



(21) 申請案號：109144629

(22) 申請日：中華民國 109 (2020) 年 12 月 17 日

(51) Int. Cl. :

*C12Q1/6841 (2018.01)**G01N21/64 (2006.01)**G02B21/16 (2006.01)**G02B21/36 (2006.01)**G06T5/00 (2006.01)**G06T5/20 (2006.01)**G06T5/50 (2006.01)**G06T7/00 (2017.01)*

(30) 優先權：2019/12/17 美國

62/949,391

(71) 申請人：美商應用材料股份有限公司 (美國) APPLIED MATERIALS, INC. (US)

美國

(72) 發明人：張蘊青 CHANG, YUN-CHING (TW)；謝丹 XIE, DAN (CN)；金 克洛伊 KIM,

CHLOE (US)

(74) 代理人：李世章；彭國洋

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：45 項 圖式數：10 共 72 頁

(54) 名稱

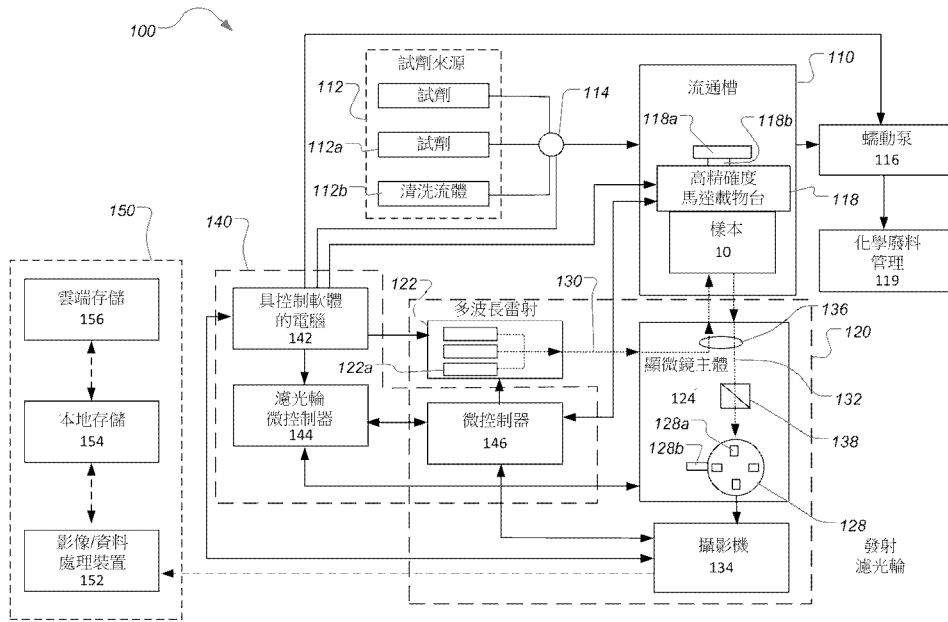
用於多工螢光原位雜合影像之獲取及處理的系統及方法

(57) 摘要

在一種螢光原位雜合成像系統中，作為巢狀迴圈地進行以下步驟：(1)一閥依序將一流通槽耦接至複數個不同試劑來源，以將樣本暴露至複數個不同試劑，(2)對於該複數個不同試劑的各試劑，一馬達依序將螢光顯微鏡相對於位於複數個不同視野處之樣本定位，(3)對於該複數個不同視野中的各視野，一可變頻激發光源依序發射複數個不同波長，(4)對於該複數個不同波長中的各波長，一致動器依序將該螢光顯微鏡相對於位於複數個不同垂直高度處之樣本定位，及(5)對於該複數個不同垂直高度中的各垂直高度，獲得一影像。

In a fluorescent in-situ hybridization imaging system performs, as nested loops, the following: (1) a valve sequentially couples a flow cell to a plurality of different reagent sources to expose the sample to a plurality of different reagents, (2) for each reagent of the plurality of different reagents, a motor sequentially positions the fluorescence microscope relative to sample at a plurality of different fields of view, (3) for each field of view of the plurality of different fields of view, a variable frequency excitation light source sequentially emits a plurality of different wavelengths, (4) for each wavelength of the plurality of different wavelengths, an actuator sequentially positions the fluorescence microscope relative to sample at a plurality of different vertical heights, and (5) for each vertical height of the plurality of different vertical heights, an image is obtained.

指定代表圖：



第1圖

符號簡單說明：

100:mFISH 成像及影像處理設備

10:樣本

110:流通槽

112:雜合試劑來源

112a:試劑

112b:清洗流體

114:閥

116:泵

118:載物台

118a:直線致動器

118b:Z 軸致動器

119:化學廢料管理次系統

120:螢光顯微鏡

122:激發光源

122a:雷射模組

124:顯微鏡主體

128:濾光輪

128a:濾光片

128b:致動器

130:激發光

132:螢光

134:攝影機

136:物鏡

138:多頻帶分光鏡

140:控制器

142:電腦

144:第一微控制器

146:第二微控制器

150:影像處理系統

152:資料處理裝置

154:儲存裝置

156:遠端存儲



202138564

【發明摘要】**【中文發明名稱】**用於多工螢光原位雜合影像之獲取及處理的系統及方法**【英文發明名稱】** SYSTEM AND METHOD FOR ACQUISITION AND

PROCESSING OF MULTIPLEXED FLUORESCENCE IN SITU

HYBRIDIZATION IMAGES

【中文】

在一種螢光原位雜合成像系統中，作為巢狀迴圈地進行以下步驟：(1)一閥依序將一流通槽耦接至複數個不同試劑來源，以將樣本暴露至複數個不同試劑，(2)對於該複數個不同試劑的各試劑，一馬達依序將螢光顯微鏡相對於位於複數個不同視野處之樣本定位，(3)對於該複數個不同視野中的各視野，一可變頻激發光源依序發射複數個不同波長，(4)對於該複數個不同波長中的各波長，一致動器依序將該螢光顯微鏡相對於位於複數個不同垂直高度處之樣本定位，及(5)對於該複數個不同垂直高度中的各垂直高度，獲得一影像。

【英文】

In a fluorescent in-situ hybridization imaging system performs, as nested loops, the following: (1) a valve sequentially couples a flow cell to a plurality of different reagent sources to expose the sample to a plurality of different reagents, (2) for each reagent of the plurality of different reagents, a motor sequentially positions the fluorescence microscope relative to sample at a plurality of different fields of view, (3) for each field of view of the plurality of different fields of view, a variable frequency excitation light

source sequentially emits a plurality of different wavelengths, (4) for each wavelength of the plurality of different wavelengths, an actuator sequentially positions the fluorescence microscope relative to sample at a plurality of different vertical heights, and (5) for each vertical height of the plurality of different vertical heights, an image is obtained.

【指定代表圖】第（ 1 ）圖。

【代表圖之符號簡單說明】

1 0 0 : m F I S H 成 像 及 影 像 處 理 設 備

1 0 : 樣 本

1 1 0 : 流 通 槽

1 1 2 : 雜 合 試 劑 來 源

1 1 2 a : 試 劑

1 1 2 b : 清 洗 流 體

1 1 4 : 閥

1 1 6 : 泵

1 1 8 : 載 物 台

1 1 8 a : 直 線 致 動 器

1 1 8 b : Z 軸 致 動 器

1 1 9 : 化 學 廢 料 管 理 次 系 統

1 2 0 : 螢 光 顯 微 鏡

1 2 2 : 激 發 光 源

1 2 2 a : 雷 射 模 組

1 2 4 : 顯 微 鏡 主 體

1 2 8 : 濾 光 輪

1 2 8 a : 濾 光 片

1 2 8 b : 致 動 器

1 3 0 : 激 發 光

1 3 2 : 螢 光

1 3 4 : 攝 影 機

1 3 6 : 物 鏡

1 3 8 : 多 頻 帶 分 光 鏡

1 4 0 : 控 制 器

1 4 2 : 電 腦

1 4 4 : 第 一 微 控 制 器

1 4 6 : 第 二 微 控 制 器

1 5 0 : 影 像 處 理 系 統

1 5 2 : 資 料 處 理 裝 置

1 5 4 : 儲 存 裝 置

1 5 6 : 遠 端 存 儲

【特徵化學式】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】用於多工螢光原位雜合影像之獲取及處理的系統及方法

【英文發明名稱】SYSTEM AND METHOD FOR ACQUISITION AND
PROCESSING OF MULTIPLEXED FLUORESCENCE IN SITU
HYBRIDIZATION IMAGES

【技術領域】

【0001】 本說明書有關多工螢光原位雜合法成像。

【先前技術】

【0002】 對於生物技術社群及製藥產業而言開發用於視覺化及量化一生物樣本（例如組織切除部、活組織切片、培養細胞）之內的多個生物分析物（例如DNA、RNA、及蛋白質）的方法有很大的興趣。科學家利用此類方法診斷/監測疾病、驗證生物標記、及調查治療方式。至今，例示性方法包括對一生物樣本藉功能性領域所標記之抗體或寡核苷酸（例如RNA或DNA）的多重成像。

【0003】 多工螢光原位雜合法（mFISH）成像是空間轉錄體學中決定基因表現的強大技術。簡言之，樣本被曝露至多個寡核苷酸探針，該些探針目標為感興趣的RNA。這些探針具有不同標記方案，當補充的、經螢光標記的探針被導入該樣本時，該些不同標記方案將允許區分不同RNA物種。接著藉由曝光至不同波長的激發光，獲取了連續數回合的螢光影像。對於各給定像素，來自不同波長之激發光的不同影像之螢光強度形成一信號序列。此序列接著與來

自一碼簿的參考碼庫做比較，該碼簿將各代碼與一基因相關聯。最匹配的參考碼被用以識別出被表現於該影像中該像素處的一相關聯基因。

【發明內容】

【0004】 在一態樣中，一種螢光原位雜合成像系統包括：用以容納將暴露於一試劑中之螢光探針的一樣本的一流通槽、用以控制來自該流通槽之複數個試劑來源中之一者的流動的一閥、用以致使通過該流通槽的流體流動的一泵、包括一可變頻激發光源和經定位以接收從該樣本螢光發射之光的一攝影機的一螢光顯微鏡、用以致使該流通槽及該螢光顯微鏡之間的相對垂直運動的一致動器、用以致使該流通槽及該螢光顯微鏡之間的相對橫向運動的一馬達、及一控制系統。該控制系統經配置以作為巢狀迴圈地進行下列步驟：致使該閥依序將該流通槽耦接至複數個不同試劑來源，以將該樣本暴露至複數個不同試劑，對於該複數個不同試劑中的各試劑，致使該馬達依序將該螢光顯微鏡相對於位於複數個不同視野處之樣本定位，對於該複數個不同視野中的各視野，致使該可變頻激發光源依序發射複數個不同波長，對於該複數個不同波長中的各波長，致使該致動器依序將該螢光顯微鏡相對於位於複數個不同垂直高度處之樣本定位，對於該複數個不同垂直高度中的各垂直高度，獲得位於該相應垂直高度處的一影像，該相應垂直高度涵蓋該樣本的該相應視野，該樣本讓該相應試劑的相應螢光探針被激發於該相應波長。

【0005】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。該致動器可為壓電致動器。一資料處理系統可經配置以決定對於個影像的一影像品質值，及若影像品質值不符合一品質閾值則篩除 (screen) 影像。該影像品質值可為清晰度品質值或亮度品質值。該攝影機可為 CMOS 攝影機。

【0006】 另一態樣中，一種螢光原位雜合成像及分析系統包括：用以容納將暴露於一試劑中之螢光探針的一樣本的一流通槽、用以依序於複數個不同成像參數組合獲得收集該樣本的複數個影像的一螢光顯微鏡、及一資料處理系統。該資料處理系統包括一線上預處理系統及一離線處理系統，該線上預處理系統經配置以隨著該等影像被收集而從該螢光顯微鏡依序接收該等影像，並進行即時 (on-the-fly) 影像預處理以移除該等影像的實驗性假影及提供 RNA 影像斑點銳化，該離線處理系統經配置以在收集該複數個影像之後，對具有一相同視野之影像進行對位，並將該複數個影像中的強度值解碼以辨識出所表現的基因。

【0007】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。該資料處理系統可經配置以決定一清晰度品質值或一亮度品質值。該清晰度品質值的決定可藉由整合整個該影像之影像亮度的梯度的絕對值。若該清晰度品質值在一最小清晰度值之上，則可決定該影像品質值符合閾值。該亮度品質值的決定可藉由整合整個影像的影像亮度。若該亮度品質值在一最小亮度值之上，則可決定該影像品質值符合閾值。

【0008】 另一態樣中，一種螢光原位雜合成像系統包括：用以容納將暴露至一試劑中之螢光探針的一樣本的一流通槽、一螢光顯微鏡、及一控制系統。該螢光顯微鏡包括照亮該樣本的一可變頻激發光源、在一濾光輪上的複數個發射帶通濾光片、用以旋轉該濾光輪的一致動器、及經定位以接收從該樣本螢光發射且已通過該濾光輪上的一濾光片的光的一攝影機。該控制系統經配置以致使該可變頻激發光源發射具有一所選波長的一光束，致使該致動器旋轉該濾光輪以定位將一所選濾光片定位在該樣本與該攝影機之間的一光路徑中，從該攝影機獲得一影像，及協調該可變頻激發光源及濾光輪，使得當獲得該影像時，該所選濾光片具有關聯於該等螢光探針被該所選波長激發時的發射的一發射帶通。

【0009】 另一態樣中，一種電腦程式產品具有指令以致使一或更多個處理器對複數個影像的各影像應用一或更多個濾光片並在該複數個影像的各影像上進行解卷積，以產生複數個經過濾的影像，對該複數個經過濾的影像進行對位以產生複數個經對位及過濾的影像，對該複數個經對位及過濾的影像之至少兩個像素的各像素藉由以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經對位及過濾的影像之資料數值的一最佳匹配，以及，對至少兩個像素之各像素，決定關聯於該碼字的一基因，並儲存有關該像素處表現了該基因的一指示。

【0010】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。可有指令用以決定該閾值，藉由決定用於該影像之亮度值直方圖，並決定在該直方圖中一分位數極限處的亮度值。該分位數極限可為99.5%或更多，例如99.9%以上。用以應用一或更多個濾光片的指令可包括：用以應用一低通濾光片的指令。用以進行解卷積的指令可包括用以藉一2D點擴散函數來解卷積的指令。

【0011】 另一態樣中，一種電腦程式產品具有指令以接收一樣本的複數個初始影像，該複數個初始影像共享一共同視野。對於該複數個初始影像的各初始影像，該初始影像經分割成為具相同尺寸的複數個次影像，從該複數個次影像計算出一合併影像，該合併影像的尺寸等於一個次影像的尺寸，藉而產生複數個縮小的影像，使該複數個影像的各影像具有一對應縮小影像，對於該複數個縮小影像的至少一個縮小影像，決定一轉換來對該複數個縮小影像進行對位，對於該至少一個縮小的影像的各者，對該對應初始影像應用針對該縮小的影像所決定的該轉換，來產生一經轉換影像，該經轉換影像的尺寸等於該初始影像的尺寸，並藉而產生複數個經轉換影像，及對於該複數個經轉換影像之至少兩個像素的各像素，藉由以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經轉換影像中之資料數值的一最佳匹配。對於至少兩個像素之各像素，決定關聯於該碼字的一基因，並儲存有關該像素處表現了該基因的一指示。

【0012】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。用以將該初始影像分割成複數個次影像的指令可包括指令以將該初始影像分割成一矩形網格，其具有複數個行（`column`）及複數個列（`row`）。該矩形網格可有相等數目的行與列。初始影像可被分割成剛好 N 個影像，其中 $N = Z^2$ 而 Z 是一偶數整數。 N 可為 2。次影像可具有不超過 1024×1024 像素的尺寸。

【0013】 另一態樣中，一種電腦程式產品具有指令以接收代表一樣本之一共同視野的複數個影像，對該複數個影像進行對位以產生複數個經對位影像，對於該經對位影像之複數個像素的各像素藉以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經對位影像中之資料數值的一最佳匹配，以及對於經識別為對於一或更多個像素之一最佳匹配的各碼字以及對於該一或更多個像素之各像素，決定是否針對該像素的一影像字的一位元比符合用於該碼字的一閾值。該影像字是形成自針對該像素的該複數個經對位影像中的該等資料數值。對於經決定為符合該閾值的至少一個像素，決定關聯於該碼字的一基因並儲存有關該基因被表現於該像素處的一指示。其位元比不符合該閾值的像素被篩除。

【0014】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。決定該閾值的步驟可包括決定在來自該樣本之該複數個影像的位元值直方圖中位於一第一分位數極限處的一值。該分位數極限可具有一預設值。決定該閾值之後，可藉由決定在來

自該樣本之該複數個影像的位元值直方圖中位於不同的第二分位數極限處的一值來決定一更新閾值。

【0015】 另一態樣中，一種電腦程式產品具有用以進行以下步驟的指令：接收一樣本的複數個影像，該複數個影像代表一共同視野，進行該複數個影像的對位以產生複數個經對位影像，對於該經對位影像之複數個像素的各像素來解碼該像素，其乃藉由從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經對位影像中之資料數值的一最佳匹配，及對於經識別為對於一或更多個像素之一最佳匹配的各碼字以及對於該一或更多個像素之各像素，決定是否針對該像素的一影像字的一位元亮度符合用於該碼字的一閾值。該影像字是形成自針對該像素的該複數個經對位影像中的該等資料數值。對於經決定為符合該閾值的各像素，決定關聯於該碼字的一基因並儲存有關該像素處表現了該基因的一指示。位元比不符合該閾值的像素被篩除。

【0016】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。決定該閾值的步驟可包括決定在來自該樣本之該複數個影像的位元值直方圖中位於一第一分位數極限處的一值。決定該閾值之後，可藉由決定在來自該樣本之該複數個影像的位元值直方圖中位於不同的第二分位數極限處的一值來決定一更新閾值。

【0017】 另一態樣中，一種電腦程式產品具有指令以接收一樣本的複數個初始影像。該複數個初始影像包括複數個

不同視野之各視野的多重影像。指令經儲存以進行一影像處理演算法，在該演算法中包括對該視野之多重影像進行影像過濾或對該視野之多重影像進行對位中之一或更多者。對於各視野，決定一或更多個初始參數值，其中不同視野具有不同初始參數值。使用用於不同視野之不同初始解碼參數值，來對各視野進行該影像處理演算法。決定一或更多個接續的解碼參數值，並利用用於該不同視野的相同接續參數值，對各視野進行該影像處理演算法及一解碼演算法，來產生一組空間轉錄體學資料（*spatial transcriptomic data*）。

【0018】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。對於一視野之複數個像素的各像素，該影像處理演算法及解碼演算法可藉由從一碼簿之複數個碼字識別出提供對複數個影像中之該像素的資料數值的最佳匹配的一碼字來解碼該像素，以產生複數個最匹配的碼字。對於各視野，可決定在各像素字與對該像素字而言之最佳匹配碼字之間的適配度，藉而提供對於各視野的複數個適配度。決定該適配度的操作可包括決定該像素字與該最佳匹配碼字之間的一距離。對於各視野，可從用於該視野之該複數個適配度決定一平均適配度，藉而提供複數個平均適配度。

【0019】 另一態樣中，一種電腦程式產品具有指令以接收一樣本的複數個初始影像，該複數個初始影像包括用於複數個不同視野之各視野的多重影像。對於各視野，基於用於該視野的該多重影像產生一組空間轉錄體學資料。各組

空間轉錄體學資料包括一或更多個資料組對，該一或更多個資料組對的各資料組對包括一位置與針對該位置的一經表現基因。決定來自鄰接視野之多重影像的重疊區域。從對於各視野的該組空間轉錄體學資料，產生用於涵蓋該複數個不同視野之一合併影像的一組合併空間轉錄體學資料。在產生該組合併空間轉錄體學資料之中，來自不同視野的至少一個經重複計數之資料組對被篩除，其代表在該樣本內之相同位置處的相同經表現基因。

【0020】 可在實施中包括以下特徵之一或更多者。決定重疊區域的步驟可包括，對於各列，在來自第一FOV之一第一影像與來自一第二鄰接FOV之一第二影像之間進行水平位移估計。決定重疊區域的步驟可包括，對於各列，在來自第一FOV之該第一影像與來自該第二鄰接FOV之該第二影像之間進行垂直位移估計。該水平位移估計及該垂直位移估計可各包括該第一影像與該第二影像之間的交互相關性。

【0021】 另一態樣中，一種電腦程式產品具有指令以接收一樣本的複數個影像，該複數個影像包括針對複數個不同視野之各視野的多重影像。在該複數個影像的各影像上，在該影像上進行影像品質檢核。進行該影像品質檢核之後，從該複數個影像之各影像移除假影（*artifact*）。在移除假影之後，銳化在該複數個影像的各影像中的影像斑點。在銳化該等影像斑點之後，對於各多重影像，進行該多重影像的對位以產生複數個經對位影像。在進行對位之

後，對於各多重影像，並對於一相應多重影像之該經對位影像的複數個像素的各像素，藉由以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該相應多重經對位影像中之資料數值的一最佳匹配。

【0022】 本案之實施的優點能包括（但不限於）以下之一或更多者。

【0023】 多工螢光原位雜合法（**mFISH**）影像的獲取與為決定基因表現的接續處理能以適合於工業採用的方式經自動化。能以統一的影像品質來處理需要多個視野（**FOV**）的大量樣本大小。能改善多樣本中或多模式研究中的行程對行程（**run-to-run**）一致性。要將不同時間所捕捉的相同**FOV**之螢光影像對位，能不使用分離的基準（例如不需要基準微粒（**bead**））、並使用比一些習用技術更少的資源且更準確地進行。

【0024】 本案之一或更多個實施例的細節經闡述在隨附圖式及以下說明中。其他特徵、態樣、及優點將從說明、圖式及申請專利範圍中顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0025】 第1圖是用於多工螢光原位雜合法成像之設備的示意圖。

【0026】 第2圖是資料處理方法的流程圖。

【0027】 第3圖示意地圖示利用交互資訊演算法的影像對位程序。

- 【0028】 第 4 圖是一影像中之強度的對數直方圖。
- 【0029】 第 5 A 圖是一所收集影像。
- 【0030】 第 5 B 圖圖示從第 5 A 圖之影像所生成的一遮罩。
- 【0031】 第 6 A 圖是來自一經過濾且解卷積的影像的強度對數直方圖。
- 【0032】 第 6 B 圖是標準化之後的強度對數直方圖。
- 【0033】 第 7 圖圖示一解碼方法。
- 【0034】 第 8 A 圖是對於一樣本碼字所識別的像素的位元比之對數直方圖。
- 【0035】 第 8 B 圖是對於一樣本碼字所識別的像素的亮度之對數直方圖。
- 【0036】 第 9 圖是拼接 (stitching) 方法的流程圖。
- 【0037】 第 10 圖是資料處理方法之另一實施的流程圖，在該資料處理方法中影像處理經即時進行。
- 【0038】 不同圖式中的相似參考元件符號及標記指示出相似的元件。

【實施方式】

【0039】 雖然多工螢光原位雜合法 (m F I S H) 成像是種強大的技術，目前為止其主要被使用在學術情境中。產業情境中將此種技術用於空間轉錄體學的運用 (例如被進行研究中之生技公司利用針對空間轉錄體學之 m F I S H 來開發意圖產品化的藥品) ，造成各式各樣的議題。例如：

- 系統應被完全或接近完全地自動化，使得熟悉生物學但不熟悉影像處理或軟體程式化技術的使用者 (例如研究

科學家) 僅需鍵入有關所調查之生物態樣的參數，而不需要做出有關影像處理的決策或具有程式專業。此種自動化事實上並非小事，而包含各種陷阱。

- 當前的最新技術採取來自通用光學顯微鏡的樣本影像，其具有適合小樣本的小影像尺寸。在產業情境中運用的樣本可能更大且可需要多個視野以完整地成像。此種多個FOV能被人工地拼接，但半自動的做法遭受可能的問題像是不良的影像對位、過度計數經表現基因、或在處理拼接的影像的不同區域上的不一致性所致的缺少可信賴度。
- 此程序需要足夠高的產出量以能在工業上可施行。然而，當前最新技術花費可觀的成像時間並在資料分析上需要許多人工步驟。對於大規模生命科學及臨床研究需要成像產出量及品質管控。此外，資料處理的可規模化能力 (scalability) 受限於運算時間。
- 因為各FOV經個別處理，能發現跨於一感興趣區域的顯著變異。額外地，來自不同儀器的影像在被發送至軟體管線 (pipeline) 之前需要經良好地校準及轉換。習知地，影像處理參數需要被人工調整以容許系統或樣本變異。
- 當前的解決方案強烈假設完美的影像，此在實驗條件與校準方法之間創造了差距。

【0040】 以下討論的一整體架構及各種個別組件及步驟能解決上述議題之一或更多個。

【0041】 一般，此整體架構及個別組件及步驟致能一個涉及最少人工步驟的端到端 m F I S H 成像及解碼程序。該系統整合完全自動化硬體架構及即時影像處理。該些方法包括回饋控制、影像校準、及廣域最佳化。該端到端程序時間能經減少，並能增加每樣本的產出量。該設備能簡單的被研究科學家在工業情境中使用。控制度量能在下游分析之前確保資料品質；早期偵測減少了樣本的浪費。演算法能致能對大成像區域的可規模化能力，使其有統一的及一致的空間基因表現。能改善對大規模研究而言的資料準確度及可重複性；結果能輕易被解讀及在軟體套件中進一步分析。

【0042】 參看第 1 圖，一多工螢光原位雜合法（m F I S H）成像及影像處理設備 100 包括一流通槽 110 以固定一樣本 10、一螢光顯微鏡 120 以獲得樣本 10 的影像、及一控制系統 140 以控制 m F I S H 成像及影像處理設備 100 之各種組件的操作。控制系統 140 能包括執行控制軟體的電腦 142（例如具有記憶體、處理器、等等）。

【0043】 螢光顯微鏡 120 包括一激發光源 122，該激發光源能產生多個不同波長的激發光 130。尤其，激發光源 122 能於不同時間產生具不同波長的窄頻寬光束。例如，能由一多波長連續波雷射系統來提供激發光源 122，例如能被獨立地啟用以產生具不同波長之雷射光束的多個雷射模組 122 a。來自雷射模組 122 a 的輸出能被多路傳輸至一共同光束路徑中。

【0044】 螢光顯微鏡 120 包括一顯微鏡主體 124，後者包括各種光學組件以將來自光源 122 的激發光導向流通槽 110。例如，來自光源 122 的激發光能被耦合至一多模式光纖中，被一組透鏡重新聚焦及放大，接著被一核心成像組件（像是高數值孔徑 (NA) 物鏡 136）導入樣本中。當需要切換激發通道時，能停用多個雷射模組 122a 中之一者且啟用另一雷射模組 122a，而該些裝置之間的同步是由一或更多個微控制器 144、146 完成。

【0045】 物鏡 136（或整個顯微鏡主體 124）能被安裝在耦接至一 Z 軸致動器的可垂直移動架座上。對 Z 位置的調整（例如藉由控制該 Z 軸致動器的一微控制器 146）能致能焦點位置的精細調校。替代地，或者額外地，流通槽 110（或在流通槽 110 中支撐樣本的載物台 118，例如軸向壓電載物台）可以被 Z 軸致動器 118b 垂直移動。此一壓電載物台能允許精確的且迅速的多平面影像獲取。

【0046】 將要成像的樣本 10 經定位在流通槽 110 中。流通槽 110 能為一腔室，其具有面積為大約 2 cm 乘以 2 cm 的截面區域（平行於物體或顯微鏡的影像平面）。樣本 10 能被支撐在流通槽內的一載物台 118 上，且該載物台（或整個流通槽）能為可橫向移動的，例如被一對直線致動器 118a 移動以允許 XY 運動。此允許對不同橫向地偏移的視野 (FOV) 中之樣本 10 的影像獲取。替代地，顯微鏡主體 124 可以被承載在一可橫向移動的載物台上。

【0047】 對流通槽 110 的一入口經連接至一組雜合試劑來源 112。能由控制器 140 控制一多閥定位器 114 以在來源之間切換，以選擇哪種試劑 112 a 被供給至流通槽 110。各試劑包括一組不同的一或更多個寡核苷酸探針。各探針標的為感興趣的不同 RNA 序列，且具有不同的一組一或更多個螢光材料（例如磷），該一或更多個螢光材料被不同波長組合所激發。除了試劑 112 a 以外，能有清洗流體 112 b（例如 DI 水）的來源。

【0048】 流通槽 110 的出口經連接至一泵 116（例如蠕動泵），其也被控制器 140 控制以控制流體（例如試劑或清洗流體）通過流通槽 110 的流動。來自流通槽 110 的使用過的溶液能由泵 116 傳遞至一化學廢料管理次系統 119。

【0049】 操作上，控制器 140 致使光源 122 發射激發光 130，該激發光致使樣本 10 中螢光材料的螢光，例如結合至樣本中 RNA 的探針的螢光以及被該激發光之波長激發的探針的螢光。發射螢光 132、還有向後傳播激發光（例如從樣本、載物台、等等散射的激發光）被顯微鏡主體 124 的物鏡 136 收集。

【0050】 所收集的光能被顯微鏡主體 124 中的多頻帶分光鏡 138 所過濾，以將發射螢光與向後傳播照明光分離，而發射螢光被傳遞至攝影機 134。多頻帶分光鏡 138 能包括用於在各式各樣激發波長之下預期來自該等探針的各發射波長的一通帶。使用單一多頻帶分光鏡（相較於多個分光鏡或一個可移動分光鏡）能提供改善的系統穩定性。

【0051】 攝影機 134 能為一高解析度（例如 2048 x 2048 像素）CMOS（例如科學 CMOS）攝影機，且能經安裝於物鏡的即刻影像平面。可以有其他攝影機類型（例如 CCD）。當被信號（例如來自微控制器者）觸發時，來自攝影機的影像資料能被捕捉，例如被發送至一影像處理系統 150。因此，攝影機 134 能收集來自該樣本的影像序列。

【0052】 為進一步移除殘留的激發光並將激發通道之間的串音最小化，各雷射發射波長能與一對應帶通發射濾光片 128a 配對。各濾光片 128a 能有 10 ~ 50 nm（例如 14 ~ 32 nm）的波長。在一些實施方式中，濾光片比起產生自激發光的探針之螢光材料的頻寬要窄，例如若探針的螢光材料有拖曳的光譜輪廓。

【0053】 濾光片經安裝在一高速濾光輪 128 上，該濾光輪可被一致動器 127b 旋轉。濾光輪 128 能被安裝於無限空間處以最小化成像路徑中的光學像差。在通過濾光輪 128 的發射濾光片之後，純淨的螢光信號能被鏡筒透鏡重新聚焦並被攝影機 134 捕捉。分光鏡 138 能經定位在物鏡 138 與濾光輪 128 之間的光路徑中。

【0054】 為促進該系統的高速、同步的操作，控制系統 140 能包括兩個微控制器 144、146，該些微控制器經採用以協調的方式發送觸發信號（例如 TTL 信號）至螢光顯微鏡 120 的組件。第一微控制器 144 直接被電腦 142 運行，並觸發濾光輪 128 的致動器 128b 以切換發射濾光片 128a 於不同顏色通道。第一微控制器 144 也觸發第二微控制器 146，該第

二微控制器發送數位信號至光源 1 2 2 以控制何種波長的光被傳遞至樣本 1 0。例如，第二微控制器 1 4 6 能發送開/關信號至光源 1 2 2 的個別雷射模組，以控制哪個雷射模組是啟用的，而因此控制何種波長的光被用於該激發光。在完成到新的激發通道的切換後，第二微控制器 1 4 6 控制用於壓電載物台 1 1 6 的馬達以選擇成像高度。最後，第二微控制器 1 4 6 發送觸發信號至攝影機 1 3 4 以用於影像獲取。

【0055】 電腦 1 4 2 與設備 1 0 0 之裝置組件之間的通訊被控制軟體所協調。此控制軟體能整合全部裝置組件的驅動器到一單一架構中，而因此能允許使用者將該成像系統當作單一儀器來操作（而不是需要分別控制許多裝置）。

【0056】 該控制軟體支援顯微鏡的互動式操作以及成像結果的立即視覺化。額外地，該控制軟體能提供一程式介面，其允許使用者設計及自動化他們的成像工作流程。在腳本語言中能指定一組預設的工作流程描述檔（`script`）。

【0057】 在一些實施方式中，控制系統 1 4 0 經配置（即被該控制軟體及/或該工作流程描述檔所配置）以在依以下順序（從最內迴圈到最外迴圈）的迴圈中獲得螢光影像（也簡單稱為「經收集影像」或僅是「影像」）：z 軸、顏色通道、橫向位置、及試劑。

【0058】 這些迴圈可被下列虛擬碼表示：

```
for h = 1:N_雜合
    % 多個雜合
    for f = 1:N_FOV
```

```

% 多個橫向視野
for c = 1:N_通道
    % 多個顏色通道
    for z = 1:N_平面
        % 多個z平面
        獲取影像(h, f, c, z);
    end % end for z
end % end for c
end % end for f
end % end for h

```

【0059】 對於z軸迴圈，控制系統140致使載物台118逐步經過多個垂直位置。由於載物台118的垂直位置是由壓電致動器所控制，要調整位置所需的時間少而此迴圈中各步驟非常快。

【0060】 首先，樣本可能足夠地厚（例如數微米）以使整個樣本可預期有多個影像平面。例如，可能出現多個細胞層，或甚至在一細胞內可有基因表現上的垂直變異。此外，對於薄的樣本，不一定可事先得知焦平面的垂直位置（例如熱漂移所致）。還有，樣本10可在流通槽110內垂直漂移。成像於多個Z軸位置處能確保涵蓋到厚的樣本中的大部分細胞，並能協助識別出薄的樣本中的最佳聚焦位置。

【0061】 對於顏色通道迴圈，控制系統140致使光源122逐步經過不同波長的激發光。例如，啟用雷射模組中之一者，停用其他的雷射模組，且旋轉發射濾光輪128以將適

當的濾光片帶到樣本 10 與攝影機 134 之間的光的光學路徑中。

【0062】 對於橫向位置，控制系統 140 使光源 122 逐步經過不同橫向位置以獲得該樣本的不同視野 (FOV)。例如，於該迴圈的各步，能驅動支撐載物台 118 的直線致動器以橫向地位移該載物台。在一些實施方式中，步數及橫向運動經選擇使得累加的 FOV 涵蓋了整個樣本 10。在一些實施方式中，橫向運動經選擇使得 FOV 局部重疊。

【0063】 對於試劑，控制系統 140 使設備 100 逐步經過多個不同的可用試劑。例如，於該迴圈的各步驟，控制系統 140 能控制閥 114 去將流通槽 110 連接至清洗流體 112b，使泵 116 抽吸該清洗流體通過該細胞達一第一時間段以清洗目前的試劑，接著控制閥 114 去將流通槽 110 連接至不同的新試劑，並接著抽吸該新試劑通過該細胞達一第二時間段長，該第二時間段足以讓新試劑中的探針結合至適當的 RNA 序列。由於要清洗流通槽及讓新試劑中的探針結合需要一些時間，要調整試劑所需的時間相較於調整橫向位置、顏色通道、或 z 軸而言是最長的。

【0064】 作為結果，對於 z 軸、顏色通道 (激發波長)、橫向 FOV、及試劑之可能值的各個組合獲得一個螢光影像。因為最內迴圈具有最快的調整時間，而逐漸外圍的迴圈具有逐漸較慢的調整時間，此種配置方式提供為獲得用於這些參數之數值的組合的影像最省時的技術。

【0065】 資料處理系統 150 經用以處理影像並決定基因表現，以產生空間轉錄體學資料。最低限度下，資料處理系統 150 包括一資料處理裝置 152（例如一或更多個處理器，其由儲存在一電腦可讀取媒體上的軟體控制）及一區域儲存裝置 154（例如非揮發性電腦可讀取媒體，其接收由攝影機 134 獲取的影像）。例如，資料處理裝置 152 能為安裝有 GPU 處理器或 FPGA 板的工作站。資料處理系統 150 也能藉由網路連接至遠端存儲 156，例如藉由網際網路連接至雲端存儲。

【0066】 在一些實施方式中，資料處理系統 150 隨著影像被接收而進行即時影像處理。特定言之，在資料獲取在進行中的同時，資料處理裝置 152 能進行影像預處理步驟，像是過濾及解卷積，上述步驟能在儲存裝置 154 中的影像資料上進行但不需要整個資料集合。由於過濾及解卷積是資料處理管線中的主要瓶頸，隨著影像獲取發生來預處理能顯著地縮短離線處理時間而因此改善產出量。

【0067】 第 2 圖圖示一資料處理方法的流程圖，在該資料處理方法中處理的進行是在已獲取全部影像之後。流程開始於該系統接收原始影像檔及支援檔案（步驟 202）。尤其，該資料處理系統能從攝影機接收整個原始影像的集合，例如對於 z 軸、顏色通道（激發波長）、橫向 FOV、及試劑之可能數值的各個組合有一影像。

【0068】 額外地，該資料處理系統能接收一參考表現檔（expression file）（例如 FPKM（每百萬對應次讀取每

個序列之千鹼基對的片段)檔案)、資料綱目 (data schema)、一或更多個染色影像 (例如 DAPI 影像)。參考表現檔能被用以在傳統序列結果及 mFISH 結果之間交叉檢核。

【0069】 從攝影機接收的影像檔能可選地包括元資料，其為該影像所被拍攝時的硬體參數值 (像是載物台位置、像素大小、激發通道、及其他)。資料綱目提供基於硬體參數來排序該些影像的的規則，使得影像被以適當順序放入一或更多個影像堆疊中。若沒有包括元資料，資料綱目能將該些影像的順序關聯於用於產生該些影像之 z 軸、顏色通道、橫向 FOV 及試劑的數值。

【0070】 染色影像將被覆蓋上轉錄體學資訊而呈現給使用者。

【0071】 為了篩去品質不足的影像，經收集的影像能在更密集的處理之前受到一或更多個品質度量 (步驟 203)。僅有符合該些品質度量的影像被通過以用於進一步處理。此能顯著地減少該資料處理系統上的處理負荷。

【0072】 為了偵測到聚焦的失敗，能對各個經收集影像決定一清晰度品質值。作為一例，清晰度品質的計算能藉由將整個影像之強度中的梯度加總：

$$S = \int dx dy \sqrt{|\nabla I(x,y)|^2}$$

【0073】 若清晰度品質值在一閾值之下，則該影像能被識別為失焦。該閾值可能是預設的經驗決定值，或者該閾值可能是基於針對具相同 FOV 之影像的清晰度值所計算。例

如，能計算清晰度品質值的標準差，該閾值能基於該標準差來設定。

【0074】 如上述，焦平面的 z 軸位置不一定為確切已知。失焦的影像能被篩去。在一些實施方式中，在各次 z 軸迴圈中，僅保留單一個影像，例如具有最佳清晰度品質的影像。在一些實施中，來自單一個 z 軸迴圈的多個影像可能符合清晰度品質，而該多個影像被組合（例如融接（blend））以形成單一個影像。

【0075】 為了偵測感興趣的區域，能對各個經收集影像決定一亮度品質值。亮度品質能被用以決定是否該影像中出現任何細胞。例如，該影像中全部像素的強度值能被加總並與一閾值做比較。若該總數少於該閾值，則此可能表示該影像中基本上沒有東西（即該影像中沒有細胞），且沒有感興趣的資訊而該影像不需要被處理。做為另一例，能計算該影像中強度值的標準差並與一閾值做比較。若該標準差在該閾值之下，此表示該影像大致均勻而缺少表示出被激發之探針的亮斑點。再一次，此一經收集影像沒有感興趣的資訊而該影像不需要被處理。

【0076】 以上兩個品質檢核為例示性的而可能使用其他的品質度量。例如，能使用測量斑點品質的品質度量。

【0077】 另一品質檢核能偵測雜合間位移（inter-hybridization shift）。若在成像行程之間發生顯著的樣本漂移，則後續的對位可能是不可靠的。樣本漂移能被各種影像處理演算法（例如相位相關性）所偵測。

尤其，經收集影像能與用於相同 FOV 但用於先前試劑的一影像作比較。若該些影像沒有足夠相關，例如不符合閾值相關性，則該經收集影像沒有感興趣的資訊而該影像不需要被處理。

【0078】 接下來，各影像經處理以移除實驗性假影（步驟 204）。由於各 RNA 分子將與不同激發通道的探針雜合多次，跨於多個通道、多回合影像堆疊的嚴格對齊對於顯現跨於整個 FOV 的 RNA 識別是有益的。移除實驗性假影的操作能包括場域攤平（field flattening）及/或色差校正。在一些實施方式中，場域攤平的進行在色差校正之前。

【0079】 激發光中之照明輪廓線（illumination profile）的不完美（例如高斯或其他不均勻分佈，而非跨於 FOV 的均勻分佈）可能導致跨於該 FOV 的不均勻螢光信號位準，而此種空間不均勻性往往在激發通道之間有所差異。此種不均勻能從照明場域傳遞至跨於 FOV 的螢光信號位準，而因此使空間轉錄體學分析結果有偏差。為了消除此種假影，利用一螢光標的對各顏色通道測量照明輪廓線（例如測試影像），該螢光標的在該 FOV 內具有均勻的螢光團密度。這些經測量的照明輪廓線接著被使用作為成像資料上的通道特定的標準化因數。例如，用於各顏色通道（即所要測量的各發射波長）的照明輪廓線能被儲存成一標準化影像，且在用於一顏色通道的一經收集影像中各像素的強度值被用於該相關聯顏色通道之該標準化影像之相應像素的強度值所除。

【0080】 色差校正造成跨於不同發射通道改變的光學扭曲。換言之，由於探針被針對不同波長量測，在成像路徑中的色差（若有的話）可顯著地使下游分析結果降級。為了相對於此種可能的硬體瑕疵而維持分析結果的強大性，能在資料處理管線中提供一種基於軟體的色差校正解決方案。尤其，利用具有已知圖案（例如矩形圖案）之螢光斑點的標的來針對各顏色通道產生一測試影像。對於各顏色通道計算一轉換，該轉換將測試影像中的經測量斑點帶回成為與該已知圖案對齊。這些轉換被儲存，而當收集一樣本之影像時的正常操作中，選擇一適當轉換並基於對經收集影像的顏色通道對各經收集影像應用該轉換。

【0081】 各影像經過處理以提供RNA影像斑點銳化（步驟206）。RNA影像斑點銳化能包括應用濾光片來移除細胞的背景及/或藉由點擴散函數來解卷積以銳化RNA斑點。

【0082】 為了將RNA斑點區別於相對明亮的背景，對該影像應用一低通濾光片，例如應用至經場域攤平且色彩校正的影像以移除圍繞RNA斑點的細胞的背景。該經過濾的影像經進一步藉由一2-D點擴散函數（PSF）解卷積以銳化該RNA斑點，再與具有一半像素寬度的一2-D高斯核心卷積以稍微使斑點圓滑。

【0083】 具有相同FOV的影像經對位以將其中的特徵（例如細胞或細胞胞器）對齊（步驟208）。為了正確地辨識影像序列中的RNA種類，在不同回合之影像中的特徵被對齊（例如）到次像素精確度。然而，由於mFISH樣本是以

水相經成像且被一馬達載物台四處移動，經過數小時之久的成像程序下的樣本漂移及載物台漂移能轉變成為影像特徵的位移，若該位移維持位被解決則可能破壞轉錄體學分析。換言之，即使假設螢光顯微鏡對流通槽或支撐件有精確的可重複對齊，樣本在稍後的影像中可能不再於相同位置中，而此可能在解碼中導入錯誤或就是使無法解碼。

【0084】 要將影像對位的一種習用技術是在載玻片上的載體材料內置放基準標記，例如螢光微粒。一般，樣本及基準標記微粒將大致一致地移動。能基於其尺寸及形狀來在影像中辨識這些微粒。對微粒的位置做比較允許將兩個影像對位，例如仿射轉換的計算。

【0085】 然而，可能在不使用螢光微粒或類似基準標記、卻僅使用影像內的資料之下來對位影像。尤其，高強度區域應跨於相同FOV的多個影像大概位於相同位置。能被利用於影像間對位的技術包括相位相關性演算法及交互資訊(MI)演算法。MI演算法一般比相位相關性演算法更精確及強大。因此，能將基於交互資訊(MI)的漂移校正方法利用於對齊。然而，精確度的代價可能是高運算時間。

【0086】 第3圖圖示用於利用交互資訊演算法來對齊具有相同FOV之經收集影像的程序，該程序保留MI對位演算法的高精確度同時減少運算負荷。具有相同FOV之經收集影像的集合能被認為是一原始影像堆疊；該堆疊中影像的順序由以上討論之資料綱目所設定。影像堆疊中的各經收集影像302可為(例如)2048x2048像素。一般而言，在具

有此種大小的影像上進行交互資訊演算法可能需要過量的運算能力。經收集影像 302 經平均地切割成四個影像區塊 304a、304b、304c、304d。假設每個經收集影像 302 是 2048 x 2048 像素，則該些影像區塊為 1024 x 1024 像素。各影像區塊 304a、304b、304c、304d 乘上一個相位因數 ϕ ，經相位偏移的影像區塊被重疊及加總以產生一複合影像，而該些複合影像的實部及虛部被加在一起以產生一加總影像 306。此加總影像 306 具有原始的影像 302 的 $\frac{1}{4}$ 大小，例如 1024 x 1024 像素。

【0087】 此程序針對原始影像堆疊中的各原始影像 302 重複，以產生具有縮小尺寸之影像 306 的堆疊 308。交互資訊演算法接著被利用堆疊 308 進行，以產生針對堆疊 308 中各縮小影像 306 的轉換。該轉換能包括平移及 / 或縮放 (scaling) 轉換。為了對齊原始堆疊中的影像，針對各縮小影像所決定的轉換被套用至原始堆疊中的相應經收集影像。此應造成具有原始尺寸 (例如 2048 x 2048 像素) 之經收集影像 310 的一堆疊 312，其中用於相同 FOV 的影像 310 對齊。

【0088】 此種切片及重疊的策略保留影像中的大部分特徵，而因此仍應具有高精確度卻減少了用於位移計算的暫時性影像大小，因此具有減小的運算負荷。儘管第 3 圖及以上討論聚焦在分割成為對應於原始影像之右上、右下、左上、及左下象限之四個區塊，但能夠使用另外的區塊個數，例如影像能被分割成為其他形狀 (例如矩形而非正方形)，

只要讓區塊具有相同的維度。例如，原始影像可以被分割成 256×2048 像素的 8 個影像區塊。一般，影像能被分割成具有複數個行及複數個列的矩形網格，例如有相等的行數及列數。該影像能被分割成為 N 個影像，其中 $N = Z^2$ 且 Z 是偶數整數（對第 3 圖中的範例 $N = 2$ ）。

【0089】 回到第 2 圖，由於步驟 206 的過濾及解卷積程序經獨立地實施在個別圖框（即位元）上，因此它們能進行於步驟 208 的對位之前。此外，由於用於對位的影像堆疊是在背景收集及銳化以顯現 RNA 的空間特徵，因此能改善對位精確度。為了驗證後面這個優點，來自低聚合（confluency）細胞樣本、高聚合細胞樣本、及腦組織樣本的三個資料集合針對藉由對位優先對比於過濾優先的做法的對位精確度來做比較。對位品質的估算乃藉由跨於全部層將經對位影像堆疊加總，接著計算經加總影像的最大值及最小值。過濾優先的做法一般而言產生經攤平影像的較大的最大值及較小的最小值，此表示出對位品質的改良。

【0090】 對位之後能進行對位品質檢核。若經正確地對位，各影像中的亮點應重疊使得總亮度增加。參考未經對位之影像的堆疊能被加總，類似地經對位影像 310 的堆疊 312（見第 3 圖）能經加總，例如：

$$I_U(x, y) = \sum_{i=1}^B I_U(x, y, i) \quad I_R(x, y) = \sum_{i=1}^B I_R(x, y, i)$$

【0091】 $I_U(x, y)$ 的最大值能與 $I_R(x, y)$ 的最大值比較。若 $\max(I_R(x, y)) > \max(I_U(x, y))$ 則能視為對位成功。相反地，若 $\max(I_R(x, y)) \leq \max(I_U(x, y))$ ，則資料處理系統能指示出對位失敗並發出一錯誤碼。此 FOV 可以從接續的分析排除，及 / 或可能需要取得新影像。

【0092】 可選地，在對位之後能針對各經收集影像計算一遮罩。簡言之，各像素的強度值與一閾值做比較。若強度值高於該閾值則遮罩中的一相應像素被設為 1，而若強度值低於該閾值則該相應像素被設為 0。該閾值能為實驗決定的預先決定值，或者能從影像中的強度值計算出。一般，該遮罩能對應於該樣本內細胞的位置；細胞之間的空間不應發螢光而應具有低強度。

【0093】 為產生遮罩，對於各視野，從該視野的影像序列產生一經壓縮圖框 $P(x, y)$ 。經壓縮圖框 $P(x, y)$ 的產生能藉由在該 FOV 的影像上進行乘積 (product) 運算，例如：

$$P(x, y) = \prod_i^B I(x, y, i),$$

其中 i 代表經對位影像 310 的堆疊 312 中的層編號 (見第 3 圖)。能基於 $\log P(x, y)$ 的直方圖來產生閾值。

【0094】 例如，第 4 圖圖示一經收集影像中經壓縮圖框值 ($P(x, y)$) 的對數直方圖 400。一般，該對數直方圖將包括強度中的一初始急遽增加 (其可能是第一局部最大值的前緣) 及強度中的一最終急遽減少 (可能是第二局部最大值的後緣)。該直方圖能經歷峰值及 / 或邊緣查找

(*edge-finding*) 演算法以辨識出最靠近直方圖下端的第一峰值 402 (或者若沒有明顯的峰值則是強度中急遽增加的一邊緣) , 以及最靠近直方圖上端的第二峰值 404 (或者若沒有明顯的峰值則是強度中急遽減少的一邊緣) 。能基於該兩個經識別出的點 402 、 404 的強度值來設定一閾值 410 。例如 , 閾值 410 能為強度值的平均。替代峰值查找法 , 該直方圖能經受大津 (*Otsu*) 閾值方法來決定閾值 410 。此種技巧可能是有用的 , 因為直方圖不會永遠展現兩個清楚的峰值。

【0095】 能從遮罩移除椒鹽效應 (*Salt and pepper effects*) 。在連續的「開啟 (*on*) 」像素區域外側的單一的「開啟」像素 , 或者在連續的「開啟」像素區域內側的單一的「關閉 (*off*) 」像素 , 能被轉換成「關閉」或「開啟」以匹配其周圍區域。一般 , 在低於一閾值大小 (例如 50 個像素) 的鄰接像素群集能被指示成錯誤且被改變以匹配周圍區域。藉由使用遮罩 , 能保留記憶體空間且減少計算工作負擔。

【0096】 第 5 A 圖中圖示一經收集影像 , 而第 5 B 圖圖示自第 5 A 圖之影響產生的一遮罩。

【0097】 回到第 2 圖 , 在將一 *FOV* 的影像對位之後 , 能進行空間轉錄體學分析 (步驟 210) 。

【0098】 為了使直方圖更一致 , 能在空間轉錄體學分析之前進行 *FOV* 標準化。在一些實施方式中 , *FOV* 標準化發生在對位之後。替代地 , *FOV* 標準化能發生在對位之前。*FOV*

標準化可以被認為是過濾之一部分。即使經過以上討論的過濾及解卷積，在經收集影像中的一問題在於可能在最亮的像素之中有顯著的亮度差異，例如超過數個數量級。例如，參看第 6 A 圖，在一經收集影像中的強度值之直方圖 6 0 2 有很長的尾端 6 0 4。此能在解碼流程導入不確定性。FOV 標準化能夠抵銷此種錯誤來源。

【0099】 首先，影像中全部的強度值被相對於該影像中之最大強度值標準化。例如，決定最大強度值，及用該最大值去除全部的強度值，使得強度值在 0 及 I_{MAX} （例如 1）之間變化。

【0100】 接著，分析該影像中的強度值以決定包括最高強度值的一上分位數，例如 99% 以上之分位數（即前 1%）、99.5% 以上之分位數、或 99.9% 以上之分位數、或 99.95% 以上之分位數（即前 0.05%）。此分位數的截止在第 6 A 圖中以折線 6 1 0 表示。位於此分位數極限的強度值（例如在第 6 A 圖之範例中於 99.95% 分位數處的強度值 $\log(-2)$ ）能經決定及儲存。具有強度值在該上分位數內的全部像素被重設成具有最大強度值（例如 1）。接著其餘像素的強度值被依比例調整以運行到相同的最大值。為完成此，沒有在該上分位數之中的像素的強度值除以用於該分位數極限的經儲存強度值。第 6 B 圖圖示產生自 FOV 標準化的強度值直方圖 6 2 0。

【0101】 將參看第 7 圖解釋解碼。然而，暫時回到第 3 圖，用於一特定 FOV 的對齊影像能被視為包括多個影像層 3 1 0

的堆疊 3 1 2，其各影像層為 X 乘以 Y 像素（例如 2048×2048 像素）。影像層的數目 B 依照顏色通道的數目（例如激發波長的數目）及雜合的數目（例如試劑的數目）之組合而定，例如 $B = N_{\text{雜合}} * N_{\text{通道}}$ 。

【0102】 轉向第 7 圖，在標準化之後，此影像堆疊能被當作一個 2-D 像素字矩陣 7 0 2 來運算。矩陣 7 0 2 能有 P 個列 7 0 4，其中 $P = X * Y$ ，以及 B 個行 7 0 6，其中 B 是對於一給定 FOV 的堆疊中的影像個數，例如 $N_{\text{雜合}} * N_{\text{通道}}$ 。各列 7 0 4 對應於像素中之一像素（跨於該堆疊之多個影像的相同像素），來自列 7 0 4 的數值提供一像素字 7 1 0。各行 7 0 6 提供字 7 1 0 中的數值之一數值，即來自該像素之影像層的強度值。如上述，該些數值能經標準化，例如在 0 與 I_{MAX} 之間變化。不同強度值在第 7 圖中被表示成相應細胞的不同深淺程度。

【0103】 若全部像素通過到解碼步驟，則全部 P 個字將被如下地處理。然而，細胞邊界外側的像素能被 2-D 遮罩篩去（見以上第 4 B 圖）而不經處理。因此，能在以下分析中顯著減少計算負荷。

【0104】 資料處理系統 1 5 0 儲存一碼簿 7 2 2，該碼簿被用以解碼影像資料來辨識於特定像素處表現的基因。碼簿 7 2 2 包括多個參考碼字，各參考碼字關聯於一特定基因。如第 7 圖中顯示，碼簿 7 2 2 能被表示成具有 G 個列 7 2 4 及 B 個行 7 2 6 的一 2 D 矩陣，其中 G 是碼字的個數，例如基因的個數（儘管可以由多個碼字代表相同的基因）。各列 7 2 4

對應於參考碼字 730 之一者，而各行 706 提供參考碼字 730 中該些數值之一，如由先前校準及測試已知基因所建立。對於各行，參考碼 730 中的數值可能是二元的，即「開啟」或「關閉」。例如，各值能為 0 抑或 I_{MAX} （例如 1）。第 7 圖中將開啟及關閉值由相應細胞的淺色或深色陰影表示。

【0105】 對於各個將要解碼的像素，可計算在像素字 710 與各參考碼字 730 之間的一距離 $d(p, i)$ 。例如，像素字 710 與參考碼字 730 之間的距離能被計算成歐幾里德距離，例如該像素字中各數值與該參考碼字中的相應數值之間的差的平方的總和。此計算能被表示成：

$$d(p, i) = \sum_{x=1}^B (I_{p,x} - C_{i,x})^2,$$

其中 $I_{p,x}$ 是來自像素字之矩陣 702 的數值，而 $C_{i,x}$ 是來自參考碼字之矩陣 722 的數值。能使用其他度量替代歐幾里德距離，例如差的絕對值的總和、餘弦角、相關性、等等。

【0106】 一旦針對給定像素計算了用於各碼字的距離值，則決定最小的距離值，提供最小距離值的該碼字被選作最匹配的碼字。換句話說，資料處理設備決定 $\min(d(p, 1), d(p, 2), \dots, d(p, B))$ ，並決定數值 b 作為提供該最小值的 i 的值（在 1 與 B 之間）。決定對應於該最匹配的碼字的基因（例如從將碼字關聯於基因的一查找表），而該像素被標記（tagged）為表現該基因。

【0107】 回到第 2 圖，資料處理設備能濾除錯誤的標註（callout）。濾除錯誤標註的一種技巧是在指示出有一基

因的表現之處的距離值 $d(p, b)$ 大於一閾值（例如若 $d(p, b) > D1_{MAX}$ ）處去除標記。

【0108】 還有另一個用於濾除錯誤標註的技巧是拒絕所計算位元比落在一閾值之下的碼字。位元比經計算成來自應當為開啟的層（從碼字決定）的影像字的強度值之平均，除以來自應當為關閉的層（仍從碼字決定）的影像字的強度值之平均。例如，針對第7圖中所示的碼字730，對應於行3～行6及行12～行14的位元為開啟的，而對應於行1～行2及行7～行11的位元是關閉的。因此，假設此碼字被選為用於像素 p 的最佳匹配，位元比 BR 能經計算成

$$BR = \frac{[I(p,3)+I(p,4)+I(p,5)+I(p,6)+I(p,12)+I(p,13)+I(p,14)]/7}{[I(p,1)+I(p,2)+I(p,7)+I(p,8)+I(p,9)+I(p,10)+I(p,11)]/7}$$

【0109】 位元比 BR 經與一閾值 TH_{BR} 作比較。在一些實施方式中，閾值 TH_{BR} 是從先前的量測實證地決定。然而，在一些實施方式中，能基於從樣本獲得的量測結果針對一特定碼字自動地計算閾值 TH_{BR} 。第8A圖圖示針對被一特定碼字標記之全部像素的位元比強度值之對數直方圖802。基於此直方圖802計算一閾值804。例如，能利用一預設分位數（例如50%）來計算一初始閾值804。然而，在以下討論的最佳化期間能調整該分位數。

【0110】 還有另一個用於濾除錯誤標註的技巧是拒絕所計算位元亮度落在一閾值之下的碼字。位元亮度計算成來自應當為開啟的層（從碼字決定）的影像字的強度值之平均。例如，針對第7圖中所示的碼字730，對應於行3～行6及行

1 2 ~ 行 1 4 的位元為開啟的。因此，假設此碼字被選為用於像素 p 的最佳匹配，位元亮度 $B B$ 能被計算成

$$BB = [I(p,3)+I(p,4)+I(p,5)+I(p,6)+I(p,12)+I(p,13)+I(p,14)]/7$$

【0111】 位元亮度 $B B$ 經與一閾值 $T H_{B B}$ 作比較。在一些實施方式中，閾值 $T H_{B B}$ 是從先前的量測實證地決定。然而，在一些實施方式中，能基於從樣本獲得的量測結果針對一特定碼字自動地計算閾值 $T H_{B B}$ 。第 8 B 圖圖示針對被一特定碼字標記之全部像素的位元亮度值之對數直方圖 8 1 2。基於此直方圖 8 1 2 計算出閾值 8 1 4。例如，一預設分位數（例如 8 0 % 或 9 0 %）能被用以計算初始閾值 8 1 4。然而，在以下討論的最佳化期間能調整該分位數。

【0112】 回到第 2 圖，資料處理設備現能進行最佳化及再解碼（步驟 2 1 2）。最佳化能包括對該些解碼參數的基於機器學習之最佳化，隨後藉更新後的解碼參數回到步驟 2 1 0 以更新空間轉錄體學分析結果。此循環能重複直到該些解碼參數穩定化為止。

【0113】 對解碼參數的最佳化將使用績效函數（*merit function*），例如 $F P K M / T P M$ 相關性、空間相關性、或信心比例（*confidence ratio*）。能在績效函數中作為變數包括的參數包括經用以移除細胞的背景的濾光片的形狀（例如頻率範圍的開始及結束、等等）、經用以銳化 $R N A$ 斑點之點擴散函數的數據孔徑值、在 $F O V$ 之標準化中使用的分位數界限 Q 、位元比閾值 $T H_{B R}$ 、位元亮度閾值 $T H_{B B}$

(或用以決定位元比閾值 $T_{H_{BR}}$ 和位元亮度閾值 $T_{H_{BB}}$ 的分位數) 、 及 l 或一像素字能被認為匹配一碼字的最大距離 $D_{l_{max}}$ 。

【0114】 此績效函數可有效地為不連續函數，習知的梯度跟隨 (*gradient following*) 演算法不足以辨識理想參數值。能使用機器學習模型來在參數值上收斂。

【0115】 接著，資料處理設備能進行跨於全部 FOV 之參數值的統一 (*unification*) 。由於各 FOV 經個別處理，各場域可能經歷了不同標準化、設閾值、及過濾設定。作為結果，高對比的影像可能產生的直方圖會有變異致使在安靜區域中的錯誤標註。統一的結果是全部 FOV 使用相同的參數值。此能顯著地移除來自安靜區域中之背景雜訊的標註，並能在大樣本範圍中提供清楚且未偏差的空間圖案。

【0116】 要選擇將被跨於全部 FOV 使用的一參數值，有各種作法是可能的。一個選項是簡單地挑一個預先決定的 FOV (例如第一個量測的 FOV 或接近樣本中心的 FOV) ，並使用用於該預先決定的 FOV 的參數值。另一選項是對跨於多個 FOV 之參數的值取平均，接著利用該平均值。另一個選項是決定哪個 FOV 造成像素字與經標記的碼字之間的最佳適配。例如，在經標記碼字與用於該些碼字之像素字之間有最小的平均距離 $d(p, b_1)$ 的 FOV 能被決定而接著被選擇。

【0117】 替代地，能在空間轉錄體學分析之前進行統一，例如在步驟 208 與 210 之間。在此情況中，將針對在步驟

210 之前所選擇參數（例如步驟 204 或 206 中使用的參數）進行統一，但不會針對步驟 210 及 212 中的參數進行。

【0118】 資料處理設備現能進行拼接及分區（segmentation）（步驟 214）。拼接將多個 FOV 合併成單一影像。能利用各種技術進行拼接。參看第 9 圖，一種做法是，對於在一起將形成樣本之合併影像的 FOV 的各列以及對於該列內的各 FOV，決定各 FOV 的一水平位移。一旦計算了水平位移，對於 FOV 的各列計算一垂直位移。能基於交互相關性（例如相位相關性）來計算該水平及垂直位移。有了用於各 FOV 的水平及垂直位移，能生成單一合併影像，並能基於該水平及垂直位移將基因座標轉移至合併影像。

【0119】 能加入有關該合併螢光影像中之特定座標處（如從 FOV 中之座標及該 FOV 的水平及垂直位移所決定者）表現了一基因的一指示，例如當作元資料。此指示能被稱為「標註（callout）」。

【0120】 染色影像（例如 DAPI 影像）能利用針對第 9 圖討論之技術來拼接在一起以產生合併染色影像。在一些實施方式中，不需要從所收集螢光影像產生合併螢光影像；一旦決定了用於各 FOV 的水平及垂直位移，就能計算在合併染色影像內的基因座標。染色影像能對經收集螢光影像經對位。能加入有關該合併染色影像中之特定座標處（如從 FOV 中之座標及該 FOV 的水平及垂直位移所決定者）表現了一基因的一指示，例如當作元資料，以提供標註。

【0121】 拼接的影像中仍有一潛在問題。尤其，重疊區域中可能有一些基因被重複計數。為了移除重複計數，能計算在經標記為表現一基因之各像素與經標記為表現相同基因的其他附近像素之間的一距離（例如歐幾里德距離）。若該距離在一閾值之下，其中一個標註能被移除。若一個像素群集被標記為表現一基因，能使用更複雜的技術。

【0122】 將合併影像（例如染色細胞的影像）分割成為對應於細胞之區域能利用各種已知技術來進行。分區常見在對影像的拼接之後進行，但能發生在對合併影像加標註之前或之後。

【0123】 具有指示出基因表現位置之標註的分區影像現能被儲存並呈現給使用者（例如在視覺顯示器上）以供分析。

【0124】 儘管以上討論假設各 FOV 中使用單一個 z 軸影像，但這並不是必要的。來自不同 z 軸位置的影像能被分別地處理；效果上不同 z 軸位置提供一組新的 FOV。

【0125】 如上述，一個問題在於資料處理（包括影像處理步驟）是運算上高需求且可能需要大量時間的。一個議題是，習知技術中全部的影像是在影像處理起始前獲得的。然而，隨著接收影像的同時進行即時影像處理是可能的。

【0126】 第 10 圖圖示一種經修改資料處理方法，其中影像處理經即時進行。未被特定討論的步驟能以類似第 2 圖之方法的方式來進行。一開始，資料處理系統能接收支援檔案（步驟 202a），不過此步驟可以延後到影像獲取之後。對

某些檔案而言（例如資料綱目）可能需要被載入資料處理系統以用於將進行的影像處理。

【0127】 該設備開始獲取新影像的程序（步驟202b），例如逐步藉由迴圈來調整z軸、顏色通道、橫向位置、及試劑，並獲取用於這些參數之各可能數值組合的影像。

【0128】 隨著各影像的獲取，進行品質管控（QC）測試以決定是否該影像具有足夠的品質以被預處理（步驟203），若是，則進行對該經獲取影像的即時預處理（步驟252）。在此前後文中，「即時」指示出對一影像的處理是平行於對接續影像之獲取來進行的。即時預處理能包括移除實驗性假影（步驟204）及RNA影像斑點銳化（步驟206）。可注意到由於這些影像預處理步驟是針對各影像個別地進行，且不依賴相同FOV中的其他影像或其他FOV的影像，這種方式中移動處理步驟不會不利地影響處理品質。一般，大量運算負荷能被移至當改變試劑的時候。因此，從載入樣本至流通槽中到接收具有標註之分區影像的整體時間經顯著地縮短，此能顯著地改善產出量及加速研究。

【0129】 在一些實施方式中，影像經「即時」預處理，也就是對一影像的處理是平行於該設備對接續的影像的收集來進行的，且完成於資料處理系統處接收到接續的影像之前。

【0130】 本說明書在相關於系統及電腦程式組件上利用「經配置」一詞。對於具有將被配置以進行特定操作或動作之一或更多個電腦的一系統而言，表示該系統已在其上

安裝軟體、韌體、硬體、或以上之組合，該軟體、韌體、硬體、或其組合在運作中致使該系統進行該等操作或動作。對於將被配置以進行特定操作或動作之一或更多個電腦程式而言，其表示該一或更多個程式包括指令，當該等指令被資料處理設備執行時致使該設備進行該等操作或動作。

【0131】 本說明書中所述的所請標的實施例與功能性操作能經實施在數位電子電路系統中、在有形地實現的電腦軟體或韌體中、在電腦硬體（包括本說明書中所揭露的結構與其結構均等物）中、或在以上之一或更多者之組合中。本說明書中所述所請標的實施例能經實施成一或更多個電腦程式，即具電腦程式指令的一或更多個模組，該等指令經編碼在一有形的非暫時性儲存媒體上已供由資料處理設備執行（或控制該資料處理設備的操作）。電腦儲存媒體可能是機器可讀取儲存裝置、機器可讀取儲存基板、隨機或序列存取記憶體裝置、或以上之一或更多者的組合。替代地或額外地，該等程式指令能經編碼在人工產生的傳播信號上，例如機器產生的電性、光學、或電磁信號，該信號經產生以將資訊編碼以用於傳輸至適當的接收器設備，供資料處理設備執行。

【0132】 「資料處理設備」一詞指的是資料處理硬體，並涵蓋用於處理資料的全部種類的設備、裝置、及機器，包括（例如）可程式化處理器、電腦、或多個處理器或電腦。該設備也可能是（或進一步包括）特殊用途邏輯電路系統，

例如 F P G A（現場可程式化閘陣列）或 A S I C（應用特定積體電路）。除了硬體，該設備能可選擇地包括創造用於電腦程式之一執行環境的代碼，例如構成韌體、協定疊、資料庫管理系統、作業系統、或以上的一或更多者之組合的代碼。

【0133】 電腦程式（也可稱為或描述為程式、軟體、軟體應用、應用、模組、軟體模組、描述檔（script）、或代碼）能以任何形式的程式語言寫成，包括編譯語言或直譯語言，或宣告式或程序式語言；且電腦程式能以任何形式部署，包括做為一獨立程式或作為模組、組件、次常式、或其他適合用於計算環境中的單元。程式可（但不一定）對應於檔案系統中的一檔案。程式能被儲存在保存其他程式或資料的一檔案的一部分中，例如在一標記語言文件中所儲存的一或更多個描述檔中，在專屬於有問題之程式的單一檔案中，或在多個協作檔案中（例如儲存一或更多個模組、次程式、或部分代碼的檔案）。能將電腦程式部署以在一電腦或多個電腦上執行，該多個電腦位在一地點處或跨於多個地點分散並由一資料通訊網路互連。

【0134】 本說明書中所述程序及邏輯流程能由執行一或更多個電腦程式的一或更多個可程式化電腦所執行，以藉由在輸入資料上操作並產生輸出來執行功能。該等程序及邏輯流程也能由特殊用途邏輯電路系統進行，例如 F P G A 或 A S I C，或藉由特殊用途邏輯電路系統與一或更多個經程式化之電腦的組合。

【0135】 適合用於一電腦程式之執行的電腦能為基於一般用途微處理器或特殊用途微處理器或兩者的，或者是基於任何其他種類的中央處理單元。一般，中央處理單元將從唯讀記憶體或隨機存取記憶體或兩者來接收指令及資料。電腦的基本元件是用於執行指令的中央處理單元與用於儲存指令及資料的一或更多個記憶體裝置。中央處理單元及記憶體能補充有（或併入）特殊用途邏輯電路系統。一般，電腦也將包括用於儲存資料的一或更多個大量儲存裝置、或與該一或更多個大量儲存裝置操作耦合以自其接收資料或傳輸資料至該大量儲存裝置，該大量儲存裝置例如磁性、磁光學碟片、光學碟片。然而，電腦不必然具有此類裝置。

【0136】 適合用於儲存電腦程式指令及資料的電腦可讀取媒體包括所有形式的非揮發性記憶體、媒體和記憶體裝置，包括例如半導體記憶體裝置（例如 EPROM、EEPROM、及快閃記憶體裝置）；磁碟（例如內部硬碟或可移除式碟片）；磁性光碟；及 CD-ROM 和 DVD-ROM 碟片。

【0137】 為供與使用者互動之用，本說明書中所述標的之實施例能經實施在一電腦上，該電腦具有用於對使用者顯示資訊之顯示裝置（例如 CRT（映像管）或 LCD（液晶顯示器）監視器）、及使用者能用以向電腦提供輸入的鍵盤和指向裝置（例如滑鼠或軌跡球）。也能使用其他種類的裝置來提供與使用者的互動；例如，提供給使用者的回饋能為

任意形式的感覺回饋，例如視覺回饋、聽覺回饋、或觸覺回饋；而來自使用者的輸入能以任何形式接收，包括聲音、口語、或觸覺輸入。此外，電腦能藉由發送文件至使用者使用的裝置或從該裝置接收文件來與該使用者互動；例如，藉由回應於從使用者之裝置上的網頁瀏覽器接收的請求，而向該網頁瀏覽器發送網頁。另外，電腦能藉由向一個人裝置（例如正執行傳訊應用的智慧型手機）發送文字訊息或其他形式的訊息來與使用者互動，並從該使用者接收回覆性訊息作為回報。

【0138】 用於實施機器學習模型的資料處理設備也能包括（例如）特殊用途硬體加速器單元，其用於處理機器學習訓練或生產（即推論）工作量上共同的且計算密集之部分。

【0139】 能利用一機器學習架構來實施及部署機器學習模型，該機器學習架構例如 TensorFlow 架構、Microsoft Cognitive Toolkit 架構、Apache Singa 架構、或 Apache MXNet 架構。

【0140】 本說明書中所述標的之實施例能經實施在包括一後端組件（例如資料伺服器）、或包括中介軟體組件（例如應用伺服器）、或包括前端組件（例如客戶端電腦，該客戶端電腦具有圖形化使用者介面、網頁瀏覽器、或 app，使用者藉由該圖形化使用者介面、該網頁瀏覽緝或該 app 能與本說明書中所述標的之實施互動）、或此類後端、中介軟體、或前端組件中一或更多者之任意組合之計算系統中。該系統的組件能由任何形式的數位資料通訊或其介質

所互連，例如通訊網路。通訊網路的範例包括區域網路（LAN）及廣域網路（WAN），例如網際網路。

【0141】 儘管本說明書包含許多特定的實施方式細節，這些不應被解讀為對任何發明之範疇或對所請標的之範疇的限制，卻應被認為是對特定於某些發明之某些實施例之特徵的描述。本說明書中在不同實施例之情境中說明的特定特徵也能結合在單一實施例中而實施。相反地，在單一實施例的情境中說明的各不同特徵也能被獨立地實施在多個實施例中或在任何適當的次組合中。此外，雖然以上可能將特徵描述為以特定組合來作動且甚至一開始經聲明為如此，但來自一個經聲明之組合的一或更多個特徵在某些情況中能從該組合中去除，且該經聲明之組合可針對一個次組合或是一個次組合的變化型。

【0142】 類似地，儘管在圖式中描繪並記載於申請專利範圍中的操作有特定順序，此不應被理解為要達成所欲效果，就必須要求此類操作必須以所圖示之特定順序或循序地進行，或者全部所描繪之操作必須被進行。在某些情況中，多工及平行處理可能是有益的。此外，上述實施例中各不同系統模組及組件的區分不應被理解為在全部實施例中均必須有此種區分，並應理解所述程式組件及系統一般能被一起整合在單一軟體產品中或包裝成為多個軟體產品。

【0143】 以上已說明所請標的之特定實施例。其他實施例在以下申請專利範圍之範疇內。例如，申請專利範圍中所

記動作能以不同順序進行並仍達成所欲結果。作為一例，隨附圖中描繪的程序不必然需要有所圖式的特定順序（或循序）以達成所欲結果。在一些情況中，多工及平行處理可為有益的。

【符號說明】

【0144】

1 0 0 : m F I S H 成 像 及 影 像 處 理 設 備

1 0 : 樣 本

1 1 0 : 流 通 槽

1 1 2 : 雜 合 試 劑 來 源

1 1 2 a : 試 劑

1 1 2 b : 清 洗 流 體

1 1 4 : 閥

1 1 6 : 泵

1 1 8 : 載 物 台

1 1 8 a : 直 線 致 動 器

1 1 8 b : Z 軸 致 動 器

1 1 9 : 化 學 廢 料 管 理 次 系 統

1 2 0 : 螢 光 顯 微 鏡

1 2 2 : 激 發 光 源

1 2 2 a : 雷 射 模 組

1 2 4 : 顯 微 鏡 主 體

1 2 8 : 濾 光 輪

1 2 8 a : 濾 光 片

- 1 2 8 b : 致 動 器
- 1 3 0 : 激 發 光
- 1 3 2 : 螢 光
- 1 3 4 : 攝 影 機
- 1 3 6 : 物 鏡
- 1 3 8 : 多 頻 帶 分 光 鏡
- 1 4 0 : 控 制 器
- 1 4 2 : 電 腦
- 1 4 4 : 第 一 微 控 制 器
- 1 4 6 : 第 二 微 控 制 器
- 1 5 0 : 影 像 處 理 系 統
- 1 5 2 : 資 料 處 理 裝 置
- 1 5 4 : 儲 存 裝 置
- 1 5 6 : 遠 端 存 儲
- 2 0 2 : 步 驟
- 2 0 2 a : 步 驟
- 2 0 2 b : 步 驟
- 2 0 3 : 步 驟
- 2 0 4 : 步 驟
- 2 0 6 : 步 驟
- 2 0 8 : 步 驟
- 2 1 0 : 步 驟
- 2 1 2 : 步 驟
- 2 1 4 : 步 驟

- 2 5 2 : 步 驟
- 2 5 4 : 步 驟
- 3 0 2 : 經 收 集 影 像
- 3 0 4 a , 3 0 4 b , 3 0 4 c , 3 0 4 d : 影 像 區 塊
- 3 0 6 : 加 總 影 像
- 3 0 8 : 堆 疊
- 3 1 0 : 經 對 位 影 像
- 3 1 2 : 堆 疊
- 4 0 0 : 對 數 直 方 圖
- 4 0 2 : 第 一 峰 值
- 4 0 4 : 第 二 峰 值
- 4 1 0 : 閾 值
- 6 0 2 : 直 方 圖
- 6 0 4 : 尾 端
- 6 1 0 : 折 線
- 6 2 0 : 直 方 圖
- 7 0 2 : 像 素 字 之 矩 陣
- 7 0 4 , 7 2 4 : 列
- 7 0 6 , 7 2 6 : 行
- 7 1 0 : 像 素 字
- 7 2 2 : 碼 簿 / 參 考 碼 字 之 矩 陣
- 7 3 0 : 參 考 碼 字
- 8 0 2 , 8 1 2 : 直 方 圖
- 8 0 4 , 8 1 4 : 閾 值

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種螢光原位雜合成像系統，包含：

一流通槽，用以容納一樣本，該樣本將暴露於一試劑中之螢光探針；

一閥，用以控制來自該流通槽之複數個試劑來源中之一者的流動；

一泵，用以致使通過該流通槽的流體流動；

一螢光顯微鏡，該螢光顯微鏡包括一可變頻激發光源及一攝影機，該攝影機經定位以接收從該樣本螢光發射的光；

一致動器，用以致使該流通槽及該螢光顯微鏡之間的相對垂直運動；

一馬達，用以致使該流通槽及該螢光顯微鏡之間的相對橫向運動；及

一控制系統，該控制系統經配置以作為巢狀迴圈地進行以下步驟，

致使該閥依序將該流通槽耦接至複數個不同試劑來源，以將該樣本暴露至複數個不同試劑，

對於該複數個不同試劑中的各試劑，致使該馬達依序將該螢光顯微鏡相對於位於複數個不同視野處之樣本定位，

對於該複數個不同視野中的各視野，致使該可變頻激發光源依序發射複數個不同波長，

對於該複數個不同波長中的各波長，致使該致動器

依序將該螢光顯微鏡相對於位於複數個不同垂直高度處之樣本定位，及

對於該複數個不同垂直高度中的各垂直高度，獲得位於該相應垂直高度處的一影像，該相應垂直高度涵蓋該樣本的該相應視野，該樣本讓該相應試劑的相應螢光探針被激發於該相應波長。

【請求項 2】 如請求項 1 之系統，其中該可變頻激發光源包含複數個雷射模組，及該控制系統經配置以依序啟用該等雷射模組以依序發射該複數個不同波長。

【請求項 3】 如請求項 2 之系統，其中該控制系統包括用以控制該閥及該馬達的一電腦，以及用以控制該雷射模組和該致動器的一微控制器。

【請求項 4】 如請求項 1 之系統，包含用以在該流通槽中支撐該樣本的一載物台，及其中該馬達包含一對直線致動器，該對直線致動器經配置以沿著一對垂直的軸來驅動該載物台。

【請求項 5】 如請求項 1 之系統，進一步包含一資料處理系統，該資料處理系統經配置以對於該複數個不同視野中至少兩個視野的各視野並對於在該視野之影像中共享的至少兩個像素中的各像素，藉由從一碼簿中之複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對該視野而言該複數個影像中對該像素之資料數值的最佳匹配。

【請求項 6】 一種螢光原位雜合成像及分析系統，包含：
一流通槽，用以容納一樣本，該樣本將暴露於一試劑

中之螢光探針；

一螢光顯微鏡，用以依序於複數個不同成像參數組合獲得收集該樣本的複數個影像；及

一資料處理系統，包括

一線上預處理系統，該線上預處理系統經配置以隨著該等影像被收集而從該螢光顯微鏡依序接收該等影像，並進行即時影像預處理以移除該等影像的實驗性假影及提供 RNA 影像斑點銳化，及

一離線處理系統，該離線處理系統經配置以在收集該複數個影像之後，對具有一相同視野之影像進行對位，並將該複數個影像中的強度值解碼以辨識出所表現的基因。

【請求項 7】 如請求項 6 之系統，其中該資料處理系統經配置以決定用於各影像的一影像品質值，且若該影像品質值不符合一品質閾值則篩除該影像以不經預處理。

【請求項 8】 如請求項 6 之系統，其中該資料處理系統經配置以決定用於各影像的複數個影像品質值，且若該等影像品質值之任意者不符合一相關聯品質閾值則篩除該影像以不經預處理。

【請求項 9】 一種螢光原位雜合成像系統，包含：

一流通槽，用以容納將被暴露至一試劑中之螢光探針的一樣本；

一螢光顯微鏡，該螢光顯微鏡包括

一可變頻激發光源，用以照亮該樣本，

複數個發射帶通濾光片，該複數個發射帶通濾光片在一濾光輪上，

一致動器，用以旋轉該濾光輪，

一攝影機，該攝影機經定位以接收從該樣本螢光發射的光，該光已通過該濾光輪上的一濾光片；

一控制系統，該控制系統經配置以致使該可變頻激發光源發出一光束，該光束具有一所選波長，

致使該致動器旋轉該濾光輪以將一所選濾光片定位在該樣本與該攝影機之間的一光路徑中，

從該攝影機獲得一影像，及

協調該可變頻激發光源及濾光輪，使得當獲得該影像時，該所選濾光片具有關聯於該等螢光探針被該所選波長激發時的發光的一發射帶通。

【請求項 10】 如請求項 9 之系統，其中該控制系統包含一第一微控制器，其用以回應於一第一觸發信號而致使該致動器旋轉該濾光輪。

【請求項 11】 如請求項 10 之系統，其中該控制系統包含一第二微控制器，其用以回應於一第二觸發信號而致使該可變頻激發光源發出具有該所選波長的該光束。

【請求項 12】 如請求項 11 之系統，其中該第一微控制器經配置以產生該第二觸發信號。

【請求項 13】 如請求項 12 之系統，其中該第二微控制器經配置以發送一第三觸發信號至該攝影機以致使影像獲

取。

【請求項 14】如請求項 9 之系統，包含一分光濾光片，該分光濾光片在該樣本與該攝影機之間的光路徑中或在該樣本與該濾光輪之間的光路徑中。

【請求項 15】如請求項 14 之系統，其中該分光鏡是一多通分光鏡，該多通分光鏡具有用於該等螢光探針之各發射波長的一通帶。

【請求項 16】如請求項 9 之系統，其中該複數個發射帶通濾光片之各濾光片具有一獨一頻帶且關聯於用於該可變頻激發光源的一獨一波長。

【請求項 17】如請求項 9 之系統，其中該可變頻激發光源經配置以藉正交於該樣本的激發光來照亮該樣本。

【請求項 18】一種電腦程式產品，包含一非暫時性電腦可讀取媒體，該非暫時性電腦可讀取媒體具有指令以致使一或更多個處理器進行以下步驟：

對該複數個影像的各影像應用一或更多個濾光片並在各影像上進行解卷積，來產生複數個經過濾的影像；

進行該複數個經過濾的影像的對位以產生複數個經對位及過濾的影像；

對於該複數個經對位及過濾的影像之至少兩個像素的各像素，藉由以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經對位及過濾的影像之資料數值的一最佳匹配；

及

對於至少兩個像素之各像素，決定關聯於該碼字的一基因，並儲存有關該像素處表現了該基因的一指示。

【請求項 19】如請求項 18 之電腦程式產品，其中用以進行對位的該指令包含指令以：

對於該複數個經過濾的影像的各經過濾的影像

將該經過濾的影像分割成具有相等尺寸的複數個次影像，

從該複數個次影像計算出一合併影像，該合併影像具有的尺寸等於一次影像的尺寸，及藉而產生複數個縮小影像，使該複數個影像的各影像具有一對應縮小影像，

對於該複數個縮小影像的至少一個縮小影像，決定一轉換來對位該複數個縮小影像；

對於該至少一個縮小影像的之各者，對該對應經過濾影像應用針對該縮小影像所決定的該轉換，來產生一經轉換影像，該經轉換影像具有的尺寸等於該初始影像的尺寸，及藉而產生複數個經轉換影像。

【請求項 20】如請求項 18 之電腦程式產品，進一步包含指令以：對於該複數個影像的各影像，將高於一閾值的亮度值設定至一最大亮度值，並基於該最大值將低於該閾值的其餘亮度值依比例調整（scale）。

【請求項 21】如請求項 18 之電腦程式產品，進一步包含指令以：對於該複數個影像的各影像，進行場域攤平及/或色差校正。

【請求項22】一種電腦程式產品，包含一非暫時性電腦可讀取媒體，該非暫時性電腦可讀取媒體具有指令以致使一或更多個處理器進行以下步驟：

接收一樣本的複數個初始影像，該複數個初始影像共享一共同視野；

對於該複數個初始影像的各初始影像

將該初始影像分割成具有相等尺寸的複數個次影像，

從該複數個次影像計算出一合併影像，該合併影像具有的尺寸等於一次影像的尺寸，及藉而產生複數個縮小影像，使該複數個影像的各影像具有一對應縮小影像，

對於該複數個縮小影像的至少一個縮小影像，決定一轉換來對位該複數個縮小影像；

對於該至少一個縮小影像的各者，對該對應初始影像應用針對該縮小影像所決定的該轉換，來產生一經轉換影像，該經轉換影像具有的尺寸等於該初始影像的尺寸，及藉而產生複數個經轉換影像；及

對於該複數個經轉換影像之至少兩個像素的各像素，藉由以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經轉換影像中之資料數值的一最佳匹配；及

對於至少兩個像素之各像素，決定關聯於該碼字的一基因，並儲存有關該像素處表現了該基因的一指示。

【請求項 23】如請求項 22 之電腦程式產品，其中用以計算該合併影像的該指令包含用以藉一不同相位偏移量來將該等縮小影像相移以產生經相位偏移的縮小影像的指令。

【請求項 24】如請求項 23 之電腦程式產品，其中用以計算該合併影像的該指令包含用以加總該等相移縮小影像以產生一複合影像的指令。

【請求項 25】如請求項 24 之電腦程式產品，其中用以計算該合併影像的該指令包含用以將該複合影像的實部與虛部加總以形成該合併影像的指令。

【請求項 26】一種電腦程式產品，包含一非暫時性電腦可讀取媒體，該非暫時性電腦可讀取媒體具有指令以致使一或更多個處理器進行以下步驟：

接收一樣本的複數個影像，該複數個影像代表一共同視野；

進行該複數個影像的對位以產生複數個經對位影像；

對於該經對位影像之複數個像素的各像素，藉以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經對位影像中之資料數值的一最佳匹配；及

對於經識別為對於一或更多個像素之一最佳匹配的各碼字以及對於該一或更多個像素之各像素，決定是否針對該像素的一影像字的一位元比符合用於該碼字的一閾值，該影像字是形成自針對該像素的該複數個經對位影

像中的該等資料數值；及

對於經決定為符合該閾值的至少一個像素，決定關聯於該碼字的一基因，並儲存有關該像素處表現了該基因的一指示，並篩除其位元比不符合該閾值的像素。

【請求項 27】如請求項 26 之電腦程式產品，其中該碼字包含一碼值序列且該影像字包含一資料數值序列，該資料數值序列中的各資料數值具有在該碼值序列中的一對應碼值。

【請求項 28】如請求項 27 之電腦程式產品，其中用以決定該位元比的該指令包含用以決定該碼字中哪些碼值指示出一開啟狀態及該碼字中哪些碼值指示出一「關閉」狀態的指令。

【請求項 29】如請求項 28 之電腦程式產品，其中用以決定該位元比的該指令包含用以決定該影像字中對應於該碼字中指示出一開啟狀態之碼值的資料數值的一第一平均的指令。

【請求項 30】如請求項 29 之電腦程式產品，其中用以決定該位元比的該指令包含用以決定該影像字中對應於該碼字中指示出一關閉狀態之碼值的資料數值的一第二平均的指令。

【請求項 31】如請求項 30 之電腦程式產品，其中用以決定該位元比的該指令包含用以將該第一平均除以該第二平均的指令。

【請求項 32】一種電腦程式產品，包含一非暫時性電腦可

讀取媒體，該非暫時性電腦可讀取媒體具有指令以致使一或更多個處理器進行以下步驟：

接收一樣本的複數個影像，該複數個影像代表一共同視野；

進行該複數個影像的對位以產生複數個經對位影像；

對於該經對位影像之複數個像素的各像素，藉以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該複數個經對位影像中之資料數值的一最佳匹配；及

對於經識別為對於一或更多個像素之一最佳匹配的各碼字以及對於該一或更多個像素之各像素，決定是否針對該像素的一影像字的一位元亮度符合用於該碼字的一閾值，該影像字是形成自針對該像素的該複數個經對位影像中的該等資料數值；及

對於經決定為符合該閾值的各像素，決定關聯於該碼字的一基因，並儲存有關該像素處表現了該基因的一指示，並篩除其位元比不符合該閾值的像素。

【請求項 3 3】 如請求項 3 2 之電腦程式產品，其中該碼字包含一碼值序列且該影像字包含一資料數值序列，該資料數值序列中的各資料數值具有在該碼值序列中的一對應碼值。

【請求項 3 4】 如請求項 3 3 之電腦程式產品，其中用以決定該位元亮度的該指令包含用以決定該碼字中哪些碼值指示出一開啟狀態及該碼字中哪些碼值指示出一關閉狀

態的指令。

【請求項 35】如請求項 34 之電腦程式產品，其中用以決定該位元亮度的該指令包含用以決定該影像字中對應於該碼字中指示出一開啟狀態之碼值的資料數值的一平均的指令。

【請求項 36】如請求項 32 之電腦程式產品，包含用以進行以下步驟的指令：對於經識別為對於一或更多個像素之一最佳匹配的各碼字並對於該一或更多個像素的各像素，決定是否針對該像素的一影像字的一位元比符合用於該碼字的一第二閾值，並篩除其位元比不符合該第二閾值的像素。

【請求項 37】如請求項 36 之電腦程式產品，包含用以進行以下步驟的指令：藉由決定在來自該樣本之該複數個影像的位元值的一直方圖中位於一第一分位數極限的一值來決定該閾值，及藉由決定在來自該樣本之該複數個影像的位元值的一直方圖中位於一第二分位數極限的一第二值來決定該第二閾值，其中該第二分位數極限高於該第一分位數極限。

【請求項 38】一種電腦程式產品，包含一非暫時性電腦可讀取媒體，該非暫時性電腦可讀取媒體具有指令以致使一或更多個處理器進行以下步驟：

接收一樣本的複數個初始影像，該複數個初始影像包括用於複數個不同視野之各視野的多重影像；

儲存用以進行一影像處理演算法的指令，在該影像處

理演算法中包括對該視野之該多重影像的影像過濾或該視野之該多重影像的對位中之一或更多者；

對於各視野，決定一或更多個初始參數值，其中不同視野具有不同初始參數值；

利用用於該不同視野的該不同初始解碼參數值，對各視野進行該影像處理演算法；

決定一或更多個接續的解碼參數值；及

利用用於該不同視野的相同接續參數值，對各視野進行該影像處理演算法及一解碼演算法，以產生一組空間轉錄體學資料。

【請求項 39】 如請求項 38 之電腦程式產品，其中用以決定該一或更多個接續的參數值的指令包括用以進行以下步驟的指令：基於各視野之該一或更多個初始參數值的至少一者來決定該一或更多個接續的參數值。

【請求項 40】 如請求項 38 之電腦程式產品，包含用以從複數個平均適配度決定一最佳平均適配度的指令，及其中用以決定該一或更多個接續的參數值的指令包含用以從關聯於該最佳平均適配度的視野的該等初始編碼參數選擇一或更多個解碼參數的指令。

【請求項 41】 如請求項 38 之電腦程式產品，包含用以在一視野陣列中選擇位於一預定位置的一視野的指令，其中用以決定該一或更多個接續的解碼參數值的指令包含用以從該預定位置處之該視野的該等初始編碼參數選擇一或更多個解碼參數的指令。

【請求項 4 2】如請求項 3 8 之電腦程式產品，其中用以決定該一或更多個接續的解碼參數值的指令包含用以平均來自該複數個視野之解碼參數的指令。

【請求項 4 3】一種電腦程式產品，包含一非暫時性電腦可讀取媒體，該非暫時性電腦可讀取媒體具有指令以致使一或更多個處理器進行以下步驟：

接收一樣本的複數個初始影像，該複數個初始影像包括用於複數個不同視野之各視野的多重影像；

對於各視野，基於該視野的該多重影像產生一組空間轉錄體學資料，各組空間轉錄體學資料包括一或更多個資料組對，該一或更多個資料組對的各資料組對包括一位置及用於該位置的一經表現基因；

決定來自鄰接視野之多重影像的重疊區域；及

從各視野的該組空間轉錄體學資料，產生用於涵蓋該複數個不同視野之一合併影像的一組合併空間轉錄體學資料，其中用以產生該組合併空間轉錄體學資料的指令包括用以在一重疊區域中篩除來自不同視野之至少一個計數兩次之資料組對，該至少一個計數兩次之資料組對代表在該樣本內之相同位置處的相同經表現基因。

【請求項 4 4】如請求項 4 3 之電腦程式產品，其中用以篩除的指令包括用以決定在一相同基因之表現位置之間的一距離及用以決定是否該距離低於一閾值的指令。

【請求項 4 5】一種電腦程式產品，包含一非暫時性電腦可讀取媒體，該非暫時性電腦可讀取媒體具有指令以致使

一或更多個處理器進行以下步驟：

接收一樣本的複數個影像，該複數個影像包括複數個視野之各視野的多重影像；

在該複數個影像的各影像上，進行該影像上的一影像品質檢核；

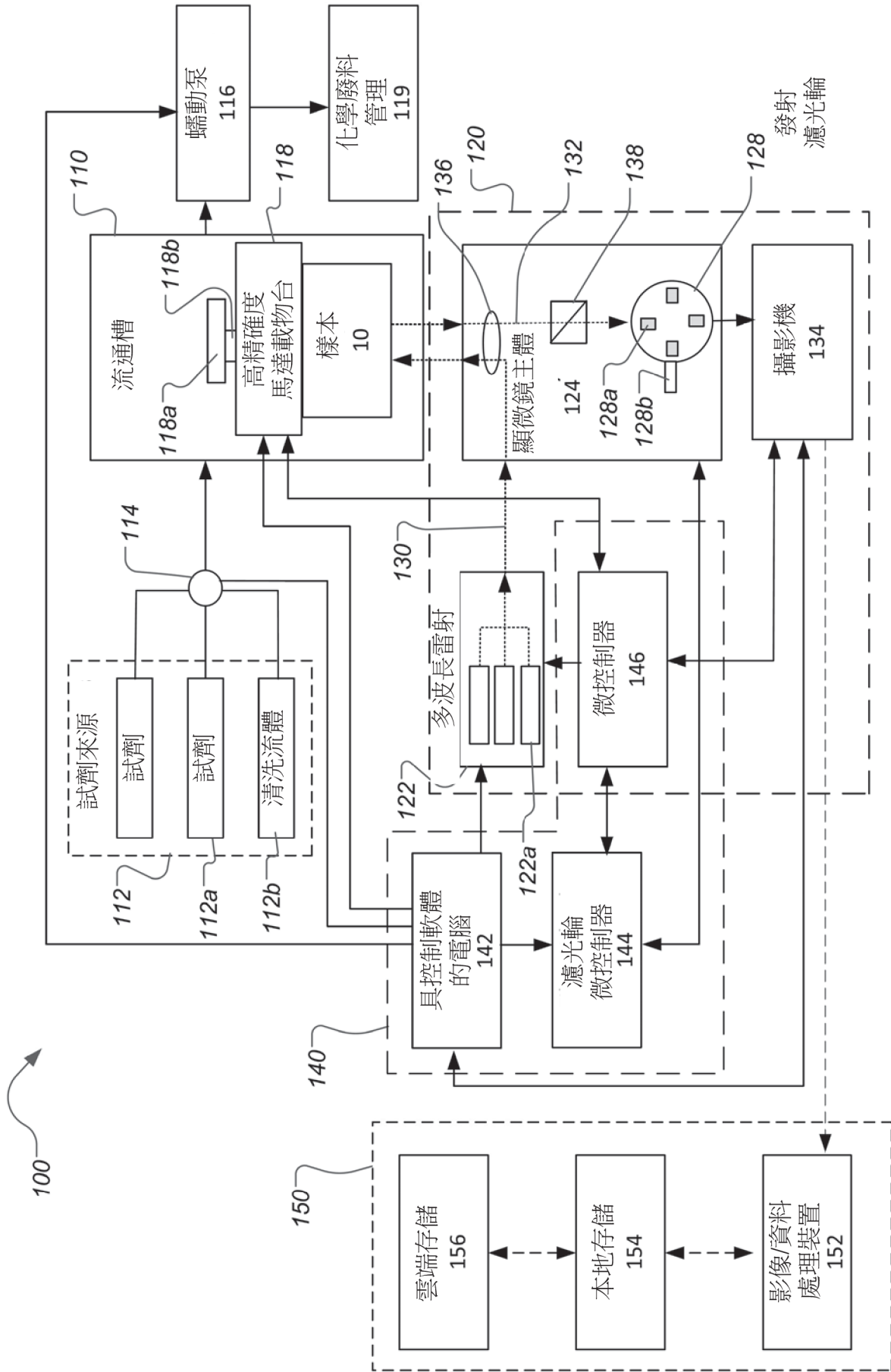
在進行該影像品質檢核之後，在該複數個影像的各影像上，從該影像移除假影；

在移除假影之後，在該複數個影像的各影像上，銳化該影像中的影像斑點；

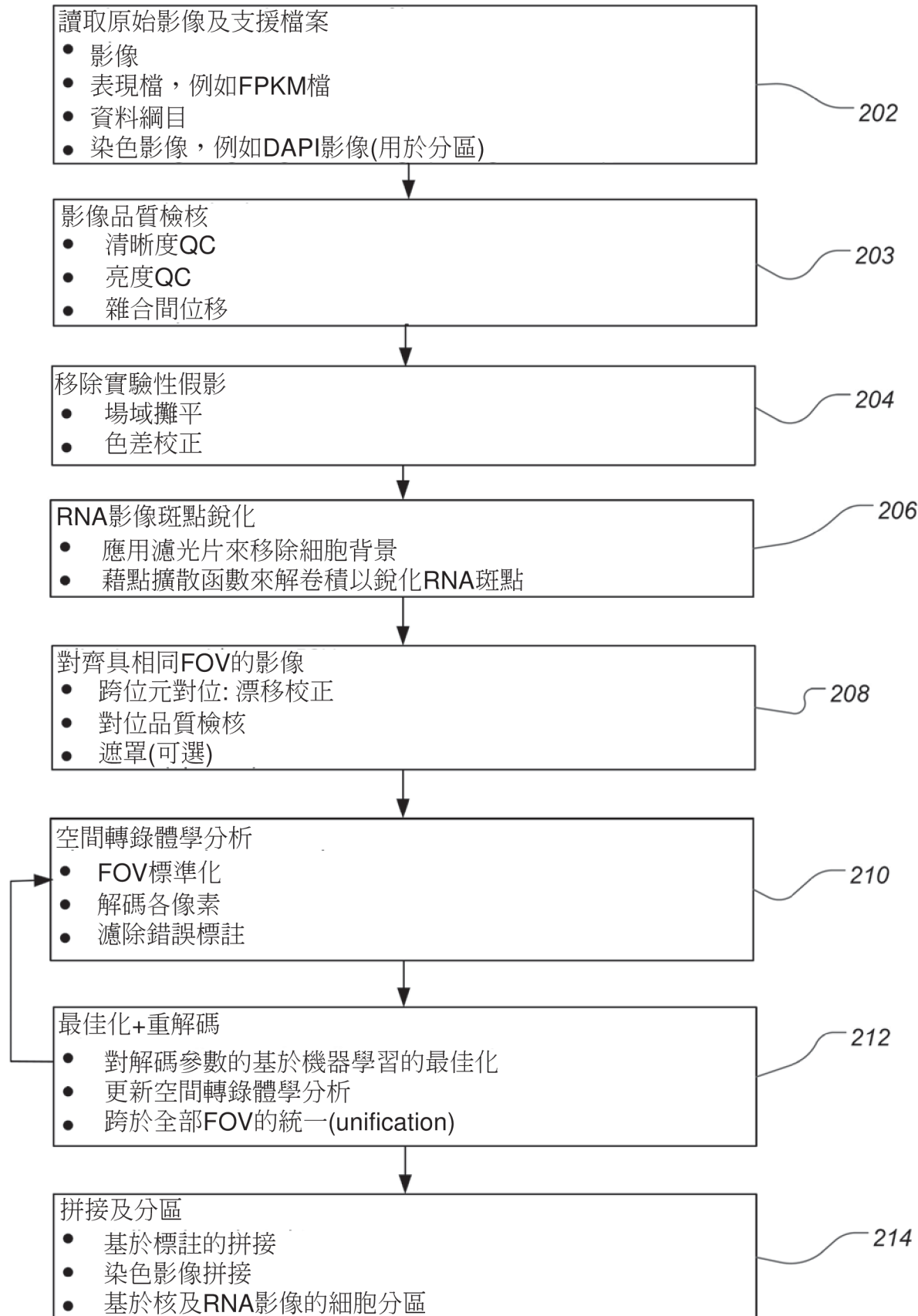
在銳化該等影像斑點之後，對於各多重影像，進行該多重影像的對位以產生一經對位影像；及

在進行對位之後，對於各多重影像，對於一相應多重影像之該經對位影像的複數個像素的各像素，藉由以下步驟來解碼該像素：從一碼簿中的複數個碼字識別出一碼字，該碼字提供對於該像素而言該相應多重經對位影像中之資料數值的一最佳匹配。

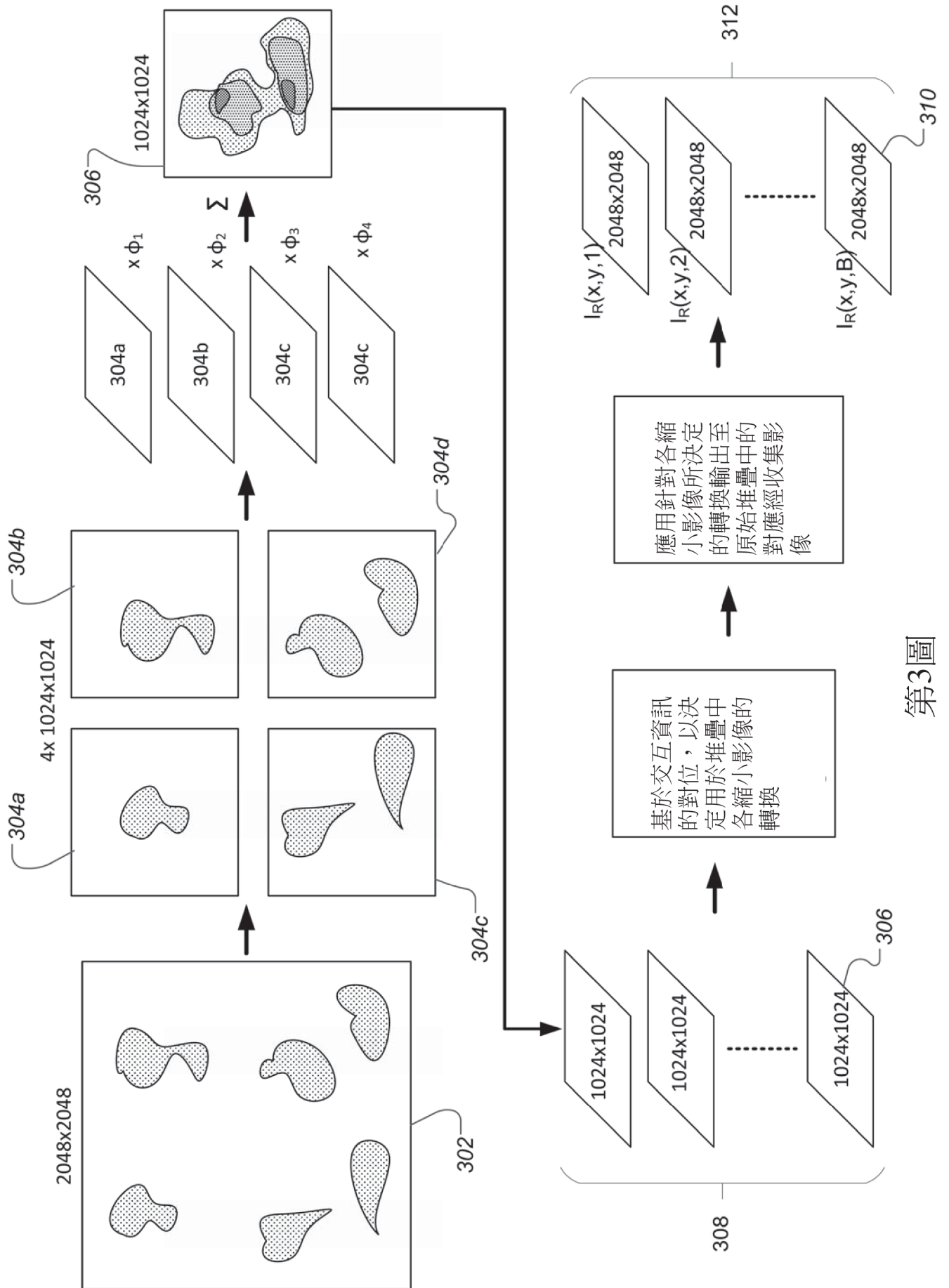
【發明圖式】



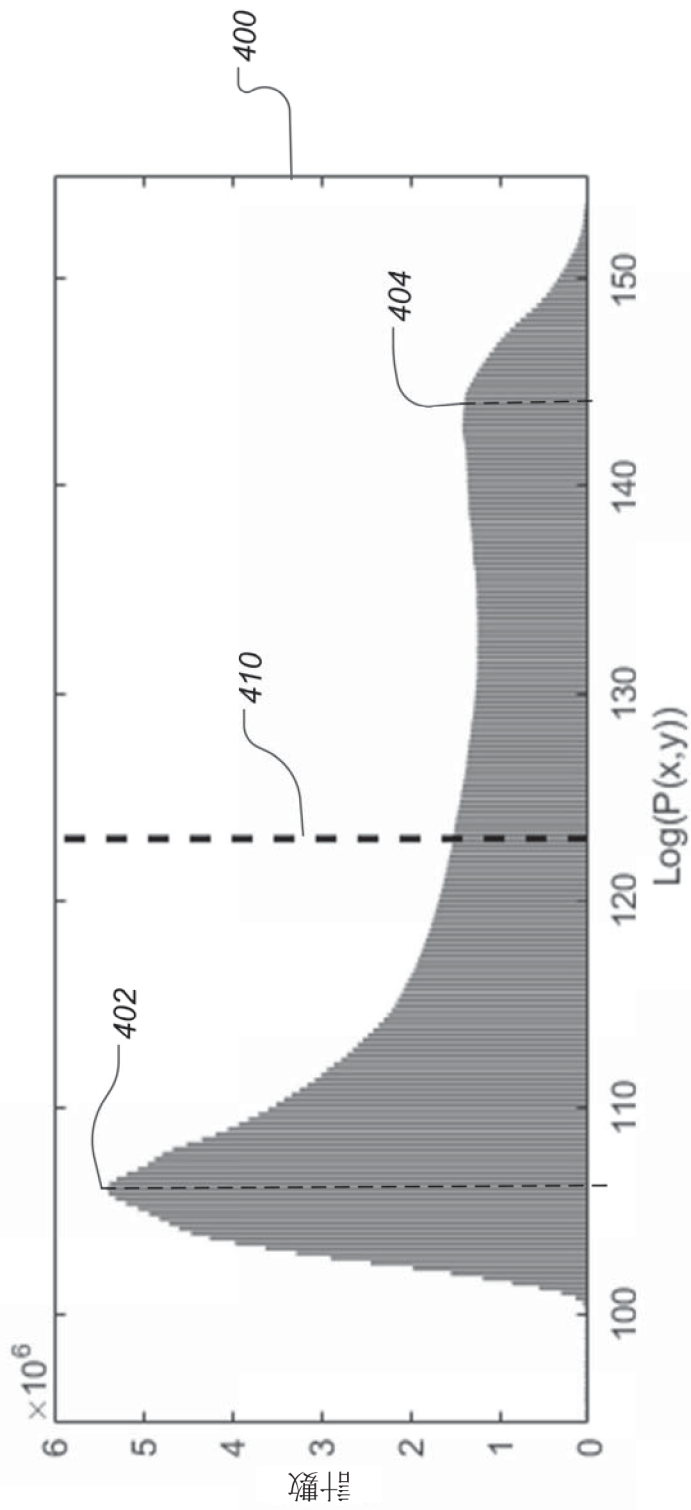
第1圖



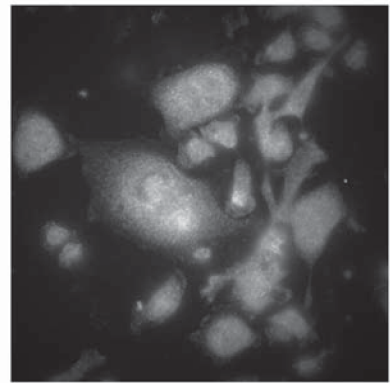
第2圖



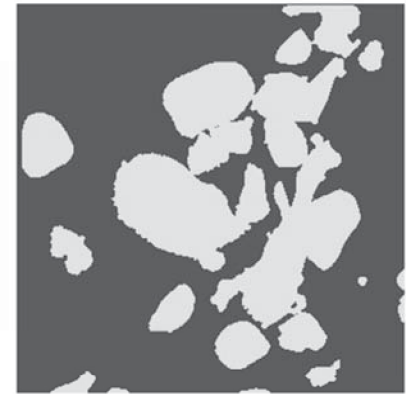
第3圖



第4圖

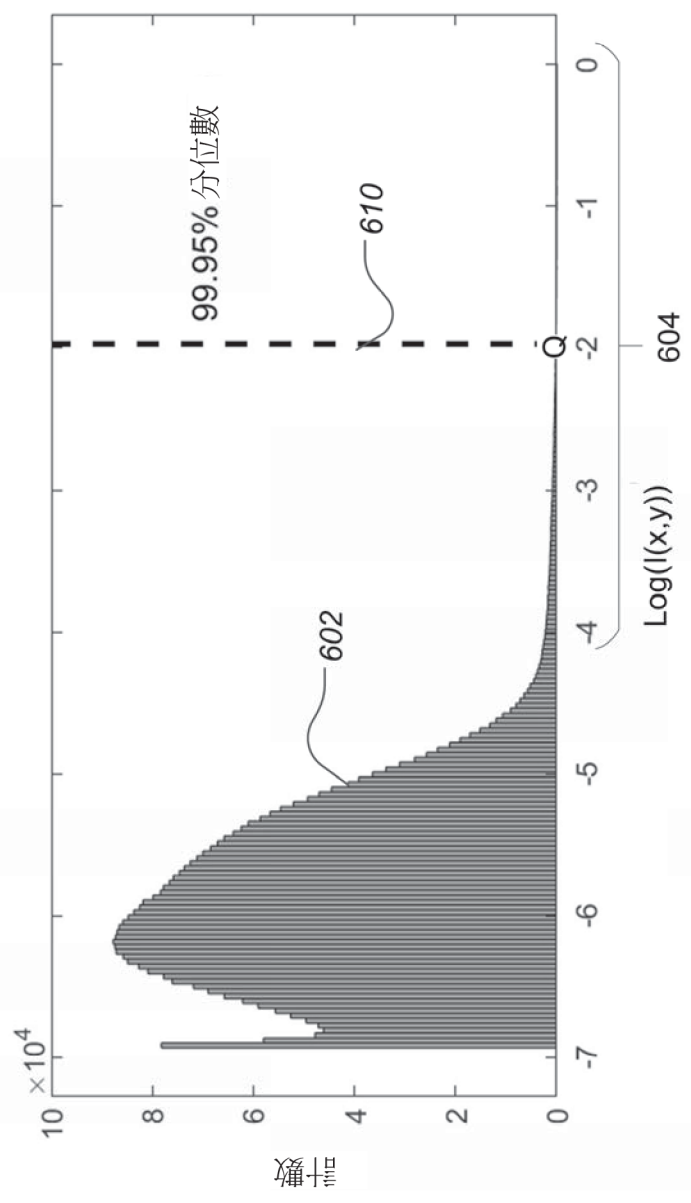


第5A圖

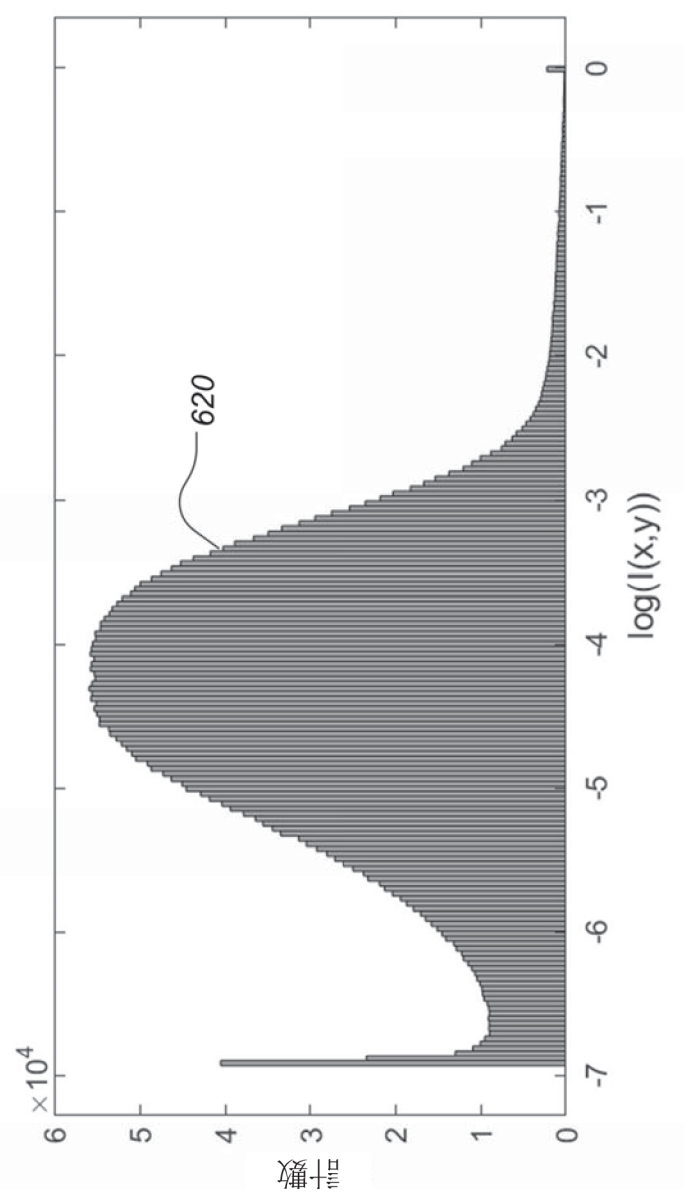


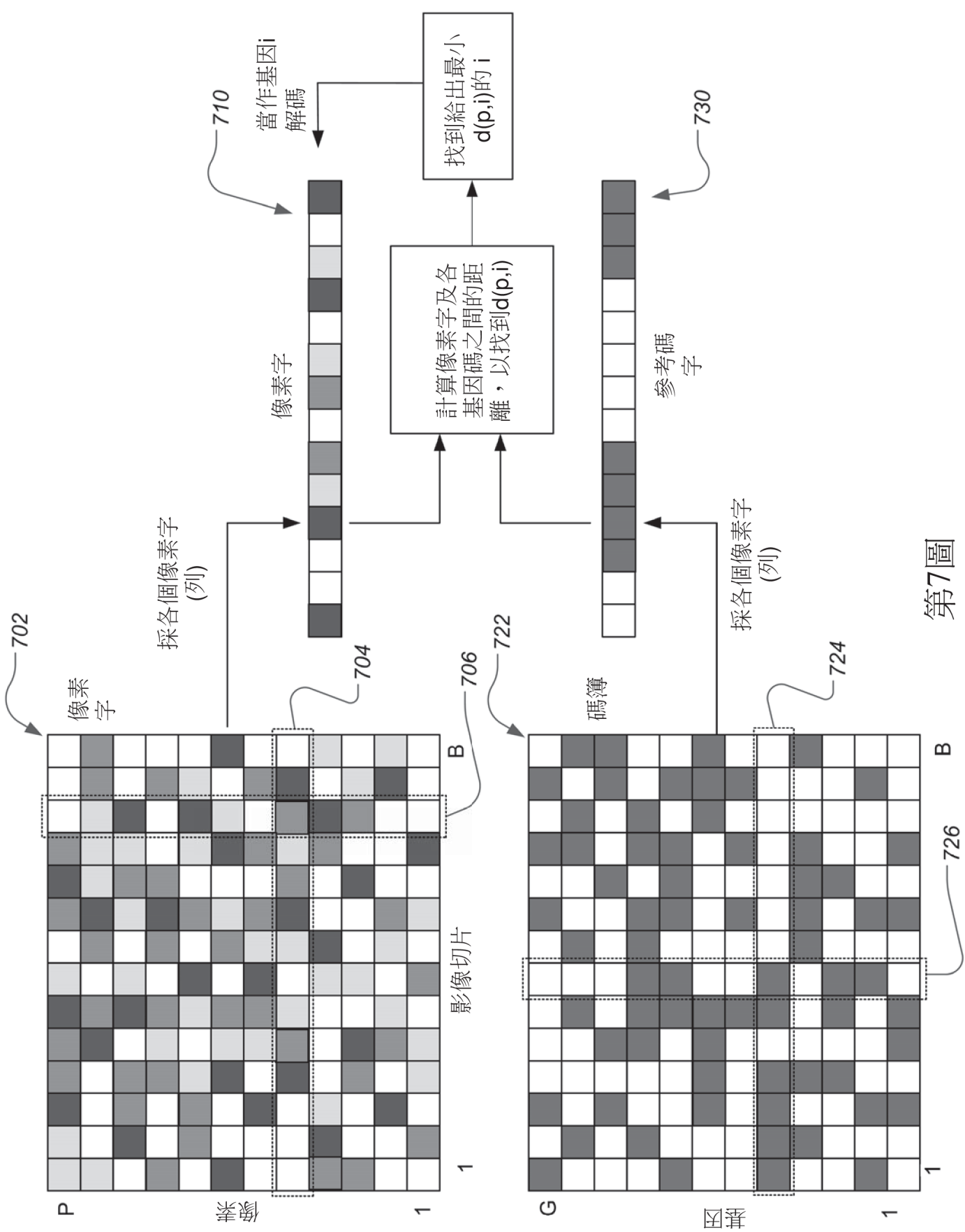
第5B圖

第6A圖



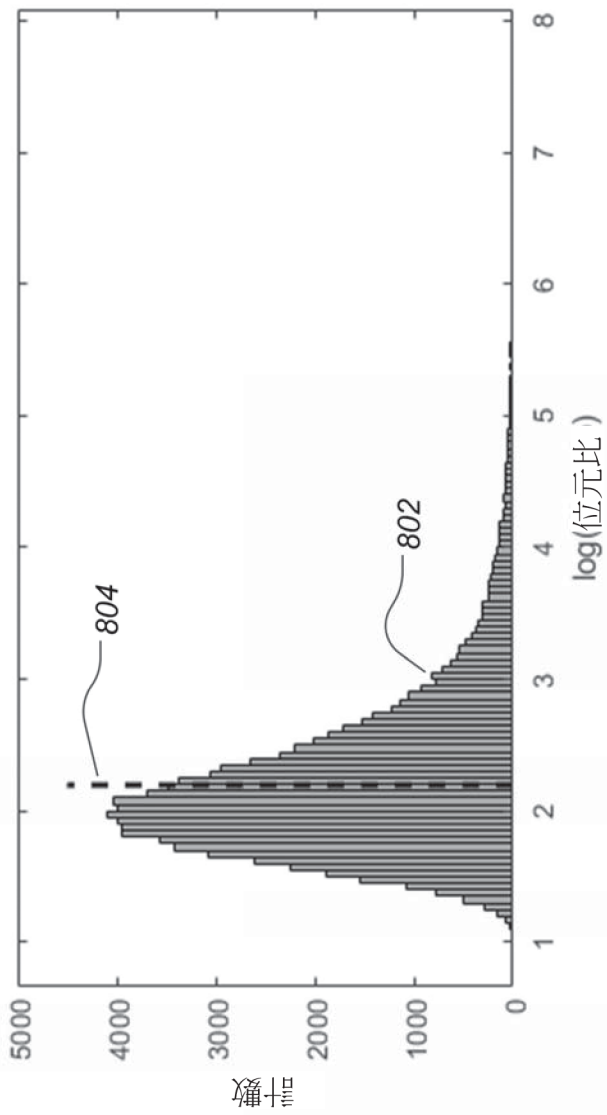
第6B圖



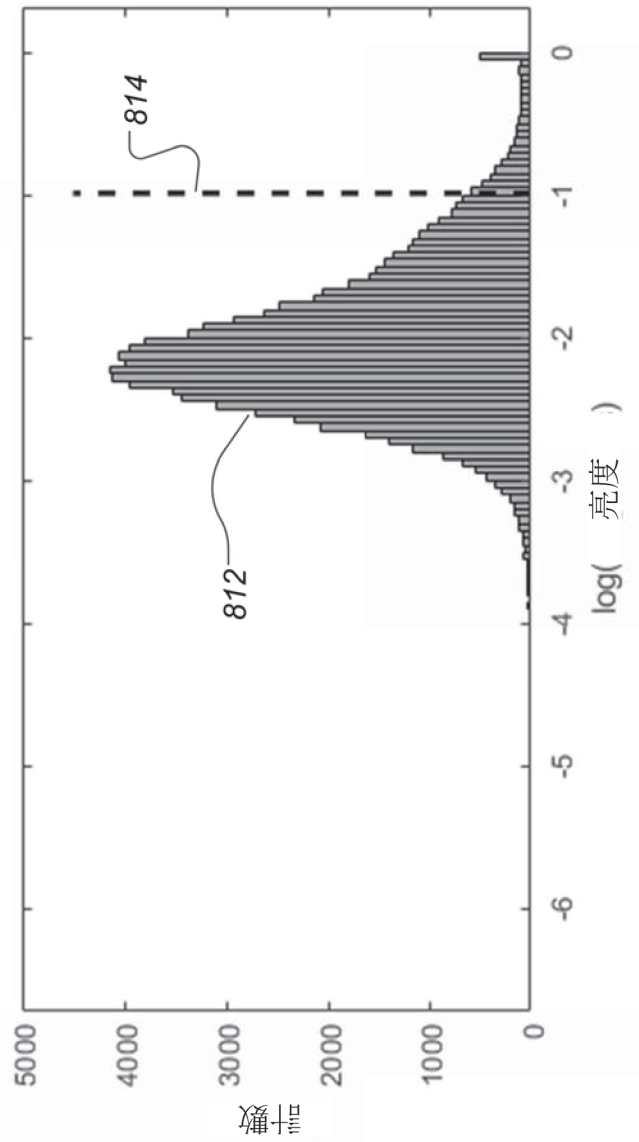


第7圖

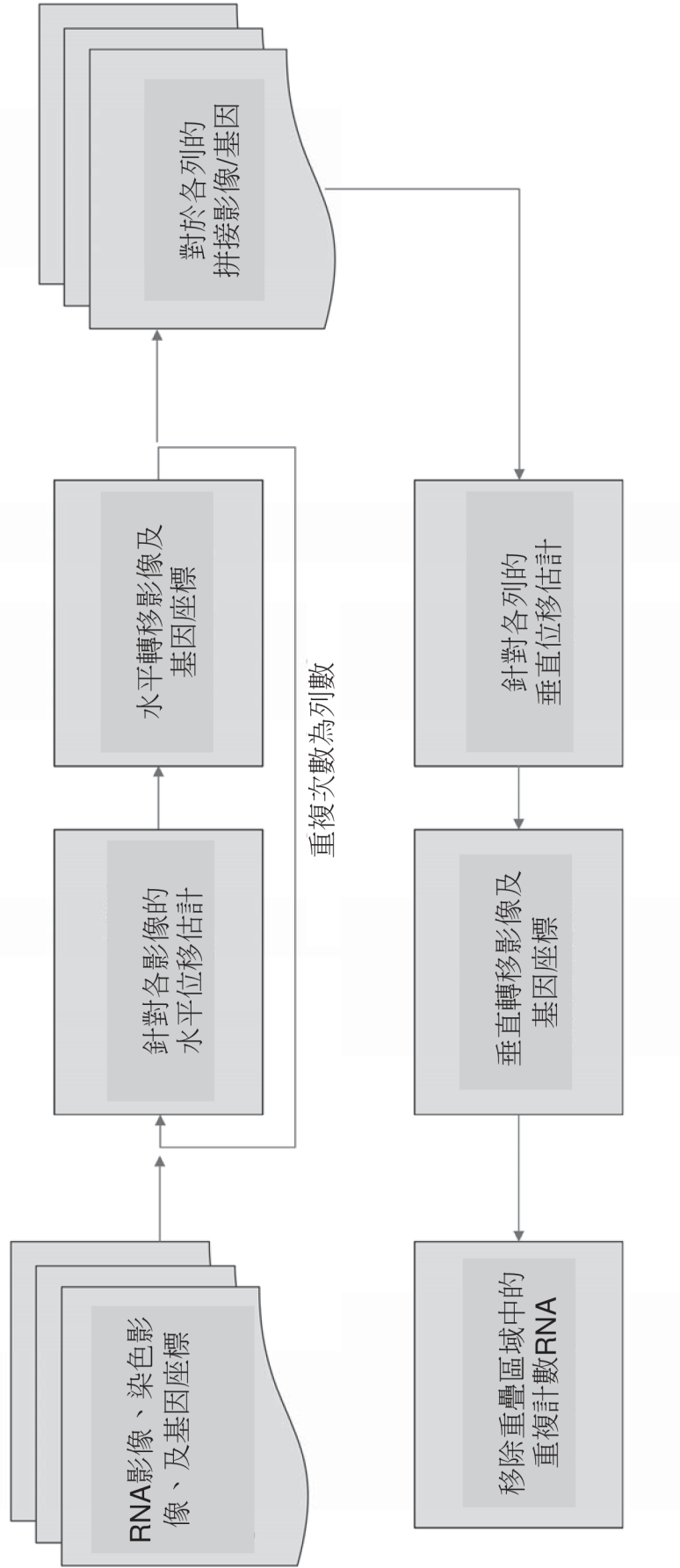
第8A圖



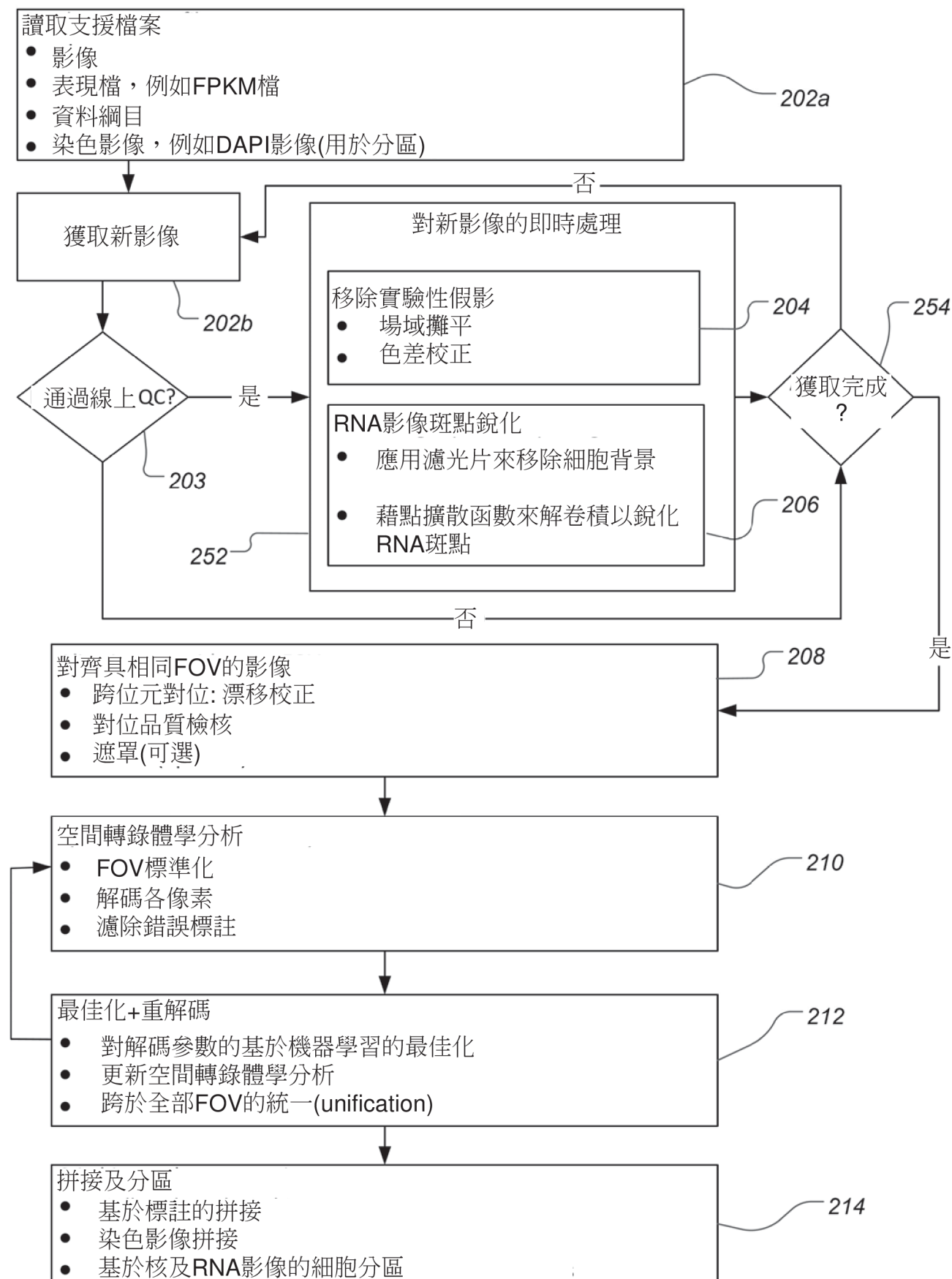
第8B圖



拼接流程



第9圖



第10圖