



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 104321421 B

(45) 授权公告日 2016. 06. 01

(21) 申请号 201280071887. 2

(22) 申请日 2012. 12. 27

(30) 优先权数据

10-2012-0032808 2012. 03. 30 KR

10-2012-0138741 2012. 12. 03 KR

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 09. 26

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/KR2012/011555 2012. 12. 27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/147398 KO 2013. 10. 03

(73) 专利权人 高丽大学校产学协力团

地址 韩国首尔市

(72) 发明人 徐晟奎 陈建秀 河云焕 白世焕

白胜弼

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理

有限公司 11205

代理人 臧建明

(51) Int. Cl.

G12M 1/34(2006. 01)

G12M 3/02(2006. 01)

G12M 1/42(2006. 01)

G12N 13/00(2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004219184 A1, 2004. 11. 04,

CN 101310173 A, 2008. 11. 19,

CN 2775060 Y, 2006. 04. 26,

CN 1086313 A, 1994. 05. 04,

CN 101072881 A, 2007. 11. 14,

审查员 穆飞航

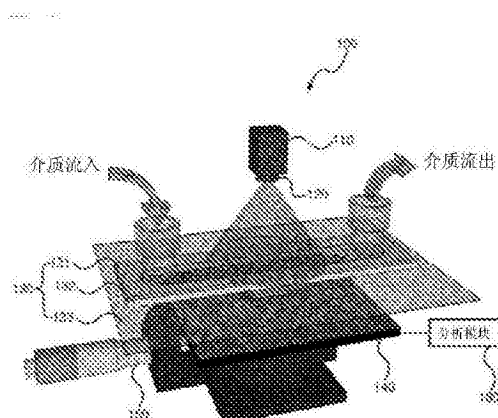
权利要求书2页 说明书9页 附图7页

(54) 发明名称

细胞活性测定装置及细胞活性分析方法

(57) 摘要

本发明涉及一种使用细胞的阴影图像以高处理速度连续地测定细胞活性来提供细胞活性结果和细胞数结果的装置。根据本发明一实施例, 不通过具有丰富经验的检验员或技术员使用显微镜, 酶标仪 (ELISA reader) 等须收集各种必须的细胞活性测定结果和细胞数结果, 而是通过开发具有低成本和紧凑型光电元件和简单的图像处理技术的硬件以及计算机软件, 使所述信息的收集自动化, 从而降低了测量成本并大大降低了测量误差。



1. 一种细胞活性测定装置,其特征在于,包括:
流体通道,配置为容纳注入其中的培养液和细胞;
发光元件,设置在所述流体通道上方并配置为在所述流体通道的方向发光;
图像传感器,设置在所述流体通道下方并配置为捕获细胞的阴影图像;以及
分析模块,配置为通过使用从所述图像传感器捕获的所述阴影图像中提取的参数来分析细胞的活性状态,

其中所述阴影图像是亮环和暗环以交替方式出现的圆形图像,并且所述参数包括以下至少一项:SNR(信噪比)值、SD(阴影直径)值、第一亮环的直径、第一暗环的直径、以及所述第一亮环与暗环之间的宽度。

2. 根据权利要求1所述的细胞活性测定装置,其特征在于,所述流体通道具有至少部分侧壁由聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成。

3. 根据权利要求2所述的细胞活性测定装置,其特征在于,所述流体通道包括:
流通池,配置为使所述培养液和细胞注入其中并从其中排出;
壁,设置在所述流通池下方,形成用于培养所注入的细胞的空间,所述壁由聚二甲基硅氧烷(PDMS)制成;以及
盖玻片,设置在所述壁的下端。

4. 根据权利要求2所述的细胞活性测定装置,其特征在于,所述发光元件包括RGB发光二极管(LED)。

5. 根据权利要求1所述的细胞活性测定装置,其特征在于,还包括:
针孔,连接到发光的所述发光元件的下端部。

6. 根据权利要求1所述的细胞活性测定装置,其特征在于,还包括:
温度调节部件,布置成围绕所述流体通道。

7. 根据权利要求1所述的细胞活性测定装置,其特征在于,还包括:
距离调节部件,与所述图像传感器相连接并配置为调节所述图像传感器和所述流体通道之间的距离。

8. 一种细胞活性测定装置,其特征在于,包括:
孔板,配置为容纳注入其中的培养液和细胞;
发光元件,设置在所述孔板上方并配置为在所述孔板的方向发光;
图像传感器,设置在所述孔板下方并配置为捕获细胞的阴影图像;以及
分析模块,配置为通过使用从所述图像传感器捕获的所述阴影图像中提取的参数来分析细胞的活性状态,

其中所述阴影图像是亮环和暗环以交替方式出现的圆形图像,并且所述参数包括以下至少一项:SNR(信噪比)值、SD(阴影直径)值、第一亮环的直径、第一暗环的直径、以及所述第一亮环与暗环之间的宽度。

9. 根据权利要求8所述的细胞活性测定装置,其特征在于,所述孔板能够移动,从而使得从所述发光元件发出的光正交辐射的点或所述图像传感器感受传感的点发生改变。

10. 根据权利要求8所述的细胞活性测定装置,其特征在于,还包括:
距离调节部件,与所述图像传感器相连接并配置为调节所述图像传感器和所述孔板之间的距离。

11. 一种细胞活性测定装置, 其特征在于, 包括:

细胞芯片, 提供配置为容纳注入其中的培养液和细胞的细胞存储场所, 所述细胞芯片具有0.1毫米~1.0毫米的较小厚度的底表面;

发光元件, 设置在所述细胞芯片上方并配置为在所述细胞芯片的方向发光;

图像传感器, 设置在所述细胞芯片下方并配置为捕获细胞的阴影图像; 以及

分析模块, 配置为通过使用从所述图像传感器捕获的所述阴影图像中提取的参数来分析细胞的活性状态,

其中所述阴影图像是亮环和暗环以交替方式出现的圆形图像, 并且所述参数包括以下至少一项: SNR(信噪比)值、SD(阴影直径)值、第一亮环的直径、第一暗环的直径、以及所述第一亮环与暗环之间的宽度。

12. 根据权利要求11所述的细胞活性测定装置, 其特征在于, 还包括:

距离调节部件, 与所述图像传感器相连接并配置为调节所述图像传感器和所述细胞芯片之间的距离。

13. 一种细胞活性测定装置, 其特征在于, 包括:

发光元件, 配置为发光;

图像传感器, 设置在所述发光元件下方并配置为容纳设置在其上的细胞存储装置, 其中所述细胞存储装置包括配置为容纳注入其中的细胞和培养液的空间, 并且所述图像传感器配置为捕获细胞的阴影图像; 以及

分析模块, 配置为通过使用从所述图像传感器捕获的所述阴影图像中提取的参数来分析细胞的活性状态,

其中所述阴影图像是亮环和暗环以交替方式出现的圆形图像, 并且所述参数包括以下至少一项: SNR(信噪比)值、SD(阴影直径)值、第一亮环的直径、第一暗环的直径、以及所述第一亮环与暗环之间的宽度。

14. 根据权利要求13所述的细胞活性测定装置, 其特征在于, 还包括:

距离调节部件, 与所述图像传感器相连接并配置为调节所述图像传感器的高度。

15. 根据权利要求13所述的细胞活性测定装置, 其特征在于, 还包括:

针孔, 连接到发光的所述发光元件的下端部。

细胞活性测定装置及细胞活性分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于测量细胞活性的装置和分析细胞活性的方法,更具体地,涉及一种使用细胞的阴影图像以高处理速度并且连续地测定细胞活性的细胞活性测定装置和能够分析所测定的细胞活性的细胞活性分析方法。

背景技术

[0002] 观察细胞的活性或观察这些细胞是活的还是死的是发展现代医学或食品的重要步骤。细胞对特定药物或样品的反应性或观察这些细胞是活的还是死的是研究过程必不可少的。已经开发的用于观察细胞增殖或活性的一些传统技术如下。

[0003] 使用具有良好特性和高敏感性的抗体以及作为信号源的酶的ELISA(酶联免疫反应),是一种使特定状态的细胞选择性地反应并测量吸光度的技术。

[0004] Western blots(Western免疫印迹)是一种通过电泳检测蛋白质的方法。首先,将蛋白质通过聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,然后将电泳分离的位置直接移动到薄膜,以便通过放射免疫分析法来检测某些蛋白质。

[0005] 免疫组织化学法是一种使用标记的抗体来使存在于组织或细胞中的某些抗原可视化的方法,使得它们可以通过光学显微镜或电子显微镜进行观察。

[0006] 为了测定细胞活性并确定细胞是活的还是死的,上述方法需要大型且昂贵的设备或需要对细胞进行染色并通过显微镜进行观察或测量吸光度等,因此需要较高的成本、复杂的系统和大的空间。另外,为了分析,样本不可避免地破坏,因此不可能连续地观察特定细胞。

[0007] 因此,需要研究一种能够快速和广泛使用的用于测定细胞活性的技术,而不需要单独的试剂并且不破坏样本。

发明内容

[0008] 技术问题

[0009] 本发明的一个目的是提供一种基于阴影成像技术的细胞活性测定装置,使用该装置细胞可以被连续观察而不破坏样品并且无需单独的试剂处理。

[0010] 本发明的一个目的是提供一种通过从图像传感器捕获的细胞的阴影图像中提取某些参数对细胞活性进行分析的细胞活性分析方法。

[0011] 技术手段

[0012] 为了达到上述目的,本发明实施例提供一种细胞活性测定装置,包括:流体通道,其中注入了培养液和细胞;发光元件,设置在所述流体通道上方以在所述流体通道的方向发光;以及图像传感器,设置在所述流体通道下方以捕获细胞的阴影图像。

[0013] 为了达到上述目的,本发明实施例提供一种细胞活性测定装置,包括:孔板,其中注入了培养液和细胞;发光元件,设置在所述孔板上方以在所述孔板的方向发光;以及图像传感器,设置在所述孔板下方以捕获细胞的阴影图像。

[0014] 为了达到上述目的,本发明实施例提供一种细胞活性测定装置,包括:细胞芯片,其提供用于注入培养液和细胞的细胞存储场所,并且所述细胞芯片具有0.1毫米~1.0毫米的较小厚度的底表面;发光元件,设置在所述细胞芯片上方以在所述细胞芯片的方向发光;以及图像传感器,设置在所述细胞芯片下方以捕获细胞的阴影图像。

[0015] 为了达到上述目的,本发明实施例提供一种细胞活性测定装置,包括:用于发光的发光元件;以及图像传感器,设置在所述发光元件下方并容纳位于其上的细胞存储装置,其中所述细胞存储装置包括注入了细胞和培养液的空间,并且所述图像传感器用于捕获细胞的阴影图像。

[0016] 为了达到上述目的,本发明实施例提供一种细胞活性分析方法,包括:接收由图像传感器捕获的阴影图像;由所接收的阴影图像计算特定参数;并且通过使用计算出的参数显示细胞的活性状态。

[0017] 技术效果

[0018] 根据本发明实施例的细胞活性测定装置采用了简单经济的设置,同时允许连续观察大量细胞而无需使用单独的试剂。

[0019] 根据本发明实施例,随着计算机软件的开发并辅以简单的图像处理技术,过去仅能由会使用诸如显微镜等各种细胞活性测定装置的有经验的检验员或技术员执行的工作现在可自动化进行,使得测量成本降低且测量误差大大降低。

[0020] 此外,本发明实施例所述的细胞活性分析方法可以使用细胞阴影图像中的像素值,使得可以轻而易举地对细胞活性进行分析而无需诸如酶标仪(ELISA Reader)等昂贵的显微镜或设备。

附图说明

[0021] 图1示出了本发明实施例的细胞活性测定装置。

[0022] 图2示出了由温度调节部件围绕的图1所示的流体通道。

[0023] 图3至图5示出了本发明另一实施例的细胞活性测定装置。

[0024] 图6为本发明实施例的分析模块的框图。

[0025] 图7示出了由图1的细胞活性测定装置捕获的细胞的阴影图像和显微镜捕获的细胞的图像。

[0026] 图8为示出了本发明实施例的细胞活性分析方法的流程图。

[0027] 图9示出了由图1的细胞活性测定装置捕获的细胞的核分裂状态。

[0028] 图10示出了由图1的细胞活性测定装置捕获的阴影图像,其中活细胞和死细胞都存在。

[0029] 图11通过图像处理技术示出了图10所示的阴影图像。

[0030] 图12为配置为描述在本发明实施例的细胞活性分析方法中将细胞数数字化处理的方法的示意图。

[0031] [附图标记]

[0032] 100,300,400,500:细胞活性测定装置

[0033] 110:发光元件

[0034] 120:针孔

- [0035] 130:流体通道
- [0036] 131:流通池
- [0037] 132:壁
- [0038] 133:盖玻片
- [0039] 140:图像传感器
- [0040] 150:距离调节部件
- [0041] 160:分析模块
- [0042] 170:温度调节部件

具体实施方式

[0043] 下面将结合附图对本发明实施例所述的用于测定细胞活性的装置和用于分析细胞活性的方法进行更详细地描述。根据细胞存储装置的形式,本发明实施例所述的细胞活性测定装置可以多种方式进行实施。所述细胞存储装置指细胞被注入和培养或测量的空间的装置。例如,所述细胞存储装置可包括流体通道、孔板、细胞芯片等。

[0044] 在本说明书中,所使用的单数表达形式包含复数表达形式,除非上下文中具有明显不同的含义。在本说明书中,诸如“包括”或“包含”等这些术语不应理解为是指所有组件或操作都必然包括在内。也就是说,一些组件或操作可以不包括在内,而其它附加组件或操作可以进一步包括在内。

[0045] 图1示出了本发明实施例的细胞活性测定装置。这里的细胞活性测定装置100使用流体通道作为细胞存储装置。

[0046] 如图中所示,细胞活性测定装置100可以包括发光元件110、针孔120、流体通道130、图像传感器140、距离调节部件150和分析模块160。

[0047] 发光元件110可以发光,以此来捕获细胞的阴影图像。该发光元件可以设置在流体通道130处,在所述流体通道130中可以注入细胞和培养液(培养基或介质)。发光元件110可以包括RGB发光二极管(LED)用以清晰地捕获阴影图像。

[0048] 针孔120可以连接到发光元件110的下端,以使细胞的阴影图像变得清楚。也就是说,针孔120可用于增强光的相干性和亮度。

[0049] 针孔120可以以塑料材料制成的膜掩模(film mask)的形式制造出来。塑料材料制成的膜掩模针孔可以用高分辨率激光打印机在投影胶片等上打印,并且连接在发光元件110的前面,因此与金属材料的针孔相比,它制造起来更便宜,并可以很容易地制造出来。此外,在诸如RGB发光二极管的多波长光源情况下,其中可以将三种颜色(红色、绿色和蓝色)的各光源集成在一个发光二极管中,三个针孔两两之间可以隔几十微米设置,但通过采用高分辨率激光打印机进行打印的方法,多个针孔可以容易地在计算机上设计。

[0050] 在流体通道130内部,可以准备其中可以注入细胞和培养液并且可以培养细胞的空间。流体通道可以形成为使得所述通道具有几毫米或更小的宽度,从而可以降低注入其中的含有细胞的培养液的体积。其原因是因为高浓度细胞进行活性测定会在阴影图像的分析过程中引起大的噪声。

[0051] 此外,流体通道130的至少部分侧壁可以用聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料来实现。这种实施方式的原因是,细胞培养可能需要供给氧气,而聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料的固有

性质可以使氧渗透。因此,在至少部分侧壁用聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料来实现的情况下,可以不需要单独的氧气供给装置。

[0052] 流体通道130可包括流通池131、壁132以及盖玻片133。

[0053] 流通池131可以位于注入和排出细胞和培养液处,并可以作为流体通道130的盖子(cover)。流通池131可以采用诸如玻璃、塑料、石英等材料来制造。

[0054] 壁132可以由聚二甲基硅氧烷(PDMS)材料制成,并且可以用中空的中空部分制造,从而在上方的流通池131和下方的盖玻片133之间提供一个空间,细胞可以在其中生长,并且不会使培养液泄漏。在用PDMS材料来形成壁132的情况下,PDMS材料的性质可以使氧渗透,这对细胞培养而言是必需的。因此,无需为流体通道130提供单独的供氧设备。壁132的厚度可以制造为大约1毫米,以使细胞活性测定装置100的尺寸更小。

[0055] 盖玻片133可设置在壁132的下端,并可以作为流体通道130的底部。

[0056] 图像传感器140可以在流体通道130的下部捕获细胞的阴影图像。图像传感器140可以使用CMOS(互补式金属氧化物半导体)图像传感器。CMOS图像传感器是一种低功耗的并具有互补式金属氧化物半导体(CMOS)结构的图像捕获元件。图像传感器140可以以不含透镜的形式应用。所述CMOS图像传感器具有快速的处理速度并因为它可以采用半导体工艺通过量产来提供具有较低的成本。此外,相比采用透镜的基于图像传感器的显微镜而言,它具有更广的观测范围,并使分析量化和自动化。

[0057] 距离调节部件150可以与图像传感器140相连接,以调节图像传感器140和流体通道130之间的距离。即,距离调节部件150可起到微调图像传感器140的位置的作用,从而尽可能减少盖玻片133和图像传感器140之间的距离并捕捉到具有高对比度的阴影图像。

[0058] 分析模块160可以用于对图像传感器140通过图像处理技术捕获的阴影图像进行分析。后面将对分析模块160的功能进行更详细地描述。

[0059] 此外,细胞活性测定装置100还可以包括温度调节部件,用于将所培养细胞维持在恒定温度。

[0060] 图2示出了由温度调节部件围绕的图1的流体通道。

[0061] 如图中所示,温度调节部件170可围绕流体通道130作为保温箱,使得可以在恒温(例如37℃)下培养细胞。温度调节部件170可以控制温度,并且可以包括温度传感器171。

[0062] 图像传感器140捕获的细胞的阴影图像可以传输到可以对细胞的活性状态进行分析的分析模块160。

[0063] 图3示出了本发明一实施例的细胞活性测定装置。此处的细胞活性测定装置300使用孔板作为细胞存储装置。

[0064] 如图中所示,细胞活性测定装置300可包括发光元件310、针孔320、孔板330、图像传感器340、距离调节部件350以及分析模块360。

[0065] 图1所示的组件可以类似的方式应用于所述发光元件310、针孔320、图像传感器340、距离调节部件350和分析模块360,因此,此处对这些部件不再进行赘述。

[0066] 孔板330可设置在发光元件310下方,并且可以具有多个形成在其中的孔。孔是指可以注入样品的空间。

[0067] 例如,可以将96孔板或24孔板用于孔板330。96孔板或24孔板是指其中形成有96或24个孔的孔板。

[0068] 为了获得光损失最小化的阴影图像,孔板330可为黑色的孔板,其具有薄的孔底和小的光学干涉。

[0069] 另外,可将孔板330制造成能够移动,从而使得发光元件310辐射到达的点或CMOS图像传感器340感受传感的点发生改变。例如,可将孔板330制造成能够旋转。

[0070] 此外,细胞活性测定装置300还可以包括温度调节部件,用于将所培养的细胞维持在恒温。

[0071] 图4示出了本发明一实施例的细胞活性测定装置。此处的细胞活性测定装置400使用细胞芯片作为细胞存储装置。

[0072] 如图中所示,细胞活性测定装置400可包括发光元件410、针孔420、细胞芯片430、图像传感器440、距离调节部件450以及分析模块460。

[0073] 图1所示的组件可以以类似的方式应用于所述发光元件410、针孔420、图像传感器440、距离调节部件450和分析模块460,因此,此处对这些部件不再进行赘述。

[0074] 细胞芯片430可以是以芯片的形式来实现的细胞存储装置,其中提供有注入细胞和培养液的空间。细胞芯片430可以是生物芯片,可以检测细胞的活性或细胞引起的复杂生理信号,并且可用于对细胞计数的目的。

[0075] 典型的细胞芯片可以采用两块透光的玻璃板、塑料板或聚合物材料板用作上基板和下基板,并与用于存储细胞的中间空间连接或装配在一起,并且在如本发明实施例中所使用的用于细胞阴影成像的细胞芯片430的情况下,所述下基板的厚度可以为约0.1毫米~1.0毫米的较薄厚度。另外,在以集成形式制造并且不与存储细胞的中间空间相连接或装配的细胞芯片情况下,所述下基板的厚度可以是较薄的,为约0.1毫米~1.0毫米。

[0076] 图5示出了本发明一实施例的细胞活性测定装置。

[0077] 如图中所示,细胞活性测定装置500可包括发光元件510、针孔520、图像传感器530、距离调节部件540以及分析模块550。

[0078] 图1所示的组件可以以类似的方式应用于所述发光元件510、针孔520、图像传感器530、距离调节部件540和分析模块550,因此,此处对这些部件不再进行赘述。

[0079] 然而,图像传感器530可以使细胞存储装置稳定放置在其上的方式进行实施。

[0080] 细胞活性测定装置500不含有细胞存储装置作为组件,而是提供了用以容纳细胞存储装置的空间。即,细胞活性测定装置500中可以准备一个可以将细胞存储装置放置或容纳于其中的空间,由此必要时可以更替换各种形式的细胞存储装置,而不必与细胞存储装置形成一固定的组件。例如,当需要孔板作为细胞存储装置时,细胞活性测定装置500可以具有放置在图像传感器530上方的孔板以测定细胞活性,当需要细胞芯片作为细胞存储装置时,细胞活性测定装置500可以具有放置在图像传感器530上方的细胞芯片以测定细胞活性,。

[0081] 此外,细胞活性测定装置500可以使用具体的细胞存储装置,专门用于放置或容纳。例如,细胞活性测定装置500可以被制造为使得仅细胞芯片被放置在其上。

[0082] 上述的细胞活性测定装置100,300,400,500可以包括同一分析模块。

[0083] 图6为图1所示的分析模块的框图。

[0084] 所示分析模块160可以作为细胞活性测定装置100的组件进行实施,但也可以作为独立于细胞活性测定装置100的设备进行实施。

[0085] 分析模块160可以包括接收器部件161、提取器部件162、像素过滤部件163、显示部件164以及控制部件165。

[0086] 接收器部件161可接收来自图像传感器140的阴影图像。在分析模块160独立于细胞活性测定装置100存在的情况下,所述阴影图像的接收可以通过各种通信方法(例如,无线通信)来执行。

[0087] 提取器部件162可以计算特定参数用于从阴影图像分析细胞活性。例如,SNR(信噪比)值、SD(阴影直径)值、最大像素值、最大像素值的位置、最小像素值、最小像素值的位置、第一亮环的直径、第一暗环的直径、亮环与暗环之间的宽度、所述阴影图像的面积和所述阴影图像的圆度等等,都可以是用于细胞活性分析的参数。

[0088] SNR(信噪比)指的是指定的含细胞的像素最大强度值与不含细胞的背景平均强度值之差除以背景的标准偏差值后所取的对数值。

[0089] SNR可以表示为公式1。

[0090] [公式1]

[0091] $SNR = 20 \log |(\max(I) - \mu_b) / \sigma_b| \text{ (dB)}$

[0092] 这里, μ_b 和 σ_b 分别指阴影图像的平均背景值和标准偏差值。最大值 $\max(I)$ 为像素最大强度值。

[0093] 另外,SD(阴影直径)为将从指定的含细胞的像素强度值中提取出的细胞阴影图像的直径表示为均方根的值。SD可以表示为公式2。

[0094] [公式2]

[0095] $SD = 2 \sqrt{\sum_{x=1}^n (x - \bar{x})^2 |f(x)|^2 / \sum_{x=1}^n |f(x)|^2} \text{ (像素)}$

[0096] 这里, n , x 和 $f(x)$ 分别指细胞阴影区域中像素的最大数、特定像素和特定像素的强度值。

[0097] 细胞的阴影图像可以是亮环和暗环以交替方式出现的圆形图像。在这种情况下,中央的第一亮环可以称为第一亮环,中央的第一暗环可以称为第一暗环。

[0098] 此外,阴影图像的圆度(circularity)可以是所述阴影图像近似于圆形的量度。

[0099] 像素过滤部件163可以通过使用特定参数、与特定形状的相似度等来从阴影图像中指定特定像素。这将在后面进行更详细的描述。

[0100] 显示部件164可以通过使用在提取器部件162提取的项目来显示细胞的活性状态,用于对细胞活性进行分析。

[0101] 控制部件165可以对接收器部件161、提取器部件162、像素过滤部件163和显示部件164执行的整体功能进行控制。

[0102] 下面结合试验例对细胞活性的分析方法进行描述。

[0103] 在本试验例中,使用了人类肺泡上皮细胞(A549),其为人类肺的上皮细胞。初始浓度为250,000个细胞/毫升。在流体通道130中培养的细胞的需氧量为 $5.795 \times 10^{-7} \text{ mol/天}$,但是,在由PDMS材料制成的壁132处氧渗透量为 $1.771 \times 10^{-6} \text{ mol/天}$,因此不需要单独供给氧气。不需要单独供给 CO_2 的不依赖 CO_2 的介质(18045, GIBCO)用作进行细胞培养所注入的培养液。通过使用单独的注射泵(M200, KD Scientific)将培养液以5~10微升/分钟的速率注入到流体通道130中。在本试验例中,将RGB发光二极管用作发光元件110,将CMOS图像传感器

用作图像传感器140。

[0104] 图7示出了由图1的细胞活性测定装置捕获的细胞的阴影图像和显微镜捕获的细胞的图像。

[0105] 通过使用细胞活性测定装置100,即使不用显微镜也可以容易地观察到细胞核分裂。通过细胞活性测定装置100和普通的光学显微镜同时观察感兴趣的细胞48小时,比较结果表明,如图7(a)所示,通过显微镜(左边的照片)观察到的细胞核分裂也能够在细胞的阴影图像中观察到。通过将图像处理技术应用到阴影图像中的这些变化中,像素值可以表示为3维(图7(b))和2维(图7(c))图,从中可以看出,在发生细胞核分裂的4小时和10小时之间阴影图案出现快速变化。

[0106] 图8为示出了本发明实施例的细胞活性分析方法的流程图。

[0107] 接收器部件161可以接收图像传感器140捕获的细胞的阴影图像(S810)。

[0108] 提取器部件162可以计算接收到的细胞阴影图像中的特定参数(S820)。在该试验例中,将SNR值和SD值从参数中提取出。

[0109] 然后,像素过滤部件163可以通过使用与特定形状的相似程度从阴影图像中指定特定像素(步骤S830)。

[0110] 例如,像素过滤部件163可以从形成细胞阴影图案的像素中仅选择并指定对应特定范围圆度的像素。

[0111] 显示部件164可以绘制并显示所提取的SNR值和SD值的时间推移图(S840)。

[0112] 图9示出了从上述试验例中所使用的细胞的阴影图像中提取的SNR值和SD值的时间推移图。

[0113] 如图所示,图9示出了追踪两个项目(SNR和SD)48小时的结果。

[0114] 图9(a)表示SNR的变化,图9(b)表示SD的变化,并且在两个结果中,在细胞发生核分裂的试验开始后的4小时和10小时之间,出现急剧变化。

[0115] 图10示出了由图1的细胞活性测定装置捕获的阴影图像,其中活细胞和死细胞都存在。

[0116] 为了细胞活性的比较测定,将细胞在细胞活性测定装置100中多培养一段时间,之后,向一些细胞集落(cell colonies)施加热量使它们死亡。如图10(a)所示,进行试验,使得由图像传感器140捕获了一张包括数以千计的正常细胞集落(左)和死细胞集落(右)的阴影图像。因此,如图10(b)和图10(c)所示,在显微镜下可以清楚地区分活细胞和死细胞。

[0117] 从图10中可以看出,相比显微镜而言,细胞活性测定装置100可以在更大程度上观察到细胞活性。

[0118] 图11通过图像处理技术示出了图10的阴影图像。

[0119] 为了使用阴影图像对活细胞集落和死细胞集落进行量化,图11采用上述的SNR和SD值,并显示了活细胞集落和死细胞集落中这些值的变化。

[0120] 如图11(a)和图11(b)中所示,相比于细胞核分裂过程中所观察到的,可以在活细胞和死细胞之间观察到SNR和SD更大幅度的变化。图11(c)示出了特定细胞的阴影图案在60小时时间段内的变化。

[0121] 图12为用于描述在本发明实施例的细胞活性分析方法中将细胞数数字化的方法的示意图。

[0122] 通过观察阴影图案中SNR和SD值的变化,能够建立用于确定细胞是活的还是死的量化标准。图9示出了根据SNR和SD变化对活细胞和死细胞进行量化的例子,并用来对活细胞的数量进行统计。另外,本发明实施例可以包括使用细胞阴影图像的像素与特定形状之间的相似度来选择特定像素的操作。从形成细胞阴影图案的像素中,可以选择并指定出对应特定圆度范围的像素。以这种方式,可以有效地识别并去除与接近圆形的细胞阴影图案形状不同的呈线性形状的灰尘颗粒等。可以通过将阴影图案的较小的横向长度和纵向长度除以较大的横向长度和纵向长度计算出像素的圆度量度。形状为正圆的阴影图像,其圆度值将为1,而较低圆度的值可以在0和1之间。

[0123] 图12(a)示出了通过使用从细胞阴影图像中提取的SNR值针对细胞是活的还是死的进行初级评估的例子(图11(a)中虚线以上区域代表活细胞),并采用图像处理技术来表示红色像素。在所述初级评估中,在整个阴影图像中,具有特定SNR值(约18 dB)或更高的像素被选择并指定为红色。

[0124] 图12(b)为以数字放大形式示出了图12(a)的特定部分的图像。当通过使用SD值针对细胞是活的还是死的进行次级评估时(图11(b)中虚线以下区域代表活细胞),如图12(c)中所示,仅以剪影形式示出了正常细胞。

[0125] 在次级评估中,从初级评估所选择的红色像素群中选择性地指定SD小于或等于特定值(大约24微米)并且同时像素的圆度值为0.3~1.0之间的像素群。

[0126] 接着,仅对初级和次级评估后被认为是活着的细胞的阴影图像进行计数,用数值表示这些细胞的活性。

[0127] 图12(d)示出了对使用SNR和SD完成两步评估的细胞的剪影图像通过图像处理技术进行数字化处理。这样,可以最终对细胞活性进行量化。图12(d)示出了在T=36 hr停止供给培养液后对剩余的活细胞进行计数的结果,以便清楚地呈现细胞活性的量化过程。

[0128] 也可以从上述试验例看出,本发明实施例所述的细胞活性测定装置100可以连续地观察大量细胞,而不需要单独的试剂。细胞活性测定装置100使得区分细胞中的核分裂或区分活细胞和死细胞成为可能,这在过去仅可以通过昂贵的显微镜,使用单独的染色试剂观察到。

[0129] 特别是,本发明实施例所述的细胞活性测定装置使得进行细胞毒性试验成为可能,这对开发新药物而言是重要的,或以低成本迅速的对环境和食品相关的微生物活性进行测定和评估。

[0130] 此外,随着计算机软件的开发并辅以简单的图像处理技术,过去仅能由会使用诸如显微镜等各种细胞活性测定装置的有经验的检验员或技术员执行的工作可自动化进行,带来了测量成本降低以及测量误差的大大降低。

[0131] 上述细胞活性分析方法可以程序指令的形式来实施,所述程序指令可以采用各种计算机装置来执行,并可以记录在计算机可读取介质中。这种计算机可读取介质可以包括单独的程序指令、数据文件、数据结构等,或其组合。记录在介质上的程序指令可以被设计和配置成具体用于本发明,或者可以是计算机软件领域中技术人员已知并使用的介质类型。

[0132] 计算机可读取介质的例子可以包括:诸如硬盘、软盘、磁带等磁性介质;诸如CD-ROM、DVD等光学介质;诸如光磁软盘等磁光介质;以及诸如ROM、RAM、闪存等硬件设备。

[0133] 计算机可读取介质的例子还可以包括传输特定程序指令、数据结构的信号的传输介质,例如光、金属线、导波管等。

[0134] 程序指令的例子不仅可以包括编译器产生的机器语言代码,而且包括可以由计算机通过使用解释器等执行的高级语言代码。可以使上述硬件作为一个或多个软件模块运行,这些模块执行本发明实施例的操作,反之亦然。

[0135] 不限于将上述细胞活性测定装置和细胞活性分析方法应用到上述实施例的组合物和方法。更确切地说,可以选择性地组合各个实施例中的部分或全部以形成多种变化。

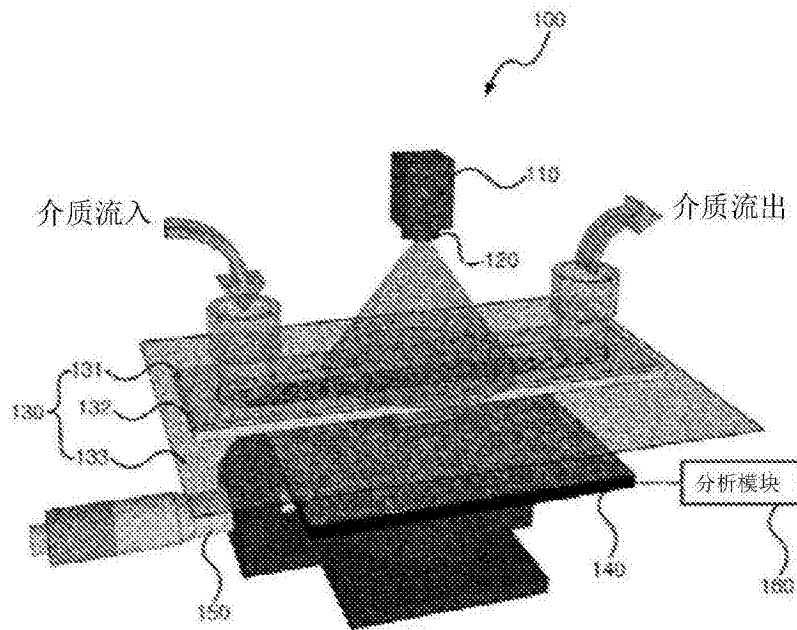


图1

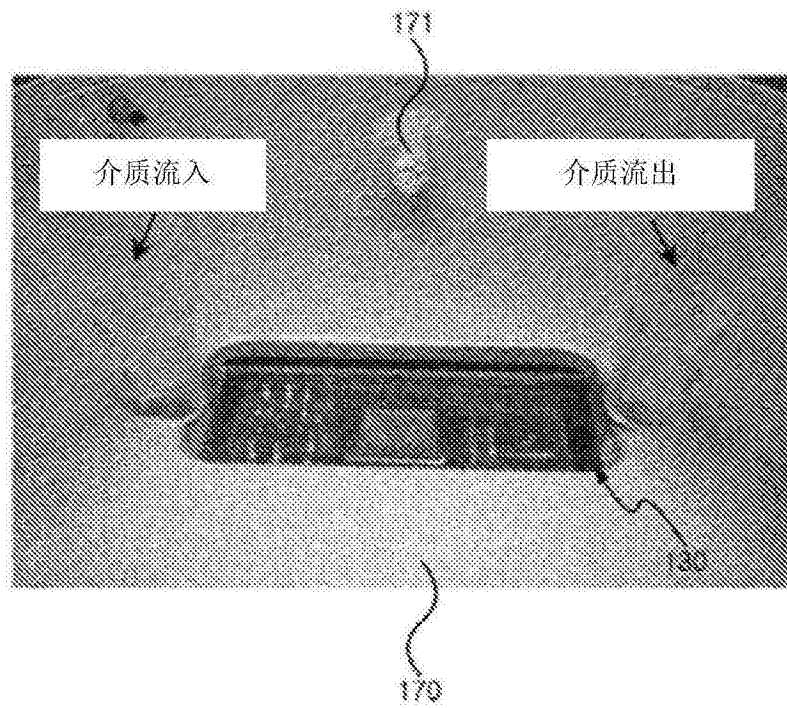


图2

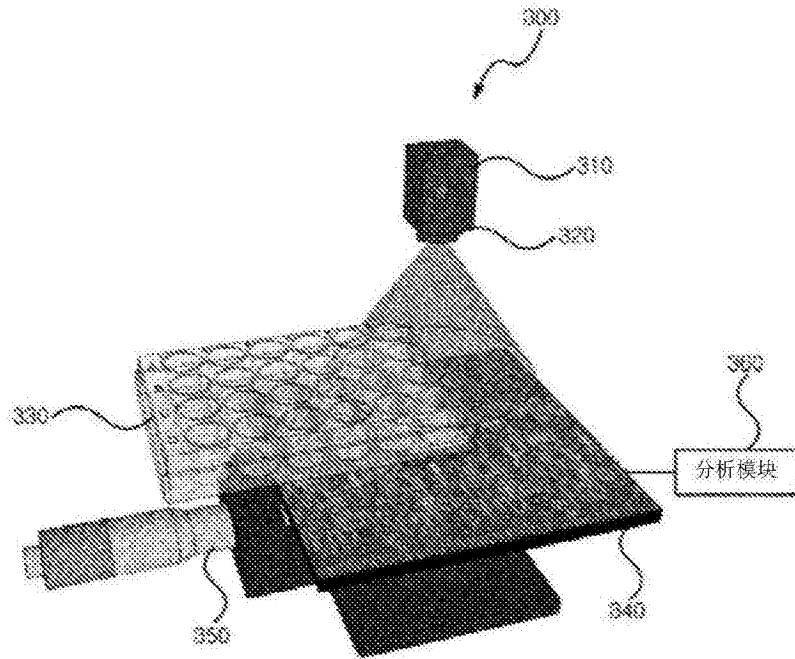


图3

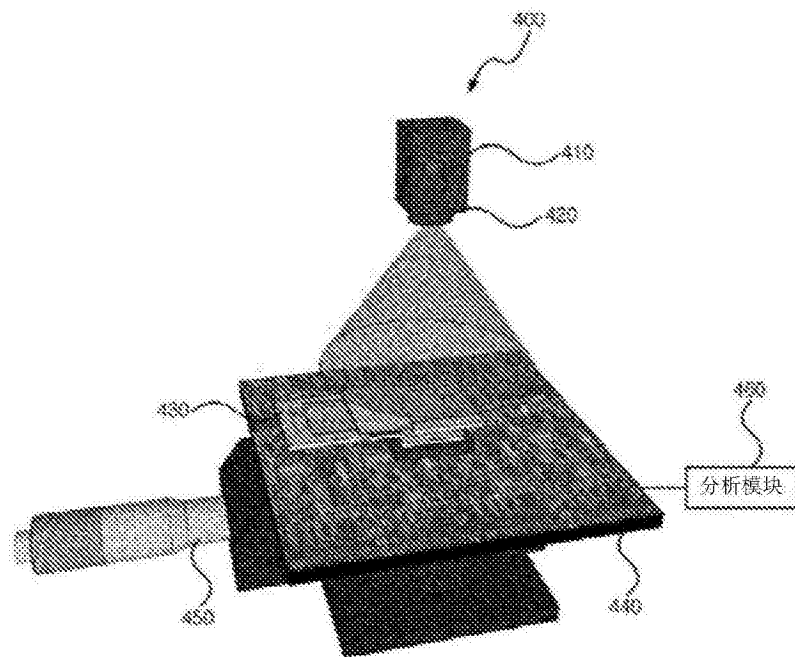


图4

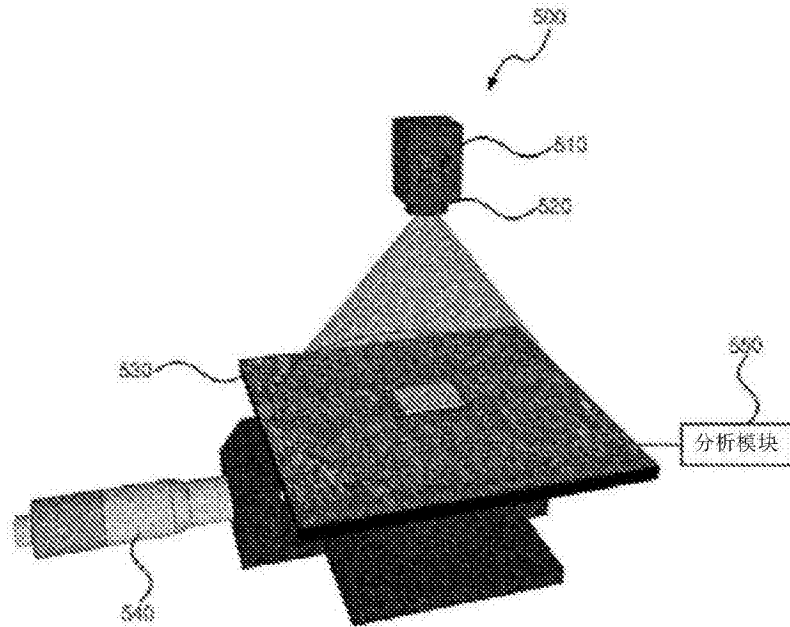


图5

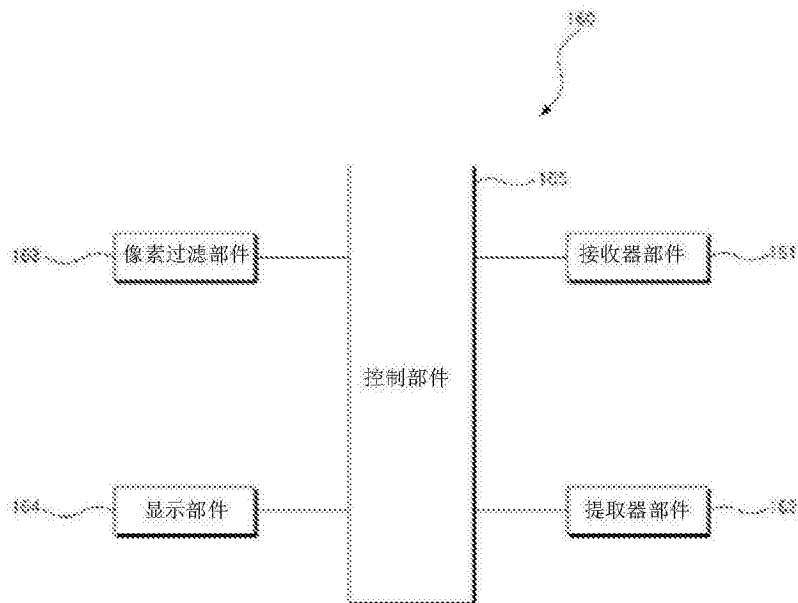


图6

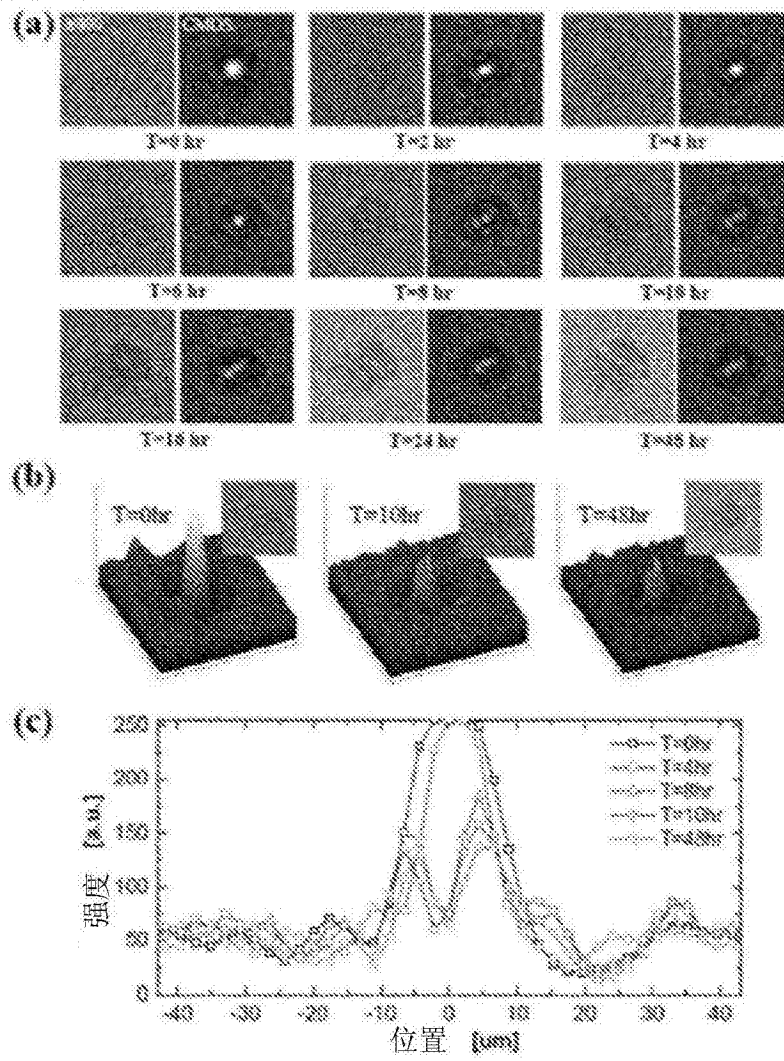


图7

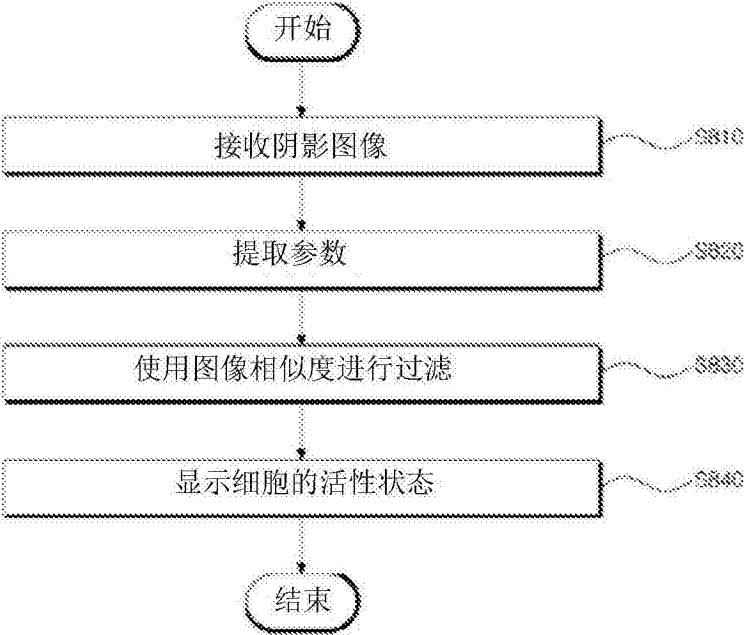


图8

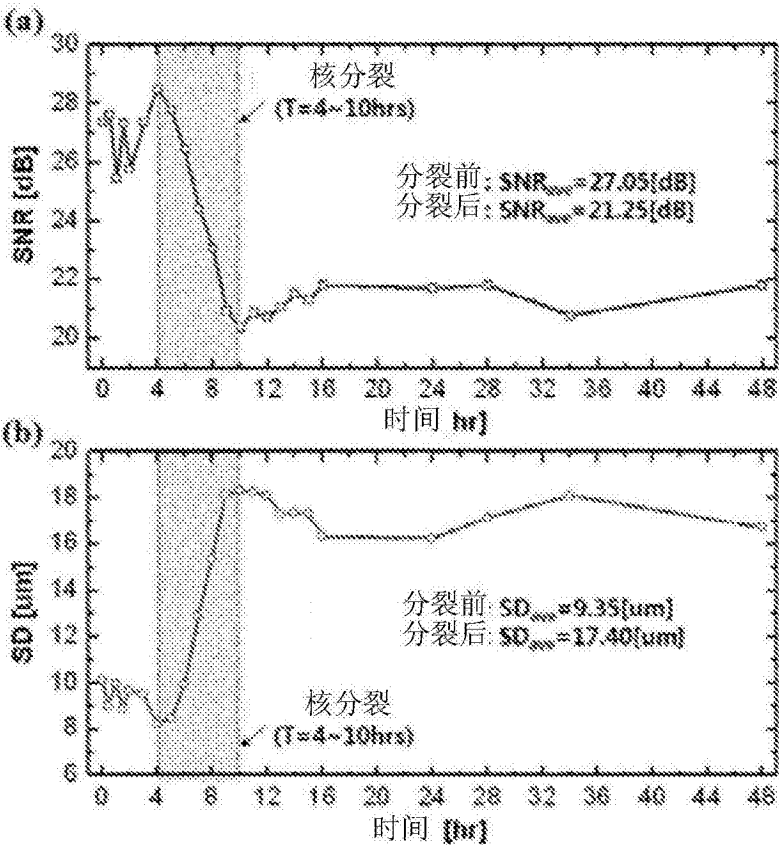


图9

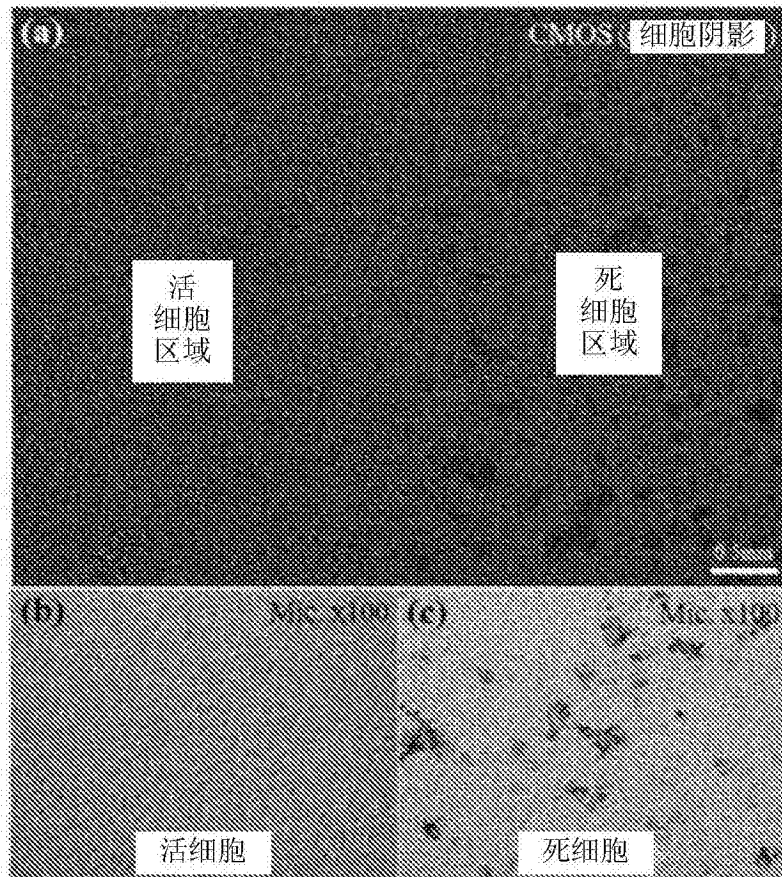


图10

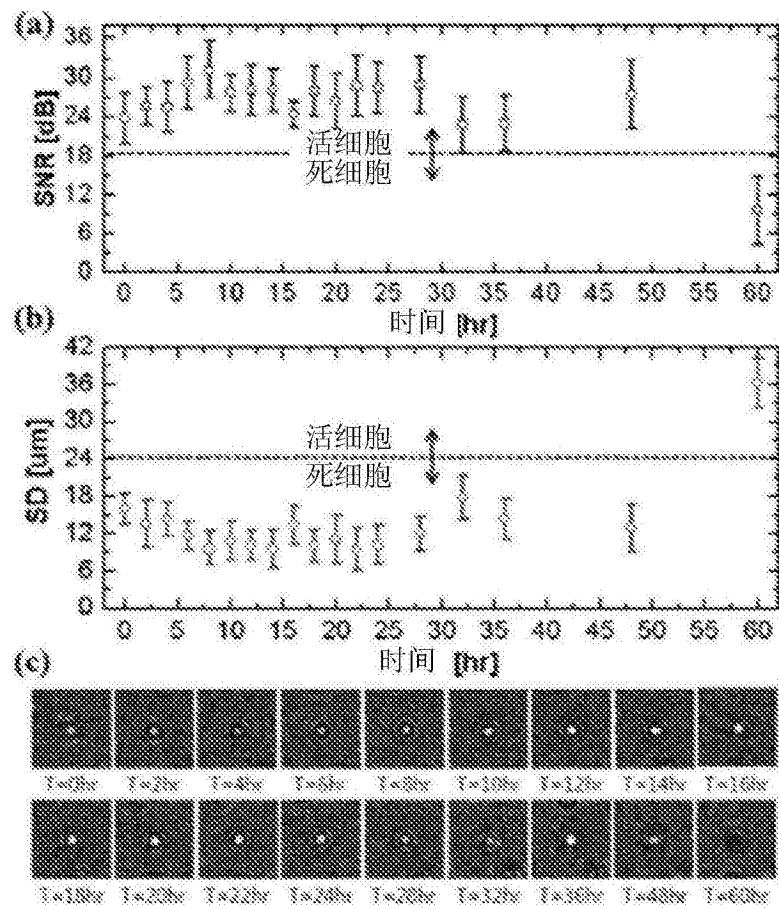


图11

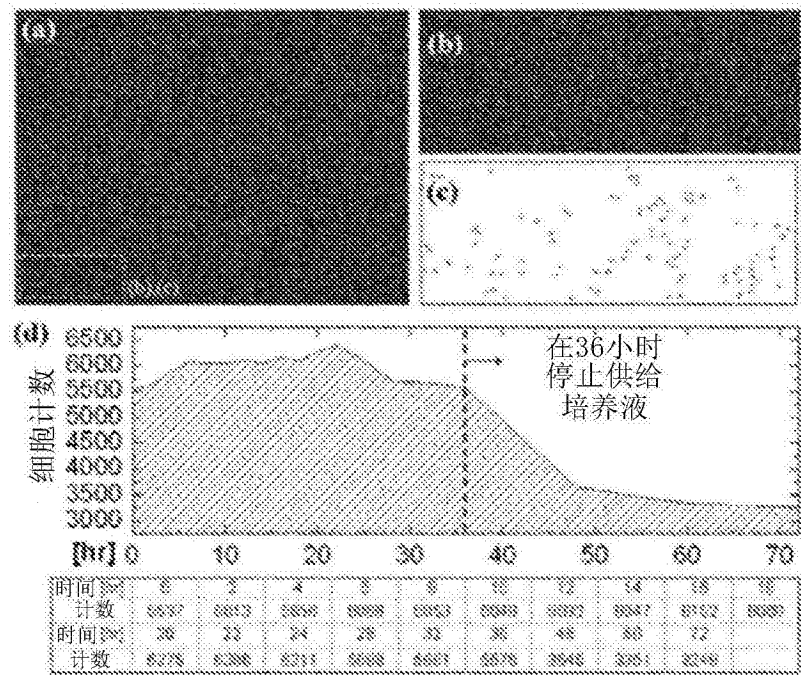


图12