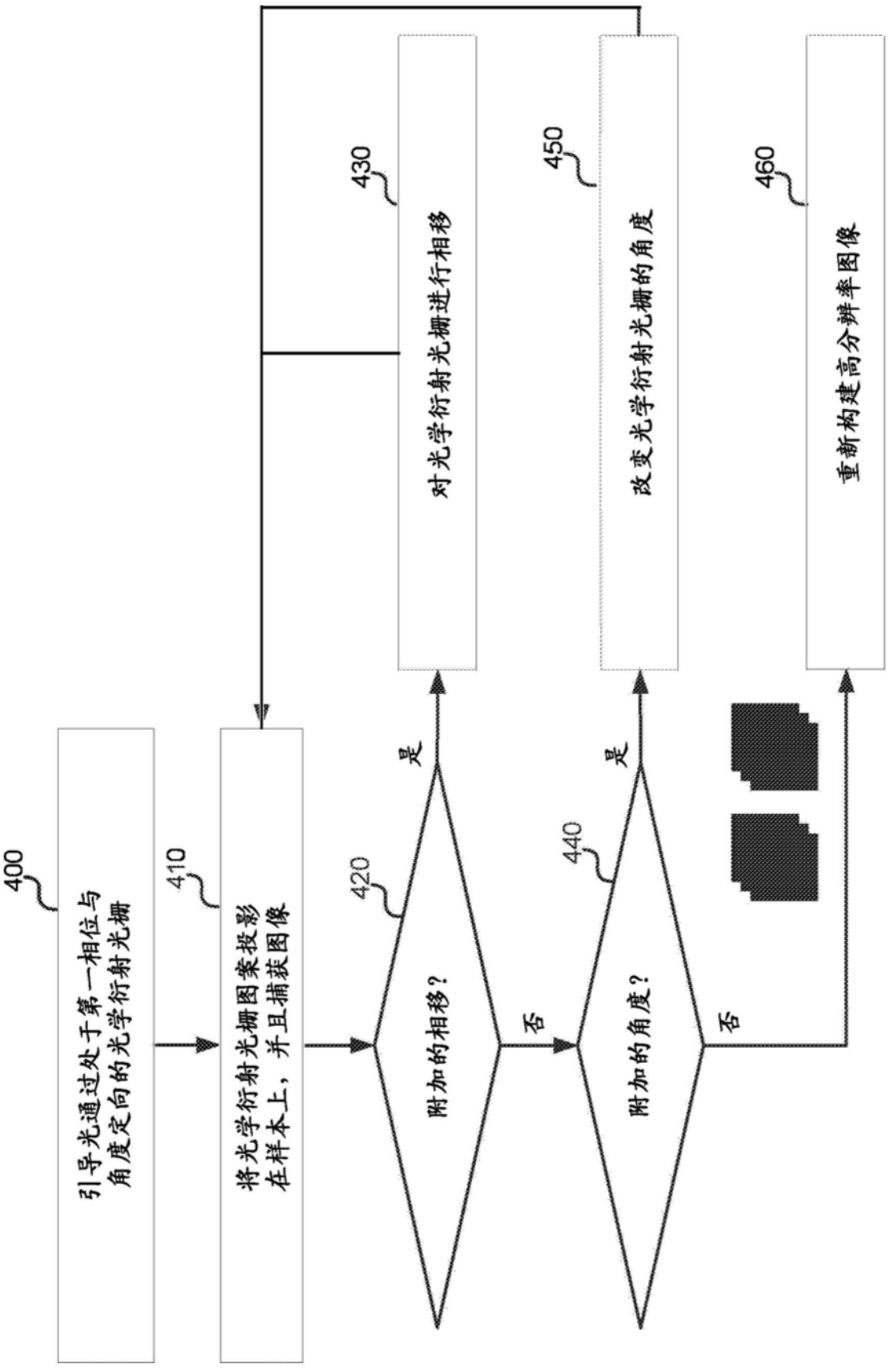

400
引导光通过处于第一相位与
角度定向的光学衍射光栅
410
将光学衍射光栅图案投影
在样本上，并且捕获图像
420
附加的相移？
是
否
430
对光学衍射光栅进行相移
440
附加的角度？
是
否
450
改变光学衍射光栅的角度
460
重新构建高分辨率图像

图4

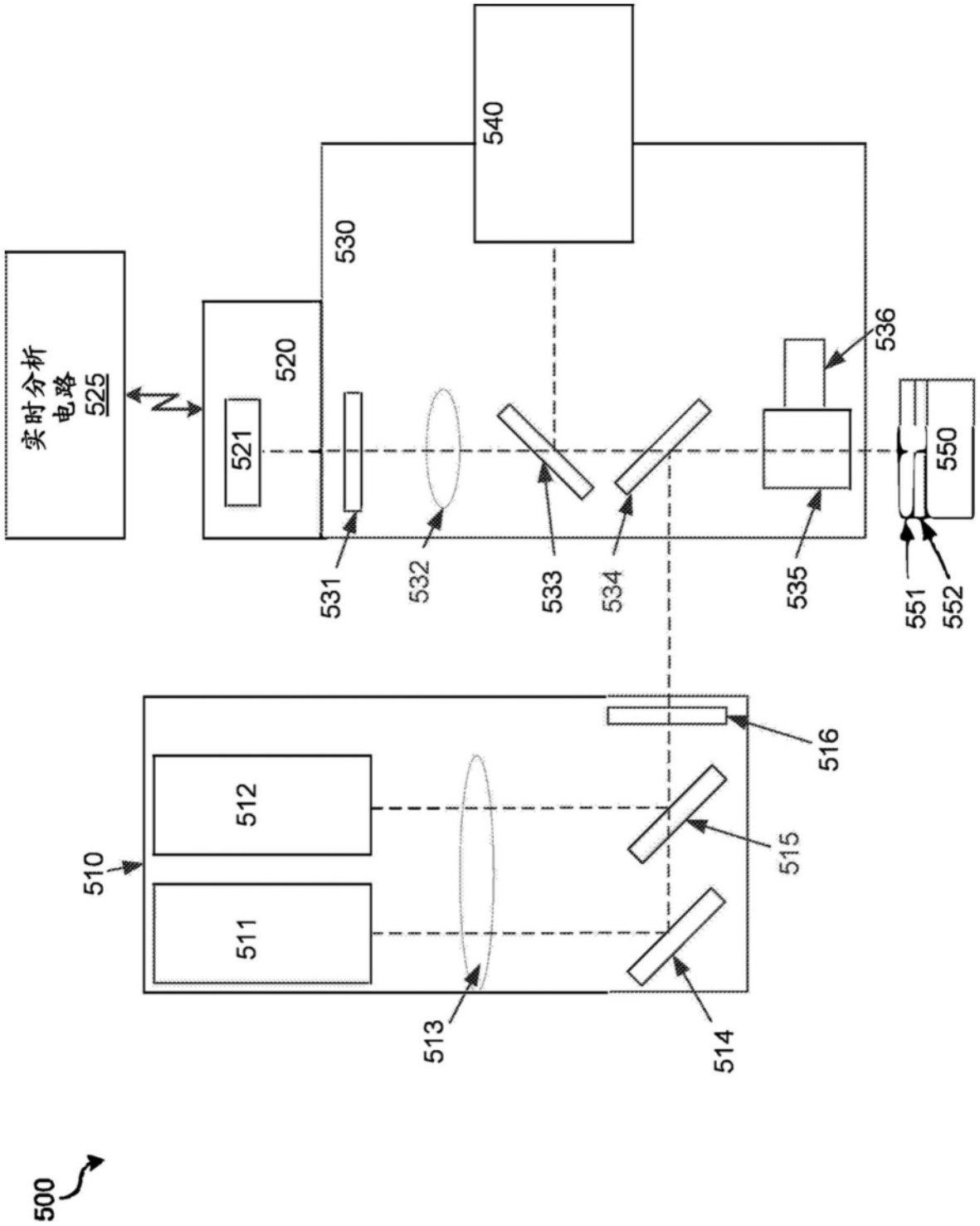

实时分析
电路
525
520
521
530
540
536
550
531
532
533
534
535
551
552
510
512
511
513
514
515
516
500

图5

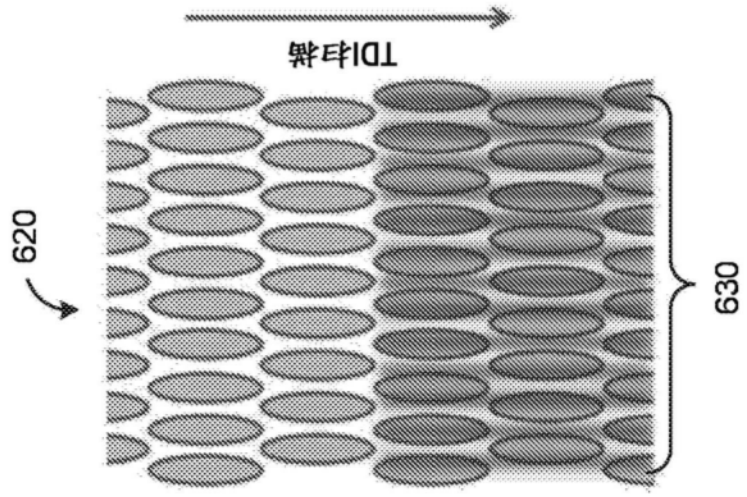


图6A

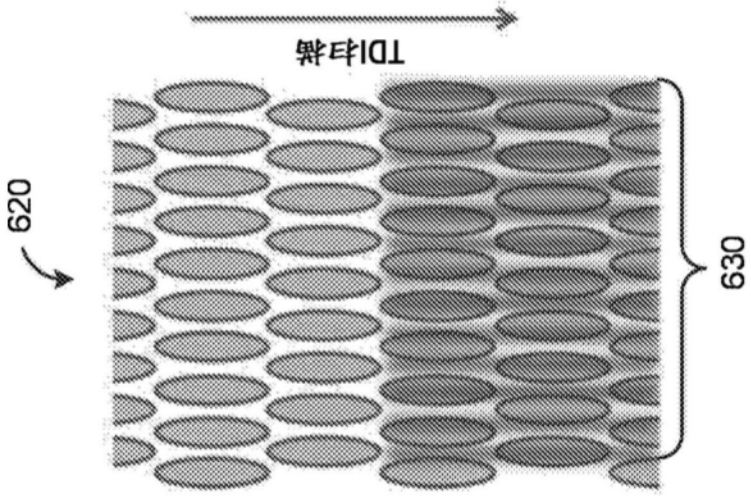


图6B

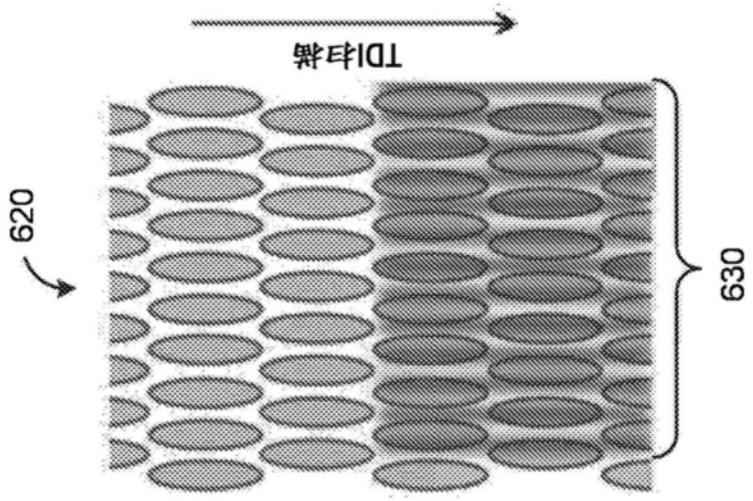


图6C

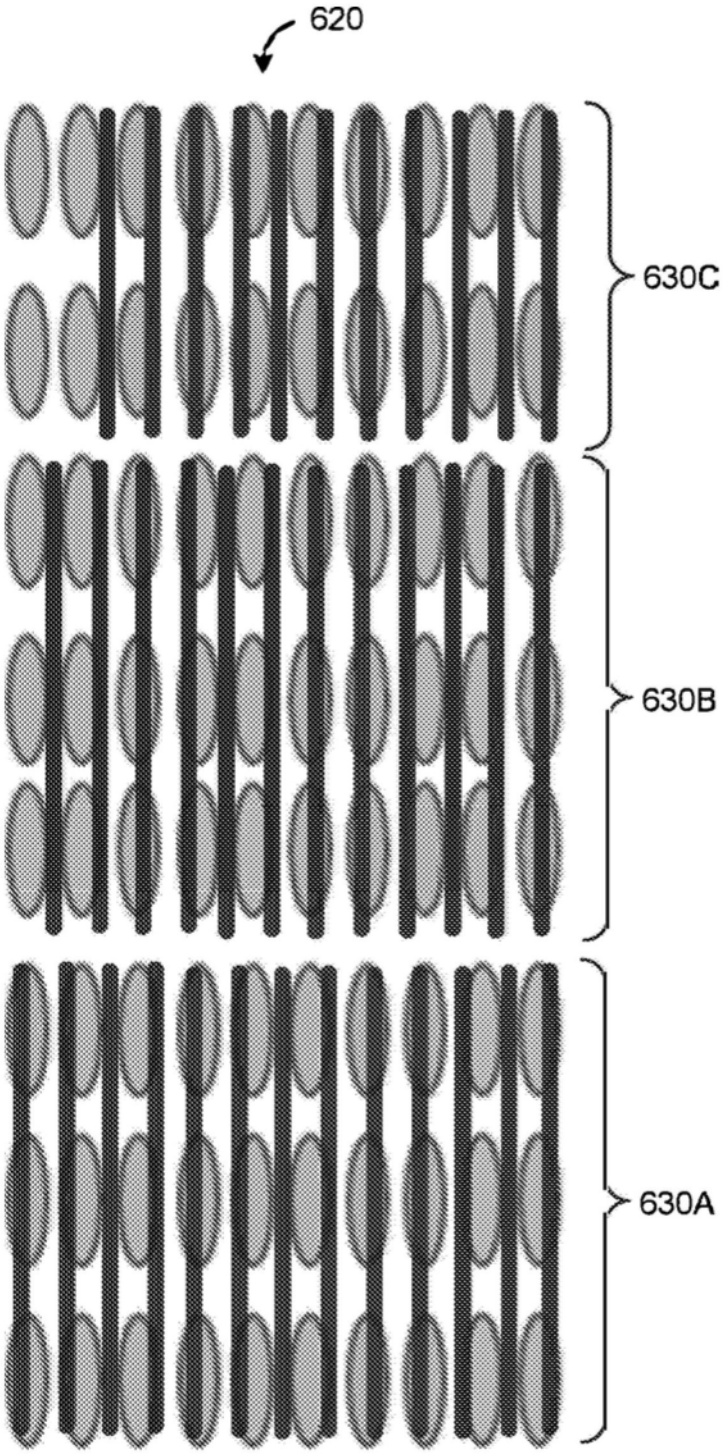


图6D

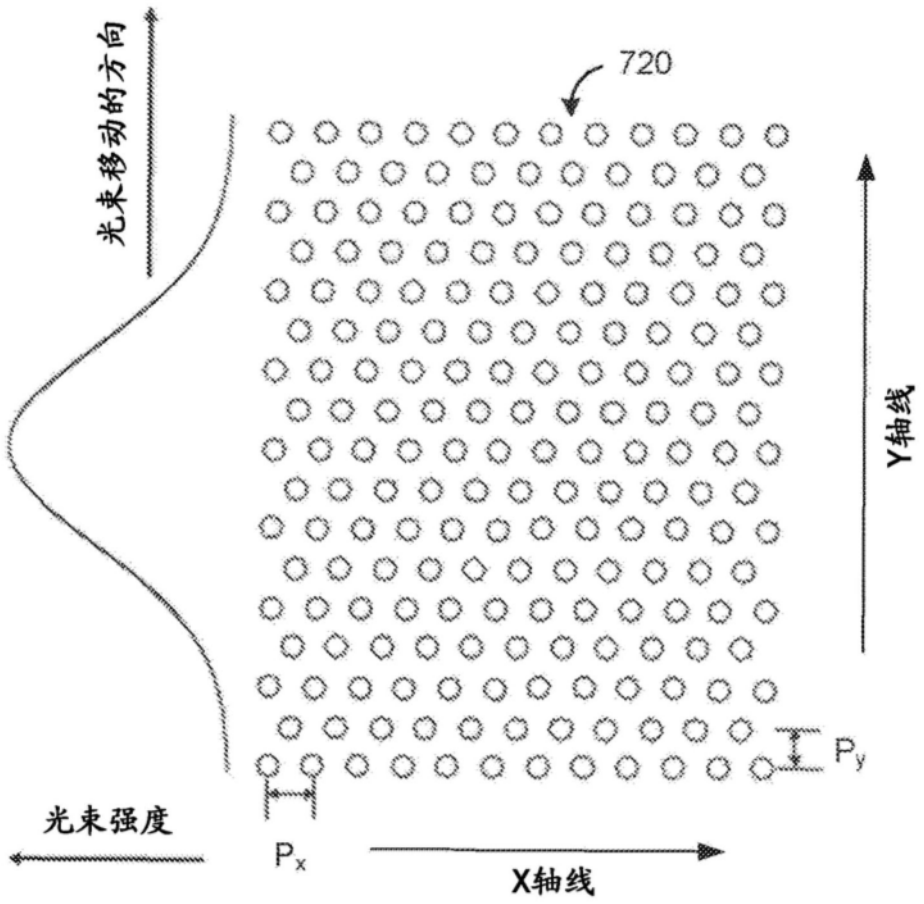


图7

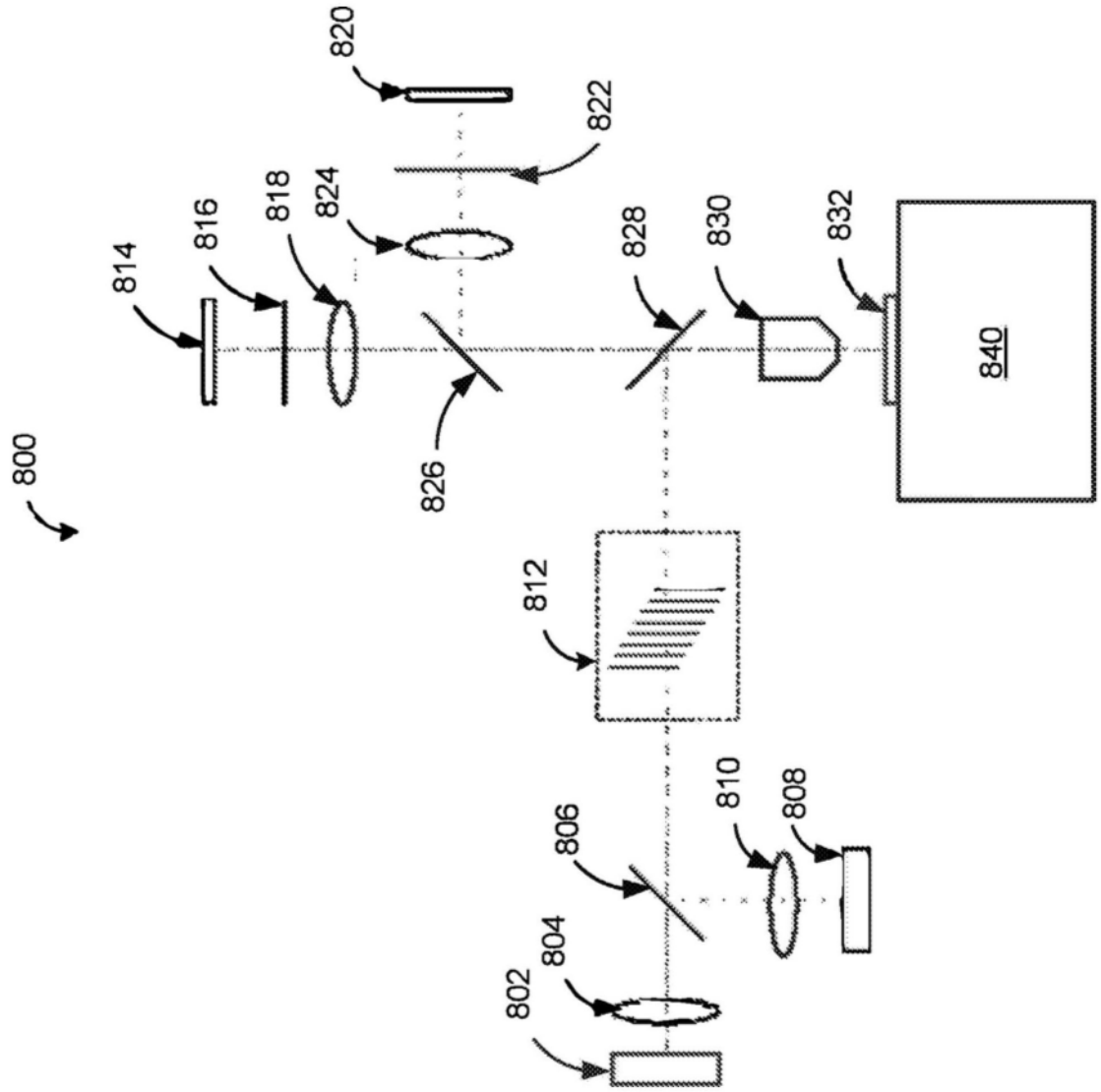

820
822
818
824
816
814
828
830
832
840
826
800
812
810
808
806
804
802

图8

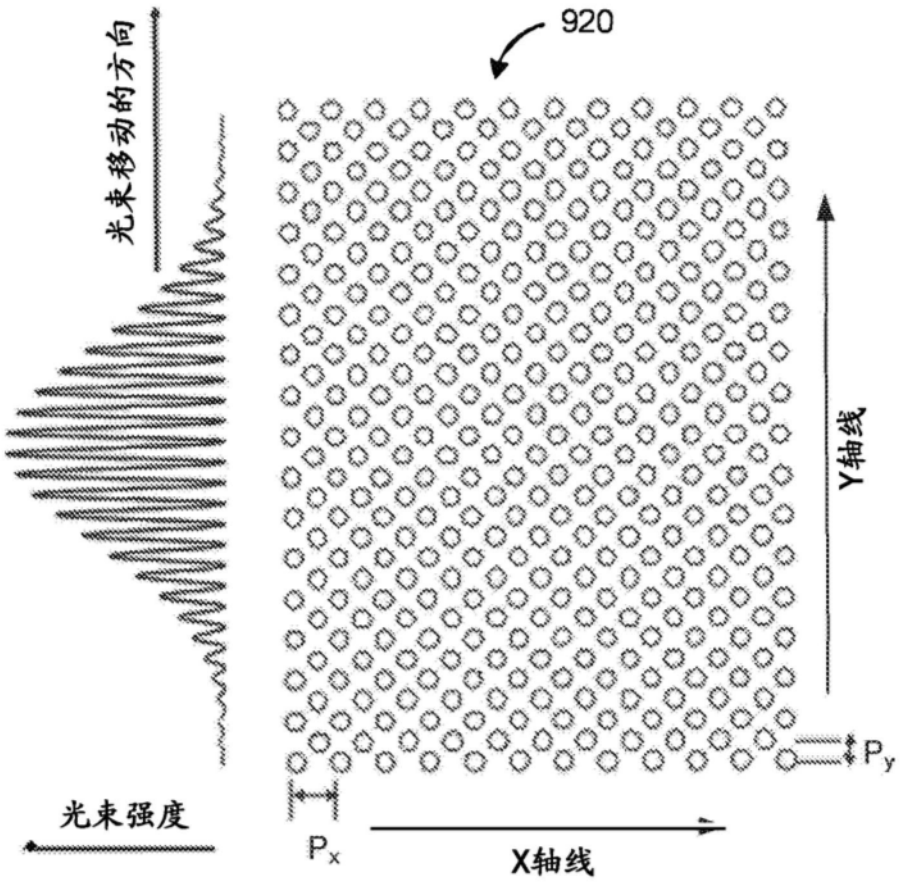


图9

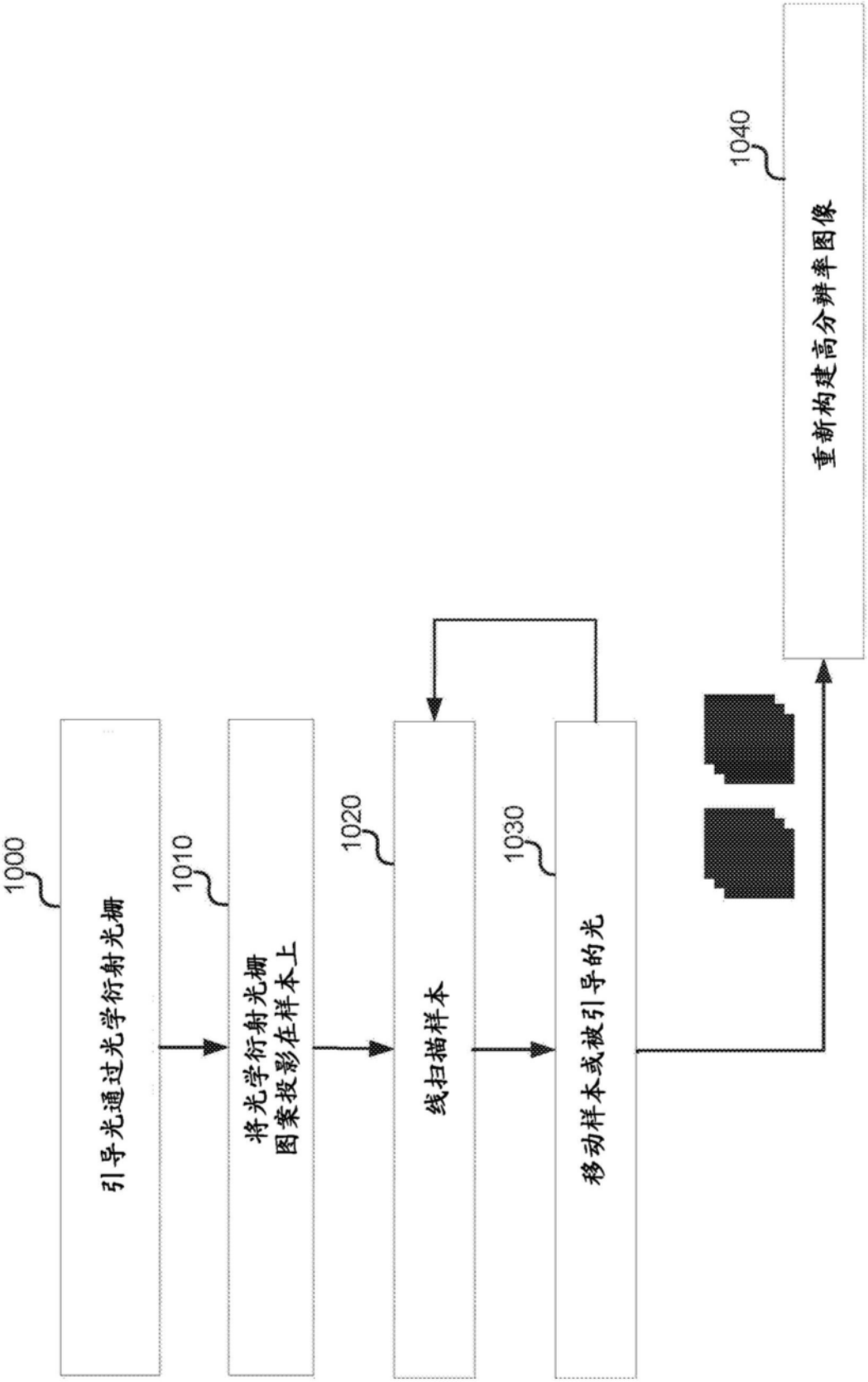

1000
引导光通过光学衍射光栅
1010
将光学衍射光栅
图案投影在样本上
1020
线扫描样本
1030
移动样本或被引导的光
1040
重新构建高分辨率图像

图10

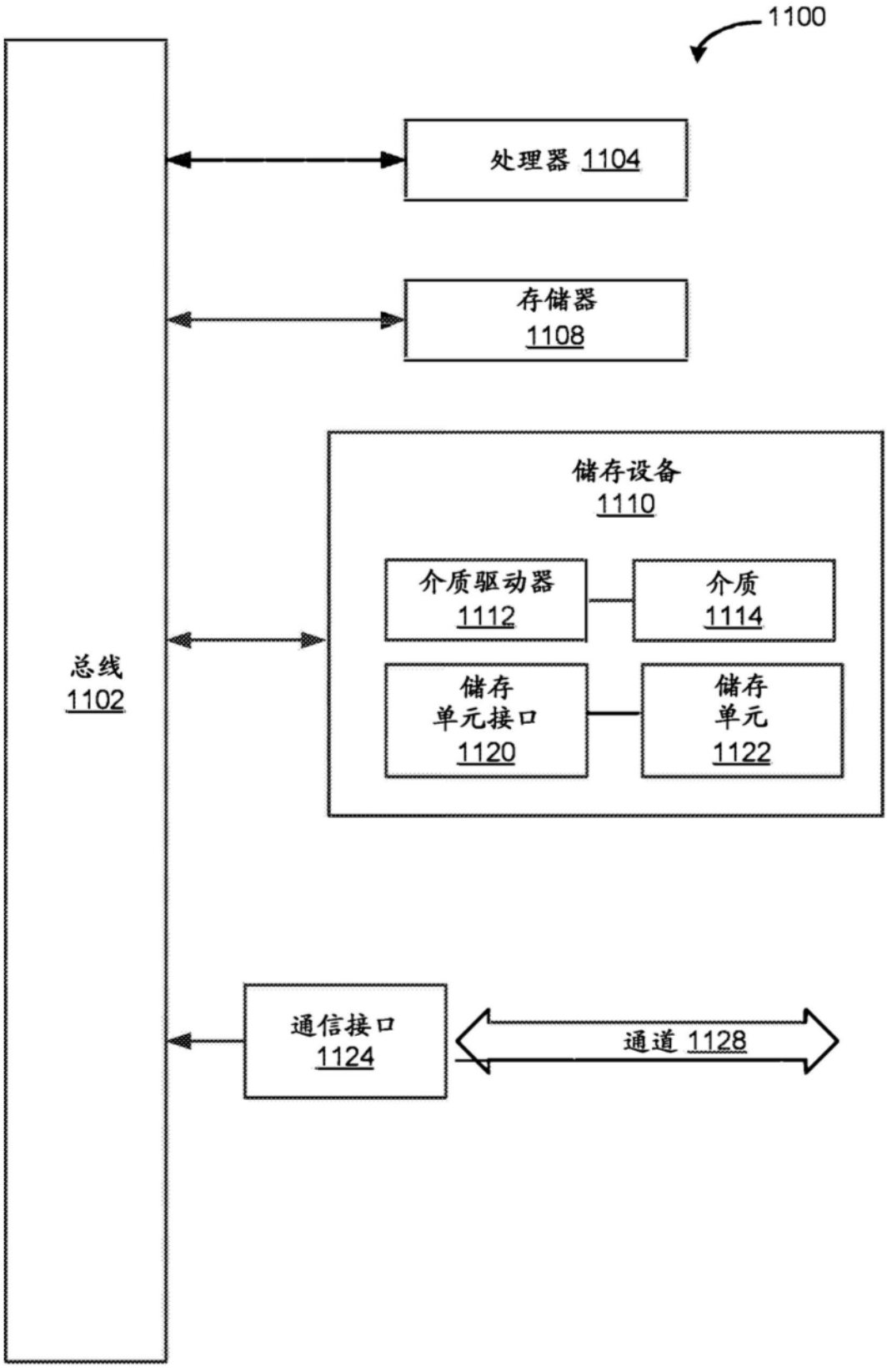

1100
处理器 1104
存储器
1108
储存设备
1110
介质驱动器
1112
介质
1114
储存
单元接口
1120
储存
单元
1122
总线
1102
通信接口
1124
通道 1128

图11

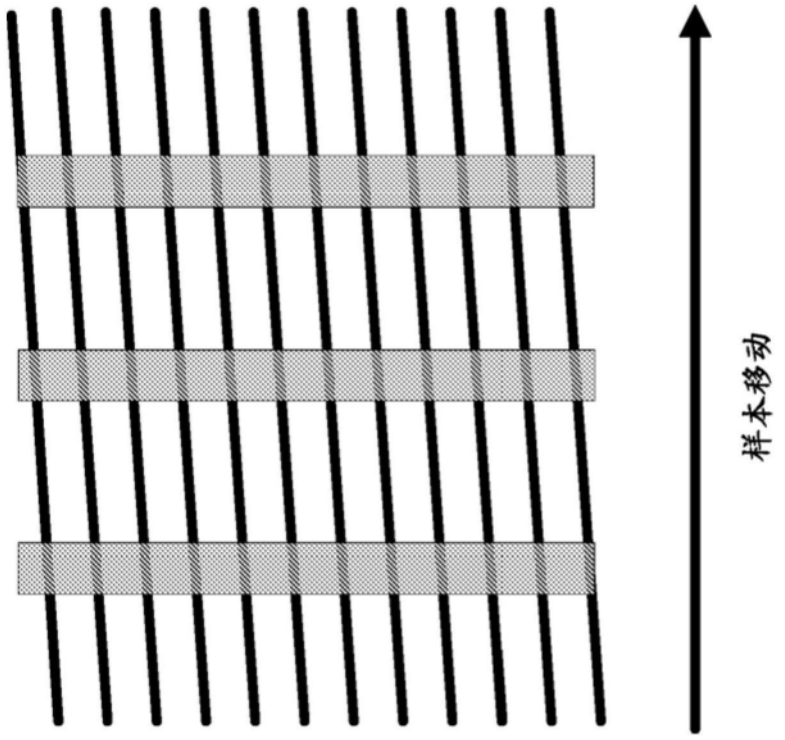


图12