



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 111295712 B

(45) 授权公告日 2024. 02. 13

(21) 申请号 201880071370.0

(22) 申请日 2018.10.30

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111295712 A

(43) 申请公布日 2020.06.16

(30) 优先权数据
62/584,388 2017.11.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.04.30

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2018/058237 2018.10.30

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/094230 EN 2019.05.16

(73) 专利权人 赛多利斯生物分析仪器有限公司
地址 美国纽约州

(72) 发明人 D·阿普多恩 E·恩德斯利
N·霍尔茨 B·尼格尔 D·洛克
K·施罗德

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所
11410

专利代理师 钟锦舜 王奕勋

(51) Int.Cl.
G16B 10/00 (2006.01)
G16B 25/00 (2006.01)
G16B 40/00 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2012015389 A1, 2012.01.19
WO 2016210311 A1, 2016.12.29
CN 107209041 A, 2017.09.26
US 2017002056 A1, 2017.01.05
CN 101587517 A, 2009.11.25
CN 101982775 A, 2011.03.02
CN 104568857 A, 2015.04.29
CN 101415829 A, 2009.04.22
WO 2006069142 A2, 2006.06.29
US 2015330892 A1, 2015.11.19 (续)

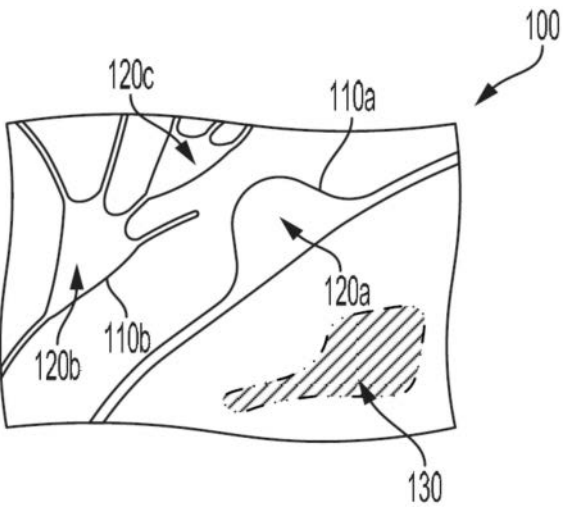
审查员 葛晓倩

权利要求书5页 说明书15页 附图31页

(54) 发明名称
活细胞可视化和分析

(57) 摘要

提供用于在培养箱中自动化成像和分析细胞样品的系统和方法。操作致动显微镜以在数天、数周或数月的时间内在样品容器的孔内生成样品图像。对于特定孔的每次扫描生成多个图像,并且将这种扫描内的所述图像用于对所述孔中的代谢活性细胞进行成像和分析。此分析包括在整个所述扫描中通过从最大强度值中减去每个像素的最小强度值来生成“范围图像”。因此,此范围图像突出在扫描期间展现活性变化的细胞或细胞部分(例如神经元、肌细胞、心肌细胞),而不突出成像时始终展示高强度的区域(例如,展现大量与细胞活性不相关的自发荧光的区域)。



CN 111295712 B

[接上页]

(56) 对比文件

何银锋等.活性氧在铁过载影响成骨细胞生

物活性中的作用.《中国骨质疏松杂志》.2013,第19卷(第06期),541-546.

1. 一种分析细胞样品的方法,其包括:

采集细胞培养皿的影片;

从所述影片生成静态范围图像,其中所述范围图像由表示在完整扫描周期内从所述影片的图像帧内的每个像素位置处的最大荧光强度减去的最小荧光强度的像素构成;以及通过分割所述范围图像定义对象。

2. 根据权利要求1所述的方法,还包括以下中的一项或多项:

从所述对象得出所述完整扫描周期的平均对象平均强度,

从所述对象得出所述完整扫描周期内所有对象迹线的成对相关性分析,

从所述对象得出所述完整扫描周期的所有对象平均脉冲串持续时间的平均值,

从所述对象得出所述完整扫描周期的所有对象的每个脉冲串的烈度,和

从所述完整扫描周期得出整体脉冲串烈度量作为所有对象平均脉冲串烈度的平均值。

3. 一种标识一个或多个时间周期内的生物活性细胞的方法,对于所述一个或多个时间周期中的每个时间周期,所述方法包括:

a. 生成容纳在样品容器中的样品的多个荧光活性图像,其中所述样品包括生物活性细胞,且其中所述多个荧光活性图像中的每个图像都包含各自的多个像素值,每个像素值对应于图像帧内各自的像素位置;

b. 从所述多个荧光活性图像生成荧光范围图像,其中从多个荧光活性图像生成荧光范围图像包含测定所述荧光范围图像的多个像素值,且其中测定所述荧光范围图像的给定像素值包含从所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像测定具有像素位置的像素值的集合的范围,所述像素位置对应于所述图像帧内所述给定像素值的像素位置;

c. 基于所述荧光范围图像,测定对应时间周期内所述样品容器内一个或多个活性对象相对于所述图像帧的位置,其中所述一个或多个活性对象中的每个活性对象都是所述对应时间周期内所述样品内存在的至少一个各自的生物活性细胞的一部分;和

d. 对于所述对应时间周期内所述样品容器内所述一个或多个活性对象的每个活性对象,测定所述一个或多个活性对象中的每个活性对象在整个所述对应时间周期内各自的时变活性水平,其中基于所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像的像素值的集合测定每个时变活性水平,所述像素值的集合具有接近对应的活性对象的所测定的位置的像素位置。

4. 根据权利要求3所述的方法,其中所述样品容器位于培养箱内。

5. 根据权利要求3所述的方法,其中在特定时间周期内测定特定活性对象的时变活性水平包含:

基于所述特定时间周期内生成的所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像的像素值的集合测定未校正的时变活性水平,所述像素值的集合具有接近所述特定活性对象的所测定的位置的像素位置;

基于所述未校正的时变活性水平,测定所述特定活性对象在整个所述特定时间周期内的光漂白的时变水平;和

通过从所述未校正的时变活性水平中除去光漂白的所述时变水平来测定所述特定时间周期内所述特定活性对象的所述时变活性水平。

6. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期的第一时间周期和所述一个或多个时间周期的最后时间周期在时间上分隔超过二十四小时。

7. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期的第一时间周期和所述一个或多个时间周期的最后时间周期在时间上分隔超过三天。

8. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期的第一时间周期和所述一个或多个时间周期的最后时间周期在时间上分隔超过三十天。

9. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期按照指定比例在时间上有规律地间隔开。

10. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述指定比例大于每天一次。

11. 根据权利要求9所述的方法, 其中所述指定比例大于每天两次。

12. 根据权利要求3所述的方法, 其中在二十四小时周期内至少出现两个所述一个或多个时间周期。

13. 根据权利要求3所述的方法, 其中在二十四小时周期内至少出现三个所述一个或多个时间周期。

14. 根据权利要求3所述的方法, 其中位于所述一个或多个时间周期的第一时间周期内的活性对象和位于所述一个或多个时间周期的不同时间周期内的活性对象是所述样品内相同生物活性细胞的部分。

15. 根据权利要求3所述的方法, 其还包含:

基于在所述一个或多个时间周期的特定时间周期内所述样品容器内的所述一个或多个活性对象所测定的所述时变活性水平, 测定所述特定时间周期内所述样品容器内的每对活性对象之间的协调模式或程度中的至少一个; 和

显示所述特定时间周期内所述样品容器内的所测定的每对活性对象之间的协调模式或程度中的至少一个。

16. 根据权利要求3所述的方法, 其中所述生物活性细胞包括以下各者中的至少一个: 神经元、平滑肌细胞、横纹肌细胞、心肌细胞或分泌细胞。

17. 根据权利要求3所述的方法, 其还包含:

基于在所述一个或多个时间周期的特定时间周期内所述样品容器内的所述一个或多个活性对象所测定的所述时变活性水平选择活性对象的子集, 其中从所述特定时间周期内的所述样品容器内的所述一个或多个活性对象中选择特定活性对象包含: 测定所述特定活性对象所测定的所述时变活性水平展现至少一个脉冲串。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其还包含:

基于为所选择的活性对象的子集测定的所述时变活性水平测定所选择的活性对象的子集内的每对活性对象之间的协调模式或程度中的至少一个; 和

显示所选择的活性对象的子集内的所测定的每对活性对象之间的协调模式或程度中的至少一个。

19. 根据权利要求3所述的方法, 其中测定所述样品容器内的所述一个或多个活性对象相对于所述图像帧的位置包含测定所述像素位置的一个或多个集合, 每个集合对应于在所述一个或多个活性对象的各自的活性对象的所述图像帧内的范围。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中测定所述一个或多个时间周期的特定时间周期

内的特定活性对象的时变活性水平包含测定整个所述特定时间周期内的像素值的总计活性水平,所述像素值对应于所测定的像素位置的集合,所述像素位置对应于所述特定活性对象。

21. 根据权利要求3所述的方法,其中生成所述一个或多个时间周期的特定时间周期内的多个荧光图像包含操作显微镜来生成所述多个荧光活性图像,且其中所述方法还包含:

在生成所述特定时间周期内的所述多个荧光图像之前,操作被致动的台架以相对于所述样品容器放置所述显微镜,从而所述显微镜可以生成所述特定时间周期内的所述样品的所述多个荧光活性图像。

22. 根据权利要求3所述的方法,其还包含:

测定在特定多个荧光活性图像的所述荧光活性图像中的每个荧光活性图像中表示的所述样品的各自的光漂白程度,所述光漂白程度对应于所述一个或多个时间周期的特定时间周期;和

在生成所述特定时间周期内的所述荧光范围图像之前,根据各自的所测定的光漂白程度校正所述特定多个荧光活性图像的所述荧光活性图像的每个荧光活性图像。

23. 根据权利要求3所述的方法,其中所述生物活性细胞包括具有荧光特性的荧光团,所述荧光特性与所述生物活性细胞的活性水平有关,且其中生成所述样品的给定荧光活性图像包含:以所述荧光团的激发波长照射所述样品,并以所述荧光团的激发波长使从所述样品响应性地发出的光成像。

24. 根据权利要求23所述的方法,其中所述荧光团包含钙敏感荧光团。

25. 根据权利要求3所述的方法,其还包含:基于各自的所测定的时变活性水平,测定所述一个或多个时间周期中的至少一个时间周期内的所述对象中的一个或多个对象的各自的平均强度水平。

26. 根据权利要求3所述的方法,其还包含:基于各自的所测定的时变活性水平,测定所述一个或多个时间周期中的至少一个时间周期内的所述对象中的一个或多个对象的各自的脉冲串比率。

27. 一种标识一个或多个时间周期内的生物活性细胞的方法,对于所述一个或多个时间周期中的每个时间周期,所述方法包括:

a. 生成容纳在样品容器中的样品的多个荧光活性图像,其中所述样品包括生物活性细胞,且其中所述多个荧光活性图像中的每个图像都包含各自的多个像素值,每个像素值对应于图像帧内各自的像素位置;

b. 测定对应时间周期内所述样品容器内一个或多个活性对象相对于所述图像帧的位置,其中所述一个或多个活性对象中的每个活性对象都是所述对应时间周期内所述样品内存在的至少一个各自的生物活性细胞的一部分;

c. 对于所述对应时间周期内所述样品容器内所述一个或多个活性对象的每个活性对象,基于各自的像素值的集合从所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像测定在整个所述对应时间周期内各自的时变活性水平,所述像素值的集合具有接近所述一个或多个活性对象的所述各自的所测定的位置的像素位置;和

d. 基于所述一个或多个活性对象所测定的所述时变活性水平,从所述一个或多个活性对象中选择活性对象的子集,其中从所述一个或多个活性对象中选择特定活性对象包含测

定所述特定活性对象所测定的所述时变活性水平展现至少一个脉冲串。

28. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述样品容器位于培养箱内。

29. 根据权利要求27所述的方法, 其中测定特定时间周期内的特定活性对象的时变活性水平包含:

基于所述特定时间周期内生成的所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像的像素值的集合测定未校正的时变活性水平, 所述像素值的集合具有接近所述特定活性对象的所测定的位置的像素位置;

基于所述未校正的时变活性水平, 测定所述特定活性对象在整个所述特定时间周期内的光漂白的时变水平; 和

通过从所述未校正的时变活性水平中除去光漂白的所述时变水平来测定所述特定时间周期内所述特定活性对象的所述时变活性水平。

30. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期的第一时间周期和所述一个或多个时间周期的最后时间周期在时间上分隔超过二十四小时。

31. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期的第一时间周期和所述一个或多个时间周期的最后时间周期在时间上分隔超过三天。

32. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期的第一时间周期和所述一个或多个时间周期的最后时间周期在时间上分隔超过三十天。

33. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述一个或多个时间周期按照指定比例在时间上有规律地间隔开。

34. 根据权利要求33所述的方法, 其中所述指定比例大于每天一次。

35. 根据权利要求33所述的方法, 其中所述指定比例大于每天两次。

36. 根据权利要求27所述的方法, 其中在二十四小时周期内至少出现两个所述一个或多个时间周期。

37. 根据权利要求27所述的方法, 其中在二十四小时周期内至少出现三个所述一个或多个时间周期。

38. 根据权利要求27所述的方法, 其中位于所述一个或多个时间周期的第一时间周期内的活性对象和位于所述一个或多个时间周期的不同时间周期内的活性对象是所述样品内相同生物活性细胞的部分。

39. 根据权利要求27所述的方法, 其还包含:

基于在所述一个或多个时间周期的特定时间周期内所述样品容器内的所述一个或多个活性对象所测定的所述时变活性水平, 测定所述特定时间周期内所述样品容器内的每对活性对象之间的协调模式或程度中的至少一个; 和

显示所述特定时间周期内所述样品容器内的所测定的每对活性对象之间的协调模式或程度中的至少一个。

40. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述生物活性细胞包括以下各者中的至少一个: 神经元、平滑肌细胞、横纹肌细胞、心肌细胞或分泌细胞。

41. 根据权利要求27所述的方法, 其中测定所述样品容器内的所述一个或多个活性对象相对于所述图像帧的位置包含测定所述像素位置的一个或多个集合, 每个集合对应于在所述一个或多个活性对象的各自的活性对象的所述图像帧内的范围。

42. 根据权利要求41所述的方法, 其中测定所述一个或多个时间周期的特定时间周期内的特定活性对象的时变活性水平包含测定整个所述特定时间周期内的像素值的总计活性水平, 所述像素值对应于所测定的像素位置的集合, 所述像素位置对应于所述特定活性对象。

43. 根据权利要求27所述的方法, 其中生成所述一个或多个时间周期的特定时间周期内的多个荧光图像包含操作显微镜来生成所述多个荧光活性图像, 且其中所述方法还包含:

在生成所述特定时间周期内的所述多个荧光图像之前, 操作被致动的台架以相对于所述样品容器放置所述显微镜, 从而所述显微镜可以生成所述特定时间周期内的所述样品的所述多个荧光活性图像。

44. 根据权利要求27所述的方法, 其还包含:

测定在特定多个荧光活性图像的所述荧光活性图像中的每个荧光活性图像中表示的所述样品的各自的光漂白程度, 所述光漂白程度对应于所述一个或多个时间周期的特定时间周期; 和

在生成所述特定时间周期内的所述荧光范围图像之前, 根据各自的所测定的光漂白程度校正所述特定多个荧光活性图像的所述荧光活性图像的每个荧光活性图像。

45. 根据权利要求27所述的方法, 其中所述生物活性细胞包括具有荧光特性的荧光团, 所述荧光特性与所述生物活性细胞的活性水平有关, 且其中生成所述样品的给定荧光活性图像包含: 以所述荧光团的激发波长照射所述样品, 并以所述荧光团的激发波长使从所述样品响应性地发出的光成像。

46. 根据权利要求45所述的方法, 其中所述荧光团包含钙敏感荧光团。

47. 根据权利要求27所述的方法, 其还包含: 基于各自的所测定的时变活性水平, 测定所述一个或多个时间周期中的至少一个时间周期内的所述对象中的一个或多个对象的各自的平均强度水平。

48. 根据权利要求27所述的方法, 其还包含: 基于各自的所测定的时变活性水平, 测定所述一个或多个时间周期中的至少一个时间周期内的所述对象中的一个或多个对象的各自的脉冲串比率。

49. 一种非暂时性计算机可读介质, 其被配置成存储至少计算机可读指令, 所述计算机可读指令在由计算设备的一个或多个处理器执行时, 使所述计算设备执行计算机操作进行根据权利要求1至48中任一项所述的方法。

50. 一种系统, 其包含:

一个或多个处理器; 和

非暂时性计算机可读介质, 其被配置成存储至少计算机可读指令, 所述计算机可读指令在由所述一个或多个处理器执行时使所述系统执行根据权利要求1至48中任一项所述的方法。

活细胞可视化和分析

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年11月10日提交的美国临时专利申请第62/584,388号的优先权,其通过引用并入本文中。

背景技术

[0003] 细胞(例如,培养细胞、移植组织样品)可以在多种培养基中温育,并暴露于多种条件(例如,温度、溶解气体水平、辐射、湿度、添加的物质、电场或磁场、病毒、微生物)以评估细胞对所应用的条件的反应。可以测量细胞对所应用的条件的反应以评估药物或治疗的功效,评估物质(例如,实验药物或治疗)的毒性,研究细胞遗传修饰的作用,研究由其形成的细胞和/或组织的代谢组学、结构或其它特性,或测定其它信息。此评估可以包括从培养箱中取出样品并对样品成像(例如,使用荧光显微镜或其它成像装置)。此成像可以包括添加可能导致样品破坏的造影剂或化学试剂。但是,此方法会干扰正在成像的样品,因此需要在各自的不同的持续时间内温育多个样品集合以评估随时间推移样品群体的反应。

发明内容

[0004] 本公开的一方面涉及一种方法,其包括:(i)采集细胞培养皿的影片;和(ii)从所述影片产生静态范围图像,其中所述范围图像由表示在完整扫描周期内从每个像素位置处的最大荧光强度减去的最小荧光强度的像素构成。

[0005] 本公开的另一方面涉及一种标识一个或多个时间周期内的生物活性细胞的方法。所述方法包括,对于所述一个或多个时间周期内的每个时间周期:(i)生成容纳在样品容器中的样品的多个荧光活性图像,其中所述样品包括生物活性细胞,且其中所述多个荧光活性图像中的每个图像都包括各自的多个像素值,每个像素值对应于图像帧内各自的像素位置;(ii)通过测定所述荧光范围图像的多个像素值从所述多个荧光活性图像生成荧光范围图像,其中测定所述荧光范围图像的给定像素值包含从所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像测定具有像素位置的像素值的集合的范围,所述像素位置对应于所述图像帧内所述给定像素值的像素位置;(iii)基于所述荧光范围图像,测定对应时间周期内所述样品容器内一个或多个活性对象相对于所述图像帧的位置,其中所述一个或多个活性对象中的每个活性对象都是所述对应时间周期内所述样品内存在的至少一个各自的生物活性细胞的一部分;和(iv)对于所述对应时间周期内所述样品容器内所述一个或多个活性对象的每个活性对象,测定所述一个或多个活性对象中的每个活性对象在整个所述对应时间周期内各自的时变活性水平。测定所述一个或多个活性对象中的每个活性对象在整个所述对应时间周期内各自的时变活性水平可以包括基于所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像的像素值的集合测定每个时变活性水平,所述像素值的集合具有接近对应的活性对象的所测定的位置的像素位置。

[0006] 本公开的又另一方面涉及在一个或多个时间周期内标识生物活性细胞的方法。所述方法包括,对于所述一个或多个时间周期内的每个时间周期:(i)生成容纳在样品容器中

的样品的多个荧光活性图像,其中所述样品包括生物活性细胞,且其中所述多个荧光活性图像中的每个图像都包括各自的多个像素值,每个像素值对应于图像帧内各自的像素位置;(ii)测定对应时间周期内所述样品容器内一个或多个活性对象相对于所述图像帧的位置,其中所述一个或多个活性对象中的每个活性对象都是所述对应时间周期内所述样品内存在的至少一个各自的生物活性细胞的一部分;(iii)对于所述对应时间周期内所述样品容器内所述一个或多个活性对象的每个活性对象,测定在整个所述对应时间周期内各自的时变活性水平;和(iv)基于所述一个或多个活性对象所测定的所述时变活性水平,通过测定所述特定活性对象所测定的所述时变活性水平展现至少一个脉冲串从所述一个或多个活性对象中选择活性对象的子集。测定在整个所述对应时间周期内各自的时变活性水平可以包括基于所述多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像的各自的像素值的集合测定所述各自的时变活性水平,所述像素值的集合具有接近所述一个或多个活性对象的所述各自的所测定的位置的像素位置。

[0007] 本公开的又另一方面涉及一种非暂时性计算机可读介质,其被配置成存储至少计算机可读指令,所述计算机可读指令在由一个或多个计算机设备的处理器执行时使所述计算机设备执行计算机操作实施本文所述的一种或多种方法。

[0008] 本公开的又另一方面涉及一种系统,其包括:(i)一个或多个处理器;和(ii)一种非暂时性计算机可读介质,其被配置成存储至少计算机可读指令,所述计算机可读指令在由所述一个或多个处理器执行时使所述系统执行本文所述的一种或多种方法。

[0009] 所属领域的一般技术人员通过适当地参考附图阅读以下详细描述将明白这些以及其它方面、优势和替代方案。此外,应理解,在本发明内容部分和本文其它地方提供的描述打算通过实例而非限制的方式说明所要求的主题。

附图说明

[0010] 图1描绘含有细胞的实例样品。

[0011] 图2A描绘在第一时间点拍摄的图1样品的图像。

[0012] 图2B描绘在第二时间点拍摄的图1样品的图像。

[0013] 图2C描绘在第三时间点拍摄的图1样品的图像。

[0014] 图2D描绘在第四时间点拍摄的图1样品的图像。

[0015] 图3描绘从图2A-D的图像生成的“范围图像”。

[0016] 图4描绘图3的“范围图像”的分割。

[0017] 图5A描绘细胞或细胞部分所测定的实例时变活性迹线。

[0018] 图5B描绘细胞或细胞部分所测定的实例时变活性迹线。

[0019] 图5C描绘样品的一系列图像所测定的实例时变光漂白曲线。

[0020] 图6描绘实例自动化样品成像设备的元件。

[0021] 图7是实例方法的流程图。

[0022] 图8是实例方法的流程图。

[0023] 图9是实例成像和分析系统的图像。

[0024] 图10是实例方法的流程图。

[0025] 图11是实例方法的流程图。

- [0026] 图12描绘随时间推移样品发展的实例进展。
- [0027] 图13A描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0028] 图13B描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0029] 图13C描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0030] 图13D描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0031] 图13E描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0032] 图13F描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0033] 图13G描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0034] 图13H描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0035] 图13I描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0036] 图13J描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0037] 图14描绘细胞的分化。
- [0038] 图15描绘本文所述的系统的功能。
- [0039] 图16A描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0040] 图16B描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0041] 图16C描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0042] 图16D描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0043] 图17A描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0044] 图17B描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0045] 图18A描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0046] 图18B描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0047] 图18C描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0048] 图18D描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0049] 图18E描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0050] 图18F描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0051] 图19描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0052] 图20描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0053] 图21描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0054] 图22描绘使用本文所述的系统和方法获得的实例实验结果。
- [0055] 本专利或申请文件含有至少一幅彩色图。具有彩色图式的这种专利或专利申请公开案的复本将在请求和支付必需费用之后由专利局提供。

具体实施方式

[0056] 本文描述方法和系统的实例。应理解,词语“示范性”,“实例”和“说明性”在本文中用来表示“充当实例、例子或说明”。本文中被描述为“示范性”、“实例”或“说明性”的任何实施例或特征不一定被解释为比其它实施例或特征优选或有利。此外,本文描述的示范性实施例不意味是限制性的。容易理解的是,所公开的系统和方法的一些方面可以以多种不同的配置来布置和组合。

[0057] I. 概述

[0058] 在多种应用中需要测量和分析组织和/或细胞样品随时间推移(例如,数小时、数天、数周或数月或任何其它合适的时间周期)的表现。这类检测和分析可以促进随时间推移评估多种治疗性治疗、环境条件、遗传修饰、传染病或其它特定条件,以评估治疗功效,测定物质毒性或测定一些其它相关信息。此检测和分析可以包括对细胞和/或组织样品进行成像。这类成像可以包括对于多个不同时间周期(例如,每小时、每天、每周、每天两次,或其它合适的时间周期集合)生成每个时间周期内的描述样品的结构和/或活性的影片或其它图像序列。“影片”可以包括在特定时间周期内采集的样品的所有图像,或者可以包括这类图像的子集。

[0059] 这类图像序列可以提供有关样品中细胞活性的模式或结构的信息。可以将样品中细胞对、细胞部分或其它“活性对象”之间的连接程度测定为活性对象对所测定的时变活性水平之间的相关性或相干性,存在、振幅、宽度或峰的一些其它度量或描述细胞对活性之间的关系的所测量的概率函数的其它特征,或样品中活性对象对随时间推移所测量的活性水平之间的相似性和/或因果关系的程度的一些其它度量。可以将样品中的活性对象群体的连接程度测定为这类成对度量的平均值或其它总度量。可以基于样品中的活性对象所测定的成对度量,将样品中的活性对象之间的连接性的模式测定为样品中的活性对象之间的烈度、方向或其它连接性的度量的图表或其它指示。

[0060] 可以在神经元、肌细胞或可以相互电信号传递或以其它方式进行功能连接的细胞之间测定这类连接性的度量,从而在几秒到几分钟的时间范围内第一细胞活性的变化导致连接到第一细胞的第二细胞中活性的可测量变化。

[0061] 为了促进这类成像,在时间周期内,可以将样品安置在自动化成像系统内或接近自动化成像系统。这类自动化成像系统可以包括成像设备(例如,显微镜、荧光成像仪、一个或多个光源和/或配置成有助于成像样品的其它元件)和被配置成相对于样品容器移动成像设备的台架或其它致动器,所述样品容器含有样品(例如,相对于具有多个孔的样品容器,每个孔包含培养细胞、移植组织或相关的其它一些生物材料的各自的样品)。致动器可以以自动化方式起作用以在指定的时间点(例如,根据扫描时间表)移动成像设备以对每个样品成像。因此,可以在多个扫描周期的每个周期内为每个样品自动生成一个或多个图像。可以将样品的(一个或多个)样品容器中的样品以及自动化成像系统中都放置在培养箱中,从而避免了从培养箱中取出样品进行成像的必要性。在这类实施例中,样品可以更“自然地”发育,避免了将样品从培养箱转移到成像系统可能引起的干扰。

[0062] 随时间推移,以这类方式操作这类系统可以产生特定样品的多个图像。使分析的一些方面自动化可能是有益的。例如,自动化系统(例如,实施本文所述的一个或多个方法的服务器或其它控制器)可以基于样品的图像操作以标识和定位样品内的“活性对象”。这类活性对象可以包括细胞或细胞部分(例如,核、线粒体或其它细胞器、细胞质和/或其区室、树突状节段或神经元的其它区室),它们随时间推移随活性变化(例如随钙浓度、跨膜电压、磷酸化和/或泛素化状态、转录或翻译活性,或相关的一些其它可成像的活性替代物)。这类细胞可以包括神经元、平滑肌细胞、横纹肌细胞、心肌细胞、分泌性上皮细胞或一些其它多种细胞,这些细胞可以展示相关的可成像的活性水平的增加和减少。

[0063] 可能难以标识和定位(或“分割”)图像中的这类对象,尤其是要标识随时间推移的变化。为了标识和定位这类对象,可以使用来自样品扫描的一系列图像来生成在扫描周期

内样品的“范围图像”。通过为图像序列的图像帧内的每个位置测定序列的所有图像上的最大强度值和最小强度值之间的差异测定这种范围图像。因此,在整个图像序列中,范围图像的“亮”像素对应于随成像活性水平(例如,随荧光检测的细胞内钙浓度)变化的位置(例如,细胞的位置或细胞的部分的位置)。然后可以从范围图像中(例如,通过阈值、模板匹配等)测定样品内关于“活性对象”(例如,细胞,细胞部分)的位置、范围或其它信息。这种方法的优点在于,舍弃了“总是具有活性的”区域(例如,展示始终高的但不变化的人为自发荧光水平的区域),同时突出了随活性而变化的区域,但是呈现很少和/或弱活性(例如,在扫描过程中神经元的活性仅突发一次)。

[0064] 然后可以使用关于所标识的活性对象的位置、范围或其它信息来测定关于活性对象的信息。例如,可以测定整个扫描中每个活性对象的时变活性迹线。此时变活性迹线可以用于测定关于活性对象的信息(例如,脉冲串速率、平均脉冲串持续时间或强度、整体平均强度、突发/展现升高的活性所花费的时间)、关于活性对象群体(例如,整体平均脉冲串持续时间、平均脉冲串速率)和/或关于活性对象之间的关系(例如,时变活性迹线之间的相关性、活性对象集合的时变活性迹线之间的相关性程度或模式)。另外或或者,这类时变活性迹线可以通过从进一步的分析中拒绝所标识出的不展现至少一个脉冲串的对象来过滤掉被错误地标识为活性对象的对象(例如,使用上述范围图像方法标识的对象)。

[0065] II. 实例图像处理

[0066] 可以使用本文所述的系统和方法或/或使用一些其它装置或方法来生成容纳在样品容器内的样品的多个图像。可以根据生成图像的时间将图像组织为离散的“扫描”。每次扫描在时间上与其它扫描相隔指定的时间量(例如,数小时、数天、数周、数月),并且每次扫描可以包括一个或多个图像。例如,每次扫描可以包括以每秒三张图像的速率(或以其它合适的速率)拍摄的三秒钟相当的样品图像(或其它合适的持续时间)。可以分析与特定扫描相对应的图像,以测定在扫描时间周期内关于样品的一些信息。这可以包括测定样品中的细胞和/或其部分在扫描期间展现某种活性(它们是“活性对象”)、定位和/或测定这类细胞和/或其活性部分的空间范围,或测定关于样品的一些其它信息。例如,对于每个这类标识和/或定位的对象,可以测定时变活性迹线,其描述对象在扫描中的活性水平。这类活性水平(或“迹线”)可以用于测定关于细胞的信息,关于细胞群体的信息,关于细胞之间的相互关系的信息或关于样品的一些其他信息。可以为随时间推移进行的许多不同扫描的每次扫描测定这类信息,并将其用于测定关于样品随时间推移(例如,数小时、数天、数周或数月)的表现的一些信息。

[0067] 可以将多种图像处理技术应用于在单次扫描期间拍摄的样品的可见光和/或不可见光图像,以标识、定位和/或测定样品内相关的细胞或其他对象的图像内的范围。在单次扫描期间拍摄的图像用于生成“范围图像”,所述范围图像突出在扫描过程中展现强度变化的对象(例如,细胞、细胞部分),这些强度变化对应于活性水平的变化。例如,图像可以是检测样品中与相关的活性对应的荧光物质而拍摄的荧光图像。这种荧光物质可以包括钙敏感荧光团(例如,选择细胞内钙的浓度代表活性)、电压敏感荧光团(例如,选择跨膜电压的变化代表活性)或其他具有荧光特性(例如,荧光强度、激发波长、发射波长)的物质,所述特性与一些相关的活性度量(例如,磷酸化/泛素化状态、转录/翻译活性、细胞内钙浓度、跨膜电压)有关。另外或或者,染料、发色团、化学发光物质或具有与相关的一些活性度量有关的

光学特性(例如,颜色、不透明度、强度)的其他物质可以用于促进扫描期间进行活性的成像。

[0068] 对于范围图像的给定像素,可以通过在整个扫描图像中测定与扫描图像的图像帧内的范围图像的给定像素的位置对应的像素值集合的范围来为扫描生成这种范围图像。这可以包括在整个扫描图像中仅比较那些与范围图像像素位置完全对应的像素。或者,每个图像的附近像素集合可以用于生成范围(例如,在测定范围图像时提供平滑或过滤函数)。测定这种像素值集合的范围可以包括测定像素值的最大值与像素值的最小值之间的差,或者可以包括其他方法(例如,测定像素值的第五百分位数与像素值的第九十五百分数之间的差,以舍弃离群值像素值)。使用本文所述的方法生成的范围图像可以突出扫描图像集合内表示的对象,这些对象在整个扫描周期内随强度变化,即使那些对象可能呈现很少活性和/或在扫描周期内持续了很短的(一个或多个)时间周期。此外,这种范围图像可以拒绝和/或不突出在整个扫描周期展现一致的高强度的对象和/或区域(例如,由于存在混杂的自发荧光物质或错误地激活荧光团或样品中其他活性敏感造影剂的物质),但不会发生变化,且因此不太可能表示活性细胞、细胞部分或其他相关的活性对象。

[0069] 图1说明实例样品容器的内容物100(例如,含有这类孔的阵列的样品容器的孔的内容物)。内容物100包括第一细胞110a和第二细胞110b(例如,第一和第二神经元)。细胞110a、110b是活性细胞,使得如果在扫描周期内多次成像,则从细胞接收的光的强度(例如,从由细胞表达或以其他方式存在细胞中的钙敏感荧光团中接收的荧光)在整个扫描周期内图像之间不同。细胞110a、110b包括可以使用本文所述的方法检测为各自的活性对象的活性区域。如图所示,第一细胞110a包括第一活性对象120a(例如,核),而第二细胞110a包括第二活性对象120b(例如,核)和第三活性对象120c(例如,树突状网络的部分,其展现钙浓度或其他一些与活性相关的可成像特性随时间推移的变化)。

[0070] 根据本文所述的系统和方法,和/或经由一些其他装置或方法,可以在整个扫描周期内对样品容器的内容物100多次成像。在整个扫描期间,细胞和/或其活性部分的强度可以随那些细胞和/或其部分的活性变化而变化。因此,从那些细胞和/或细胞部分接收的光的强度在整个扫描周期内可以变化,并且这种变化可以通过在整个扫描周期内拍摄的图像来采集。然后,这些变化可以用于生成范围图像,所述范围图像继而可以用于标识、定位或执行与样品容器内容物有关的一些其他分析。

[0071] 图2A、2B、2C和2D分别说明在扫描周期内分别在各自的不同的第一、第二、第三和第四时间点从内容物100拍摄的第一200a、第二200b、第三200c和第四200d实例图像。第一活性对象120a在第一时间点和第二时间点期间具有活性,因此第一200a和第二200b图像显示对应的高强度区域,而第三200c和第四200d图像的对应位置相对较暗。第二活性对象120b仅在第四时间点具有活性,而第三活性对象120c在第一、第三和第四时间点具有活性。另外,伪像130在所有四个时间点上以一致的强度发射光。因此,所有四个图像200a-d均显示对应的高强度区域。这种伪像可能是展现干扰自发荧光的区域(例如,包括与用于在样品内成像的荧光团随激发光谱和/或发射光谱重叠的荧光团),含有高浓度造影剂和/或包括增加造影剂荧光的物质(例如,结合并激活钙敏感荧光团)或通过某种其他机制发出混杂光的区域。

[0072] 然后可以在扫描周期内从实例图像200a-d和/或从样品内容物100拍摄的额外图

像生成范围图像300。可以根据本文所述的系统和/或方法来生成此范围图像300,使得在范围图像300(亮区域)中突出活性对象120a、120b、120c。相反,在整个扫描期间未展现强度变化的区域(例如,对应于伪像130的区域)不会在范围图像中被突出。范围图像300然后可以用于标识、定位和/或测定样品内的活性对象的范围。

[0073] 可以基于如本文所述生成的范围图像,通过多种方法来完成这种标识、定位或其他分割任务。例如,可以在标识范围图像内的活性对象(例如,细胞、细胞部分)的位置之前,将背景减法、噪声过滤或一些其他预处理方法应用于范围图像。然后将阈值、模板匹配或其他方法应用于范围图像和/或其预处理版本以在范围图像的图像帧内定位活性对象。

[0074] 测定活性对象的位置(例如,在扫描期间细胞内钙浓度或相关的其他生物活性的一些其他可成像度量展现变化的细胞或细胞部分的位置)可以包括测定单个位置(例如,质心、活性对象边界内的任意点)、有效半径、区域(例如,由活性对象的测定周长定义的区域)、图像帧内像素集合或其他离散子区域,或测定每个活性对象的一些其他位置信息。图4说明图1所示的活性对象120a、120b、120c所测定的图2A-D所示的图像200a-d的图像帧400内的多种位置。测定位置可以包括测定每个活性对象(例如,对应范围图像中离散或以其他方式可区分的高强度区域的质心)的单个点(例如410a、410b、410c)的位置。另外或或者,测定位置可以包括测定每个活性对象占据的图像帧内的范围(例如,420a、420b、420c)。这可以包括测定每个活性对象在其上延伸的范围图像的像素集合和/或像素位置。

[0075] 所测定的活性对象的位置然后可以用于测定关于每个活性对象的信息。例如,可以基于所测定的位置测定每个活性对象的时变活性水平。特定活性对象的时变活性水平表示整个扫描过程中的活性对象的活性水平,所述活性水平由采集的含有活性对象的样品的图像的强度(例如细胞内钙浓度)表示。因此,时变活性水平可以用于评估活性对象的活性(例如,神经元或其部分的动作电位的发放)的整体水平、模式和时序(例如,相对于其它活性对象)。例如,可以从活性对象所测定的时变活性水平测定关于活性对象的活性的脉冲串速率或频率、脉冲串持续时间、脉冲串强度、平均活性水平、活性水平变化或一些其它信息和或其分配。这类信息也可以用于测定样品的整体度量,例如,可以从样品中的活性对象的时变活性水平来测定样品中的活性对象的平均整体活性。

[0076] 所测定的时变活性水平也可以用于测定关于样品内的活性对象(例如,神经元)之间的功能性连接的信息。例如,可以测定样品中的每对活性对象的成对相关性。然后可以报告和/或使用这种相关性来测定样品内活性对象的活性之间的协调模式或整体程度。

[0077] 可以通过多种方式生成特定活性对象的时变活性水平。在测定活性对象的位置的实例中,所述测定包括测定像素集合或关于活性对象的图像帧内的范围的一些其它信息,测定活性对象的时变活性水平可以包括测定整个扫描中的每个荧光强度图像的像素的整体强度的总和、平均值或一些其他度量,其对应于活性对象的范围(例如,所测定的对应于活性对象的像素集合)。在另一实例中,在活性对象的测定点位置的指定距离内的像素的加权平均值可以用于测定活性对象在整个扫描中的时变活性水平。

[0078] 样品的荧光成像可能导致样品光漂白。这种光漂白可以在采集的样品的荧光图像中表现为随时间推移,样品和/或其中的活性对象的检测到的荧光强度的逐渐降低。可以检测和/或量化光漂白,并且可以以多种方式减少或消除其光漂白的效果(例如,对从此类荧光图像生成的时变活性迹线)。图5A说明展现光漂白的活性对象所测定的时变活性迹线500

的实例。由光漂白引起的时变活性迹线500的下降趋势由虚线510指示。可以从时变活性迹线500测定此光漂白作用的水平,例如,通过应用低通滤波器,通过应用移动窗口最小值,通过标识和消除离散脉冲串或通过采用一些其他方法来测定。然后可以将所测定的光漂白水平应用于补偿光漂白的效果,从而生成活性对象的更准确的时变活性水平(通过图5B中的实例显示为校正时变活性水平520)。另外或或者,可以以一些其他方法来测定随时间变化的光漂白水平(例如,通过测定扫描的每个荧光活性图像的各自的光漂白水平),并将其应用于校正一个或多个随时间变化的活性水平(通过图5C中的实例显示为光漂白水平530)。

[0079] 上述的范围图像方法可以用于标识和/或定位样品中的活性对象。另外或或者,可以基于它们在整个扫描过程中展现一个或多个不同的脉冲串来标识这类对象。例如,可以测定假定的活性对象的位置(例如,使用上述范围方法和/或使用一些其他分割方法),并且此测定的位置用于测定假定的活性对象的时变活性水平。然后可以分析此时变活性水平来测定时变活性水平是否含有至少一个脉冲串。如果含有,就可以确认假定的活性对象,并将其用于额外分析(例如,平均脉冲串速率、整体群体脉冲串速率、测定样品中已确认活性对象之间的连接程度和/或模式)。如果未检测到脉冲串,则可以拒绝假定的活性对象,并从其他分析中舍弃它的时变活性迹线。因此,可以从假定的活性对象群体中选择活性对象的子集,这些子集展示脉冲串并且因此更有可能表示实际的活性细胞和/或其部分。这种选择方法可以具有如下效益:例如,在范围图像中检测到一个或多个假定的活性对象,这些对象不展示脉冲串,而是在扫描中展示人为的高水平的光漂白,且因此可能在范围图像内表现为高强度区域。

[0080] 脉冲串包括在扫描期间检测到的细胞、细胞部分或其他活性对象的活性的任何快速变化。例如,脉冲串可能导致记录的视频序列中检测到的活性对象的荧光强度快速变化。这种脉冲串导致所测定的活性对象的时变强度水平迹线中的峰值。可以使用多种不同的方法在给定的时变活性水平内标识脉冲串。在一些实例中,可在时变活性水平超出阈值的任何时变活性水平内和/或每当时变活性水平从基线水平(例如,从使用移动窗口最小值的时变活性水平迹线测定)增加超过阈值水平和/或增加超过阈值速率时标识脉冲串。另外或或者,模板匹配、高通滤波或其他方法可用于标识在如本文所述测定的时变活性水平内的脉冲串。可以从活性对象的时变活性水平迹线中计算出这类脉冲串峰值的烈度和持续时间特性。可以为每个活性对象计算平均脉冲串特性,然后在扫描中合计样品中所有活性对象。

[0081] III. 实例系统

[0082] 在一段时间内的多个不同扫描周期中,可以采用自动化成像系统以自动化方式在样品容器的各自的孔中生成多个生物样品的图像(例如,荧光活性图像)。可以由自动化成像系统在每个扫描周期内拍摄每个样品的图像集合,例如,在三分钟的扫描周期内以每秒三张图像的速率拍摄图像集合。然后可以例如根据本文所述的方法来分析图像以测定关于样品的一些信息。

[0083] 与手动成像相比,使用这种自动化成像系统可以显著减少对生物样品进行成像的人员成本,并且可以提高生成的图像在时序、定位和图像参数方面的一致性。此外,这种自动化成像系统可以配置为在培养箱内操作,从而无需从培养箱中取出样品进行成像。因此,可以更始终维持样品的生长环境。另外,在自动化成像系统用于相对于样品容器移动显微镜或其他成像装置(而不是例如移动要由静态成像设备成像的样品容器)的情况下,可以减

少样品的与移动有关的干扰。这可以改善样品的生长和发展,并减少与移动有关的混乱。

[0084] 可以操作这种自动化成像系统以在扫描期间生成一个或多个图像,所述扫描相隔超过二十四小时、超过三天、超过三十天或更长的时间周期。可以指定扫描以指定速率发生,例如,每天一次、每天多于一次、每天多于两次或每天多于三次。可以指定扫描,使得在二十四小时周期内至少发生两次、至少三次或更多次的扫描。在一些实例中,可以分析(例如,根据本文所述的方法)来自一次或多次扫描的数据,并将其用于测定额外扫描的时序(例如,以提高速率、持续时间、图像采集速率或一些其他特性)以检测离散事件的发生,所述离散事件预计会在样品内发生。

[0085] 这种自动化成像系统的使用可以促进在长时间周期内在多个时间点对相同生物样品的成像。因此,可以随时间推移分析单个细胞和/或细胞网络的发展和/或表现。例如,可以在单个样品内,在不同的、宽间隔的时间周期内进行的扫描中,标识细胞集合、细胞部分或其他活性对象。然后可以在扫描之间比较这些标识出的对象集合,以在整个扫描中标识出相同的(一个或多个)活性对象。因此,可以在数小时、数天、数周或数月内跟踪和分析单个细胞或细胞部分的表现。

[0086] 图6说明这种自动化成像系统600的元件。自动化成像系统600包括自动化成像系统600的其他元件所附接的框610。框610可以被配置(例如,确定尺寸)以装配在培养箱内。自动化成像系统600包括样品容器620,所述样品容器可移除地置放在与框610耦接的样品容器托盘630内。样品容器托盘630可以是可移除的和/或可以包括可移除的插入物,以利于容纳多种不同的样品容器(例如,多种工业标准样品容器)。系统600还包括被配置为相对于样品容器620放置成像装置640的致动台架650,使得可以操作成像装置640以生成样品容器620的各个孔的内容物的图像(例如,实例孔625)。

[0087] 成像装置640可以包括显微镜、荧光成像器、双光子成像系统、相差成像系统、一个或多个照明源、一个或多个滤光器和/或被配置为促进对容纳在样品容器620中的样品进行成像的其他元件。在一些实例中,成像装置640包括放置在样品容器620的两侧上的元件(例如,相干、偏振、单色或其他指定的照明光的来源,以例如对生物样品进行相差成像)。在这类实例中,样品容器620的两侧上的元件可以耦接到各自的不同的台架、相同的机架和/或样品容器620的一侧上的元件可以相对于样品容器620不可移动。

[0088] 致动台架650耦接到框610和成像装置640,并且被配置成控制装置640相对于样品容器620在至少两个方向上的位置,以在其中对样品容器620内的多个不同样品成像。致动台架650还可被配置成控制成像装置640在朝向和远离样品容器620的第三方向上的位置,以控制使用成像装置640生成的图像的聚焦和/或控制样品容器620内可使用成像装置640成像的材料深度。另外或或者,成像装置640可以包括一个或多个致动器以控制成像装置640的焦距。

[0089] 致动台架650可以包括被配置成促进检测成像装置640相对于样品容器620(例如,相对于样品容器620的特定(一个或多个)孔)的绝对和/或相对位置的元件。例如,致动台架650可以包括编码器、限位开关和/或其他位置传感元件。另外或或者,成像装置640或系统的其他元件可以被配置成检测样品容器620和/或样品容器托盘630的基准标记或其他特征,以测定成像装置640相对于样品容器620的绝对和/或相对位置。

[0090] 可以通过一个或多个计算系统执行计算功能(例如,用于在指定的时间周期内操

作致动台架650和/或成像装置640以对样品容器620内的样品进行成像,生成范围图像和/或执行本文所述的一些其他方法的功能)。这种计算系统可以被整合到自动化成像系统(例如600)中,可以与这种自动化成像系统相关联(例如,通过经由直接有线或无线连接,经由本地网络和/或经由因特网安全连接和/或可以采用某种其他形式(例如,与自动化成像系统通信和/或可以访问生物样品图像存储的云计算系统)。这种计算系统可以包括通信接口、用户接口、处理器和数据存储,所有这些都可以通过系统总线、网络或其它连接机制互动式地连接在一起。

[0091] 通信接口可以起到允许计算系统使用电、磁、电磁、光或其他信号的模拟或数字调制与其他设备、接入网络和/或传输网络进行通信。因此,通信接口可以促进电路交换和/或包交换通信,例如普通老式电话服务(POTS)的通信和/或因特网协议(IP)或其它封包通信。例如,通信接口可以包括被布置成与无线接入网络或接入点的无线通信的芯片组和天线。此外,通信接口可以采取或包括以下形式:有线接口,例如以太网、通用串行总线(USB)或高清多媒体接口(HDMI)端口。通信接口402也可以采取无线接口形式或包括无线接口,例如WiFi、蓝牙(BLUETOOTH®)、全球定位系统(GPS),或广域无线接口(例如,WiMAX或3GPP长期演进(LTE))。然而,其它形式的物理层接口和其它类型的标准或专用通信协议可以用于以上通信接口。此外,通信接口可以包含多个物理通信接口(例如,WiFi接口、蓝牙接口和一个广域无线接口)。

[0092] 在一些实施例中,通信接口可以起到允许计算系统与其他设备、远程服务器、接入网络和/或传输网络进行通信。例如,通信接口可以起到传输和/或接收生物样品图像(例如,荧光活性图像)的指示来传输以下指示:范围图像、这类图像内的活性对象的位置集合和/或由使用本文所述的方法从这类图像生成的这类活性对象所测定的时变活性迹线,或一些其它信息。

[0093] 这种计算系统的用户接口可以起到允许计算系统与用户进行交互,例如以接收来自用户的输入和/或提供输出给用户。因此,用户接口可以包括输入组件,例如小键盘、键盘、触敏或对存在敏感的面板、计算机鼠标、跟踪球、操纵杆、麦克风等。用户接口还可以包括一个或多个输出组件,例如可例如与对存在敏感的面板组合的显示屏。显示屏可以基于CRT、LCD和/或LED技术,或其他目前已知或后续开发的技术。用户接口还可以被配置成经由扬声器、扬声器插孔、音频输出端口、音频输出设备、耳机和/或其它类似装置生成可听输出。

[0094] 在一些实施例中,用户接口可以包括用于将本视频或其他图像呈现给用户的显示器(例如,特定的生物样品的特定扫描期间生成的图像的视频)。此外,用户接口可以包括一个或多个按钮、开关、旋钮和/或促进计算设备的配置和操作的拨号盘。可以有可能的是,这些按钮、开关、旋钮和/或拨号盘中的一些或全部实施为对触控或存在敏感的面板上的功能。用户接口可以允许用户指定自动化成像系统中含有的样品类型,指定样品成像时间表,指定由系统执行的图像分割和/或分析参数,或输入一些其他命令或参数以使自动化成像系统操作。

[0095] 在一些实例中,本文所述的方法的部分可以由不同的设备根据应用执行。例如,系统的不同的设备可以具有不同量的计算资源(例如,存储器、处理器周期)和设备之间的通信的不同的信息带宽。例如,第一设备可以是(一个或多个)嵌入式处理器,其可以操作致动

台架、成像装置或其他元件以在多个不同的扫描周期内生成生物样品的图像。然后,第二设备可以从第一设备接收(例如,经由因特网,经由专用有线链路)来自第一设备的图像信息,并对接收到的图像数据执行本文所述的图像处理和分析方法。本文所述的方法不同部分可以根据这类考虑分配。

[0096] IV. 实例方法

[0097] 图7是用于在一个或多个时间周期内标识生物活性细胞的方法700的流程图。方法700包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期,生成容纳在样品容器内的样品的多个荧光活性图像(710)。样品包括生物活性细胞,且多个荧光活性图像中的每个图像包括各自的多个像素值,每个像素值对应于图像帧内的各自的像素位置。方法700另外包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期,从多个荧光活性图像生成荧光范围图像(720)。从多个荧光活性图像生成荧光范围图像包括测定荧光范围图像的多个像素值且测定荧光范围图像的给定像素值包括从多个荧光活性图像的每个荧光活性图像测定像素值集合的范围,所述像素值具有对应于图像帧内给定像素值的像素位置。

[0098] 方法700另外包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期,基于荧光范围图像,测定在对应的时间周期内样品容器内的一个或多个活性对象相对于图像帧的位置(730)。一个或多个活性对象中的每个活性对象是在对应的时间周期内存在于样品内的至少一个各自的生物活性细胞的部分。方法700还包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期,以及在每个对应的时间周期内,对于样品容器内的一个或多个活性对象中的每个活性对象,测定整个对应时间周期内的一个或多个活性对象的每个活性对象的各自的时变活性水平(740)。这可以包括基于来自多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像的像素值集合测定每个时变活性水平,所述像素值具有接近于对应的活性对象的所测定的像素位置。

[0099] 图8是用于在一个或多个时间段内标识生物活性细胞的方法800的流程图。方法800包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期,生成容纳在样品容器内的样品的多个荧光活性图像(810)。样品包括生物活性细胞,且多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像包括各自的多个像素值,每个像素值对应于图像帧内的各自的像素位置。方法800另外包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期,测定对应的时间周期内样品容器内的一个或多个活性对象相对于图像帧的位置(820)。一个或多个活性对象中的每个活性对象是在对应的时间周期内存在于样品内的至少一个各自的生物活性细胞的部分。

[0100] 方法800另外包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期以及每个对应的时间周期内的样品容器内的一个或多个活性对象中的每个活性对象,测定整个对应时间周期内各自的时变活性水平(830)。这可以包括基于来自多个荧光活性图像中的每个荧光活性图像的各自的像素值集合来测定各自的时变活性水平,所述像素值具有接近于一个或多个活性对象的各自的所测定的位置的像素位置。方法800另外包括,对于一个或多个时间周期中的每个时间周期,并且基于一个或多个活性对象所测定的时变活性水平,从一个或多个活性对象中选择活性对象的子集(840)。从一个或多个活性对象中选择特定活性对象包括测定特定活性对象的所测定的时变活性水平展现至少一个脉冲串。

[0101] 方法700、800都可以包括额外元件或特征。

[0102] V. 实例实施例

[0103] 研究影响神经系统的人类疾病的主要障碍是监测,分析和量化准确表示人类表型的神经元细胞活性的能力。

[0104] 目前,在患病和未患病状态下,认为各种类型的培养神经元有希望作为哺乳动物神经元功能的模型。然而,哺乳动物的神经元系统很复杂,并且仍然需要工具,包括试剂、硬件、软件和指导性协议,以表征培养神经元,分析其功能,分析培养中神经元形成的神经网络,提供培养神经元的质量控制并改善诱导多能干细胞(iPSC)衍生的神经元细胞模型。

[0105] 例如,由本公开提供的用于神经元分析的改良工具产生更好的功能细胞模型来测定参数,例如但不限于培养神经元是否具有功能活性,何时神经元在培养中具有功能活性以及功能活性随时间推移在不同的实验条件下如何变化,神经元的物理特性是什么以及物理特性随时间推移在不同的实验条件下如何变化。根据本公开提供的方法和系统允许用户对神经元培养基进行多个相关测量,所述测量在统计上是稳固的,因为来自数千个细胞的测量都是可能且实用的。根据本公开提供的方法和系统允许用户以比先前系统更高的吞吐量来分析长期培养中的变化。

[0106] 本文所用的科学和技术术语打算具有所属领域普通技术人员通常理解的含义。发现这类术语在各种标准参考文献中被定义和使用,包括J.Sambrook和D.W.Russell,《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社;第3版,2001;F.M.Ausubel编,《分子生物学简明实验方案,当前方案(Short Protocols in Molecular Biology,Current Protocols)》;第5版,2002;B.Alberts等人,《细胞分子生物学(Molecular Biology of the Cell)》,第4版,Garland,2002;D.L.Nelson和M.M.Cox,Lehninger《生物化学原理(Principles of Biochemistry)》,第4版,WH Freeman&Company,2004;和Kursad Turksen(编),《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》中《胚胎干细胞:方法和方案(Embryonic stem cells:methods and protocols)》2002;185,胡马纳出版社;《干细胞生物学的最新方案(Current Protocols in Stem Cell Biology)》,ISBN:9780470151808。

[0107] IncuCyte S3活细胞分析系统

[0108] IncuCyte S3硬件由2个组件组成:1)台架和2)控制器。台架容纳显微镜、相机和自耗托盘,所述显微镜、相机和自耗托盘实现活细胞培养的自动化图像获取并且安装在标准组织培养箱中。在自发的神经元活性应用中,显微镜系统含有一个过滤器模块,所述过滤器模块专门用于收集橙色光谱中的荧光图像(例如:540nm;通带:[513,568nm;em:609nm;通带:[577,684]nm)和在近红外光谱中(例如:661nm;通带:[648,674];em:727nm;通带:[641,771]nm。控制器含有处理器、存储器和数据存储驱动器,其实现通过图形用户接口(GUI)从客户端计算机的图像存储、数据处理、数据库存储、文件系统、自动化图像处理、图形和网络交互。控制器上的软件提供2个目的:1)服务器交互,和2)仪器控制。

[0109] 将台架安装在培养箱中,且容纳显微镜和相机。

[0110] 控制器控制显微镜系统且充当服务器。

[0111] 控制器插入到通信端口中,例如但不限于以太网端口。

[0112] 图形用户接口(GUI)装载到计算机上并且与控制器(即服务器)交互以控制显微镜系统并且与数据交互。在根据本公开的各方面的控制器上完成所有自动化图像处理。

[0113] 自动化影片采集

[0114] Incucyte S3显微镜移动到用户定义的细胞培养皿位置,例如但不限于96孔板,打开适当的LED并使用所需的显微镜物镜(例如使用4×物镜3帧/秒(fps))以所需的速度采集影片。

[0115] 根据本公开的特定方面,所获取的数据以压缩格式存储,并且从影片中生成静态“范围”图像。范围图像由表示最小荧光强度的像素组成,这些像素从整个扫描周期的每个像素位置的最大荧光强度中减去。通过优化多个参数,可以完成对范围图像的图像分割,这些参数包括:背景减法(顶帽式),定义最小细胞宽度,荧光阈值。定义对象后,将使用额外用户定义的最小脉冲串强度过滤器来进一步定义脉冲串。每个对象通常是神经元,但是神经元部分也可以定义为对象,例如树突、轴突和/或突触。

[0116] 从这些分割的对象中,从3分钟的扫描中得出以下数据:1)相关性-扫描期间所有对象迹线的成对相关性分析;2)平均对象平均强度-整个扫描周期内所有对象的平均强度的平均值,3)脉冲串持续时间-整个扫描周期内所有对象的平均脉冲串持续时间的平均值,5)脉冲串速率-整个扫描周期内所有对象的脉冲串速率的平均值,6)脉冲串烈度-通过计算强度曲线下的面积除以脉冲串持续时间得出每个脉冲串的烈度。然后,整体脉冲串烈度量是整个扫描周期内所有对象的平均脉冲串烈度的平均值。最后,活性对象的数量由活性对象的总数(即扫描周期内的分割对象)定义。任选地,对于数据库中存储的每个对象、每个孔或每个孔集合,计算这些度量中的全部七个,或其子集,或单独或组合使用的一个或多个额外度量,并在通过图形用户接口在客户端计算机中获取数据之后不久显示给用户。

[0117] 通常每24小时扫描孔,但或多或少频繁扫描是可选择的。在每次扫描之后,在那些时间点计算并存储度量,例如在数据库中。例如,在30天实验的过程中,收集每个度量的30个时间点,串接到时间系列中,且可在整个实验时间范围(即数小时、数天、数周、数月)的过程中显现。

[0118] 如本文所述,本公开的系统和方法允许用户以自动化的、适中的吞吐量方式长时间监视神经网络活性的变化。相比之下,先前的方法是:1)终点方法(只能读取各种测量参数),2)极具破坏性的方法(钙染料与使用遗传编码的钙指示剂相比),3)需要用户将细胞移出用于分析/可视化的培养箱,4)在统计上不相关(由于从很少的细胞中进行测量),5)非常手动(非自动化),或6)低吞吐量(一次一孔,手动)。

[0119] 根据本公开的方面,对神经元或神经元类细胞进行基因工程改造以表达荧光蛋白,特别是但不限于钙指示剂蛋白GCaMP或其变体,例如Ca²⁺指示剂jRCaMP1b和其变体,其在红色光谱带中发射Ca(2+)依赖性荧光。

[0120] 在以下实例中说明本发明组合物和方法的实施例。这些实例是出于说明性目的提供,且不被视为对本发明组合物和方法的范围的限制。

[0121] IncuCyte S3成像用于自发神经元活性

[0122] 实验方法:细胞和试剂

[0123] 用于测量神经元活性的仪器/系统的实用性在长期成像实验中得到了证明,所述实验是将原代和iPSC衍生的神经元与大鼠星形胶质细胞共培养。细胞内Ca²⁺的时间变化用作神经元活性的量度。为了对细胞内Ca²⁺进行这些长期测量,经由慢病毒传递系统用基因编码的Ca²⁺指示剂(GECI) jRCaMP1b感染神经元。jRCaMP1b获得了霍华德·休斯医学研究所(Howard Hughes Medical Institute)的许可-美国专利:US2016/0176931A1且描述于Dana

等人,eLife 2016;5:e12727中。样品数据包括来自原代大鼠前脑神经元以及iPSC衍生神经元的三种制备物的实验:iCell GlutaNeuron(细胞动力学国际公司(Cellular Dynamics International)),Peri.4U神经细胞(Ncardia)和iNeuron(密歇根大学)。

[0124] 所有实验都在96孔微孔板上完成,微孔板涂有聚D-赖氨酸(大鼠前脑神经元),聚乙烯亚胺/层粘连蛋白(iGlutaNeuron和Peri.4U)或基质胶(iNeuron)以增强神经元和星形胶质细胞的附着。所有制备物与原代大鼠星形胶质细胞(MTI-全球干细胞有限公司(MTI-Global Stem))以15,000个细胞/孔的密度共培养。添加有丝分裂抑制剂(5-氟-2'-脱氧尿苷/尿苷组合,西格玛奥德里奇公司)以减少接种后2到3天的分离细胞的增殖。将培养物维持长达30天的时间,每周两次更换50%的培养基。

[0125] 在初代神经元实验中,将大鼠前脑神经元(从E-18胚胎(MTI-全球干细胞有限公司)获取)以每孔5,000至40,000神经元的密度接种在Neurobasal™培养基(赛默飞世尔(Thermo Fisher))中,并使用NeuroCult™ SM1神经元补充剂(干细胞技术有限公司(Stem Cell Technology))和2mM谷氨酰胺。接种后一天,用GECI jRCaMP1b感染神经元。接种后3天开始成像。作为实验条件,在板的部分中,将维护培养基更改为具有NeuroCult™ SM1神经元补充剂(干细胞技术有限公司)的BrainPhys™神经元培养基(干细胞技术有限公司)。

[0126] 在iCell GlutaNeuron实验中,将iCell GlutaNeuron以30,000个神经元/孔的密度接种在BrainPhys™神经元培养基(干细胞技术有限公司)中,并加入iCell神经元补充剂B(细胞动力学国际公司),iCell神经系统补充剂(细胞动力学国际公司)和N2补充剂(赛默飞世尔)。接种后一天,用GECI jRCaMP1b感染神经元。接种后3天开始成像,并持续27天。

[0127] 在Peri.4U神经细胞实验中,将Peri.4U神经细胞以25,000个神经元/孔的密度接种在神经元4U基础培养基(Ncardia)和神经元补充剂1(Ncardia)中。接种后一天,用GECI jRCaMP1b感染神经元。接种后3天开始成像。作为实验条件,在板的部分中,将维护培养基更改为具有NeuroCult™ SM1神经元补充剂(干细胞技术有限公司)的BrainPhys™神经元培养基(干细胞技术有限公司)。

[0128] 在iNeuron实验中,将iNeuron以10,000个神经元/孔的密度接种在3N培养基(DMEM/F12培养基和Neurobasal™培养基的组合、胰岛素、非必需氨基酸、赛默飞世尔)中。接种后二十一天,用GECI jRCaMP1b感染神经元。作为实验条件,在板的部分中,将维护培养基更改为具有NeuroCult™ SM1神经元补充剂(干细胞技术有限公司)的BrainPhys™神经元培养基(干细胞技术有限公司)。GECI感染后开始成像,并持续10天。

[0129] 应了解,出于简洁的目的在单独实施例的上下文中描述的本发明的一些特征还可以以组合形式提供于单个实施例中。相反地,出于简洁的目的在单独实施例的上下文中描述的本发明的一些特征还可以单独地或以任何适合的子组合形式提供。

[0130] 本说明书中提及的所有专利和公开案都以引用的方式并入本文中,其引用的程度如每个单独的公开案经特定并且单独地指示以引用的方式并入一般。

[0131] 本文所述的组合物和方法目前是优选实施例的代表,是示范性的,并且不打算限制本发明的范围。所属领域的技术人员将想到其中的变化和其它用途。在不脱离权利要求中所阐述的本发明的范围的情况下可以进行这类变化和其他用途。

[0132] VI. 结论

[0133] 以上详细描述参考随附图式描述所公开系统、设备和方法的各种特征和功能。除

非上下文另外表明,否则在附图中,相似的符号通常标识相似的组件。在详细说明、附图以及权利要求书中描述的说明性实施例并不打算具有限制性。在不脱离本文呈现的主题的范围的情况下,可以利用其它实施例,并且可以做出其它改变。将容易理解,可以在多种不同配置中安排、替代、组合、分开并且设计如本文一般所述并且在附图中说明的本发明的各方面,所有配置明确地涵盖在本文中。

[0134] 关于附图中以及如本文所讨论的任何或所有消息流程图式、场景和流程图,根据实例实施例,每个步骤、区块和/或通信可以表示信息的处理和/或信息的传输。替代实施例包括在这些实例实施例的范围内。在这些替代实施例中,例如,取决于步骤、区块、传输、通信、请求、反应和/或消息所描述的功能可以不按所显示或所讨论的顺序执行,包括取决于所涉及的功能以基本上同时或相反的顺序进行。此外,更多或更少的步骤,区块和/或功能可以与本文讨论的任何消息流程图式、场景和流程图一起使用,并且这些消息流程图式、场景和流程图可以彼此部分或全部组合。

[0135] 表示信息处理的步骤或区块可以对应于可以被配置为执行本文所述的方法或技术的特定逻辑功能的电路。或者或另外,表示信息处理的步骤或区块可以对应于程序代码(包括相关数据)的模块、区段或部分。程序代码可以包括一个或多个可由处理器执行的指令,用于在方法或技术中实现指定的逻辑功能或动作。程序代码和/或相关数据可以存储在任何类型的计算机可读介质上,例如存储设备,包括磁盘驱动器、硬盘驱动器或其他存储介质。

[0136] 计算机可读介质还可以包括非暂时性计算机可读介质,例如存储短时间周期的数据的计算机可读介质,例如寄存器存储器、处理器高速缓存器和/或随机存取存储器(RAM)。计算机可读介质还可以包括用于存储较长时间周期的程序代码和/或数据的非暂时性计算机可读介质,例如二级或永久性长期存储,例如只读存储器(ROM)、光盘或磁盘和/或例如光盘只读存储器(CD-ROM)。计算机可读媒体还可以是任何其它易失性或非易失性存储器系统。可以认为计算机可读介质是例如计算机可读存储介质,或有形的存储设备。

[0137] 此外,表示一个或多个信息传输的步骤或区块可以对应于相同物理设备中的软件和/或硬件模块之间的信息传输。然而,其他信息传输可以在不同物理设备中的软件模块和/或硬件模块之间。

[0138] 虽然本文中已公开了各个方面和实施例,但是其它方面和实施例将对所属领域的技术人员显而易见。本文所公开的各个方面和实施例是出于说明的目的并且不打算限制性的,其中真实的范围由所附权利要求书指示。

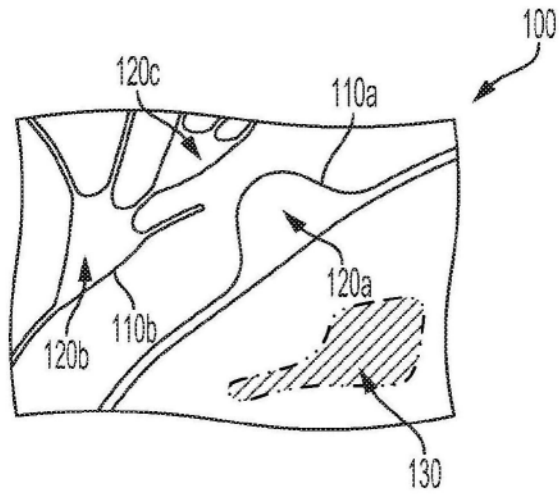


图1

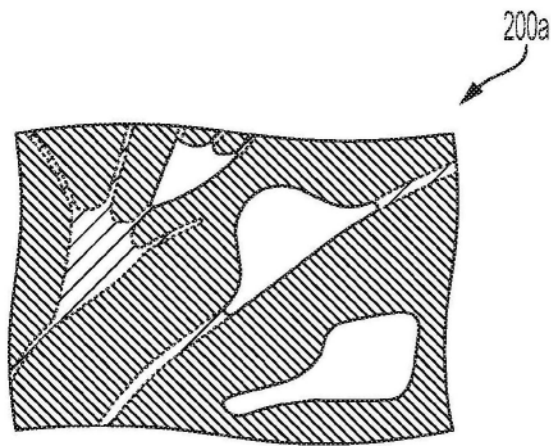


图2A

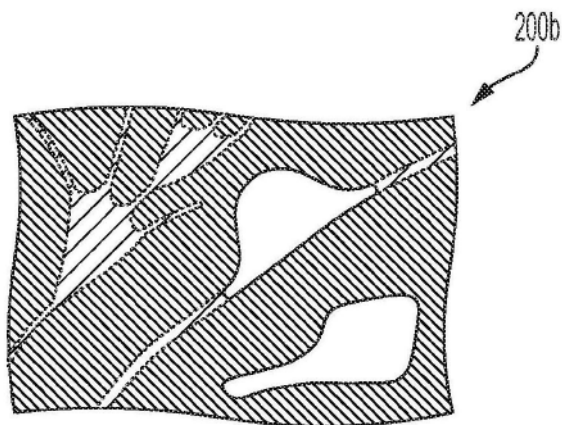


图2B

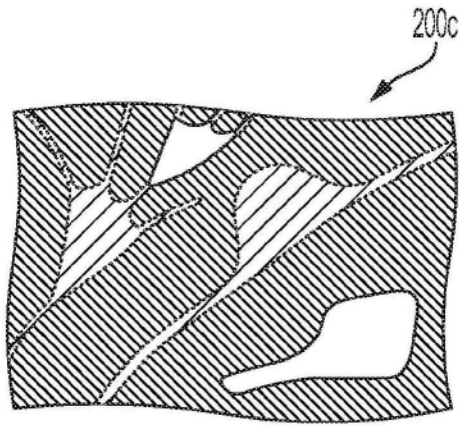


图2C

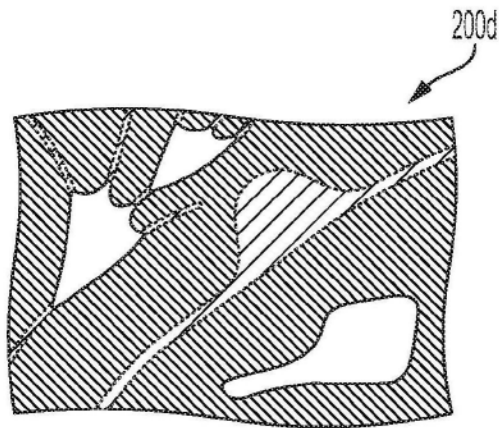


图2D

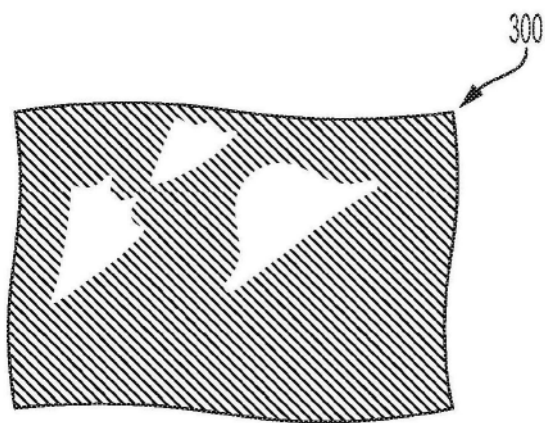


图3

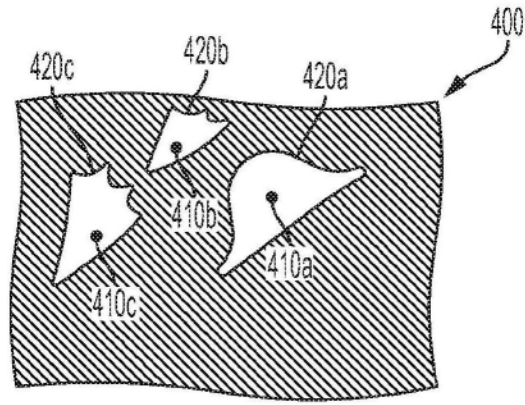


图4

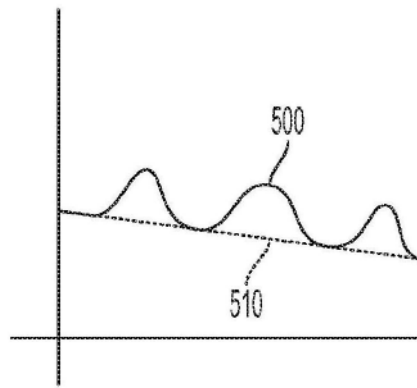


图5A

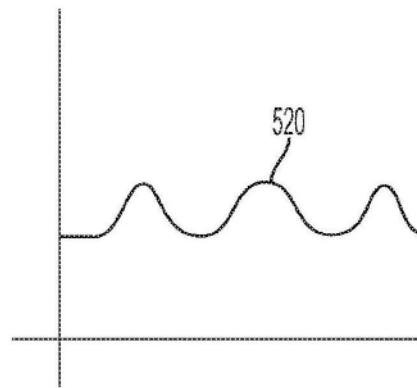


图5B

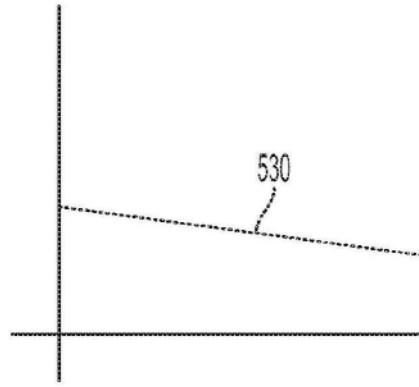


图5C

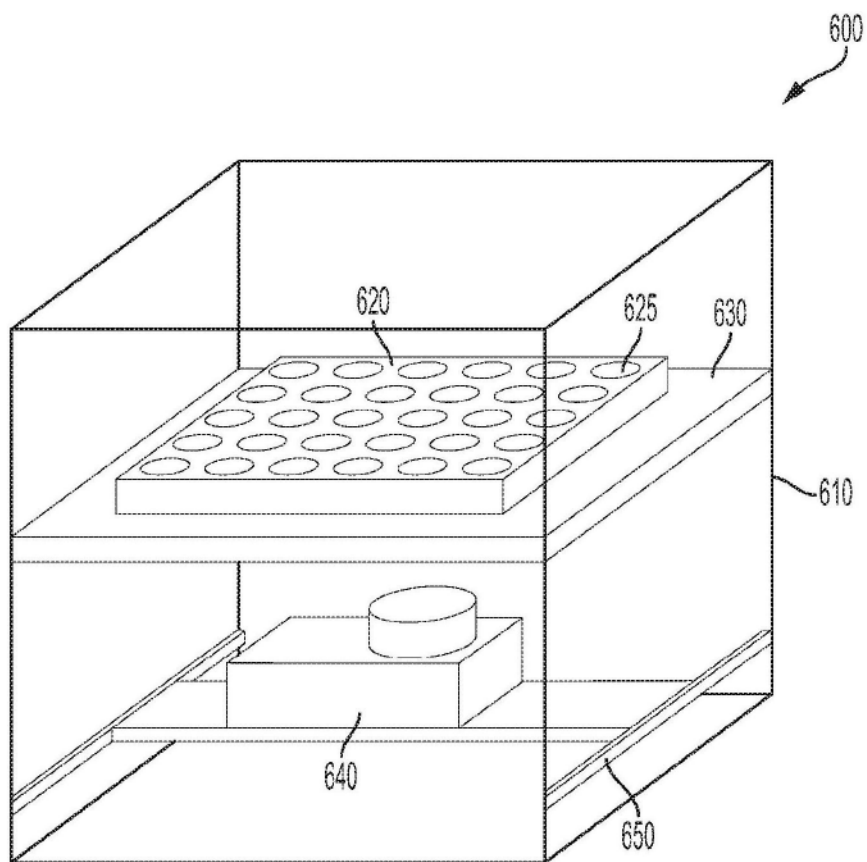


图6

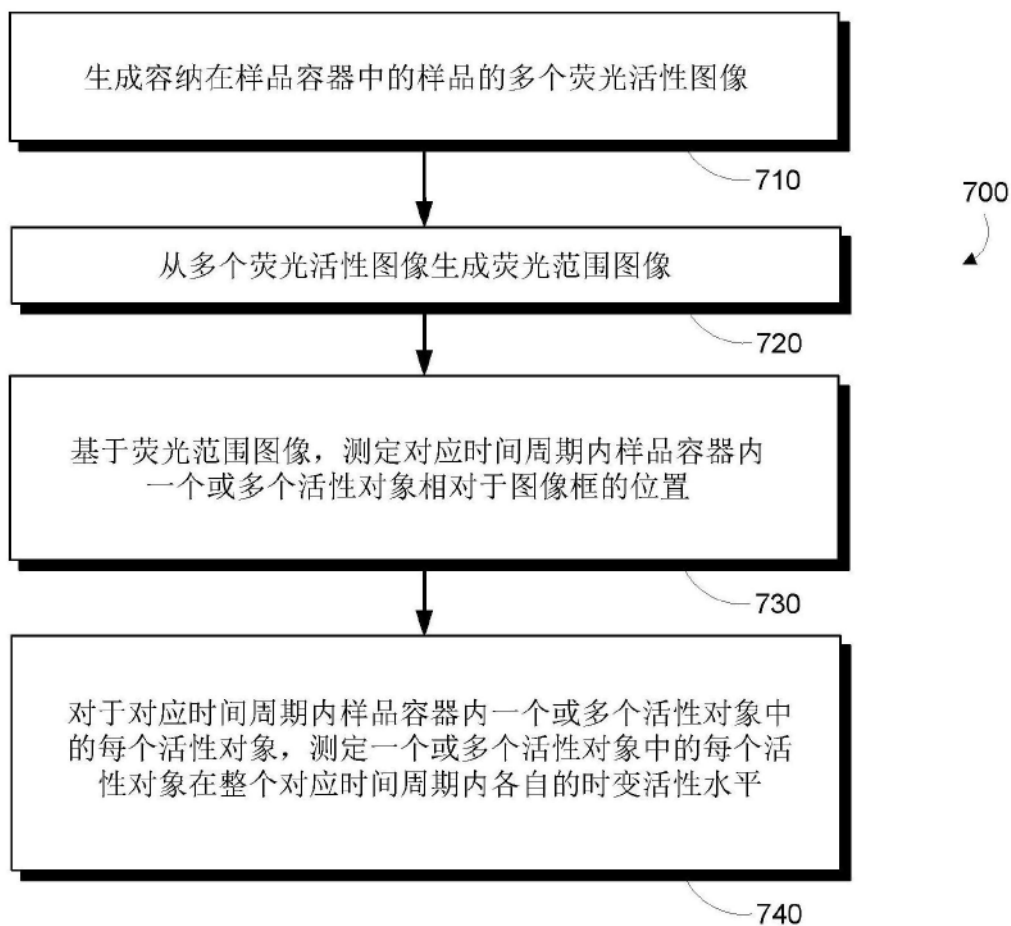


图7

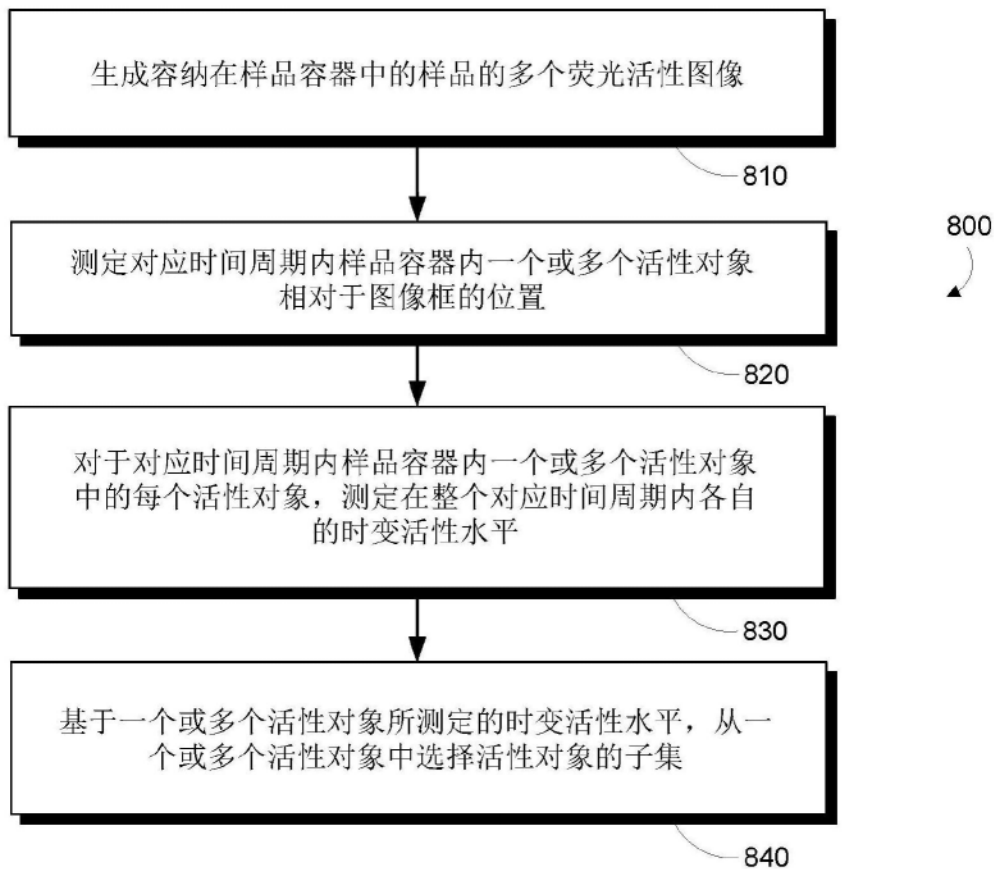


图8

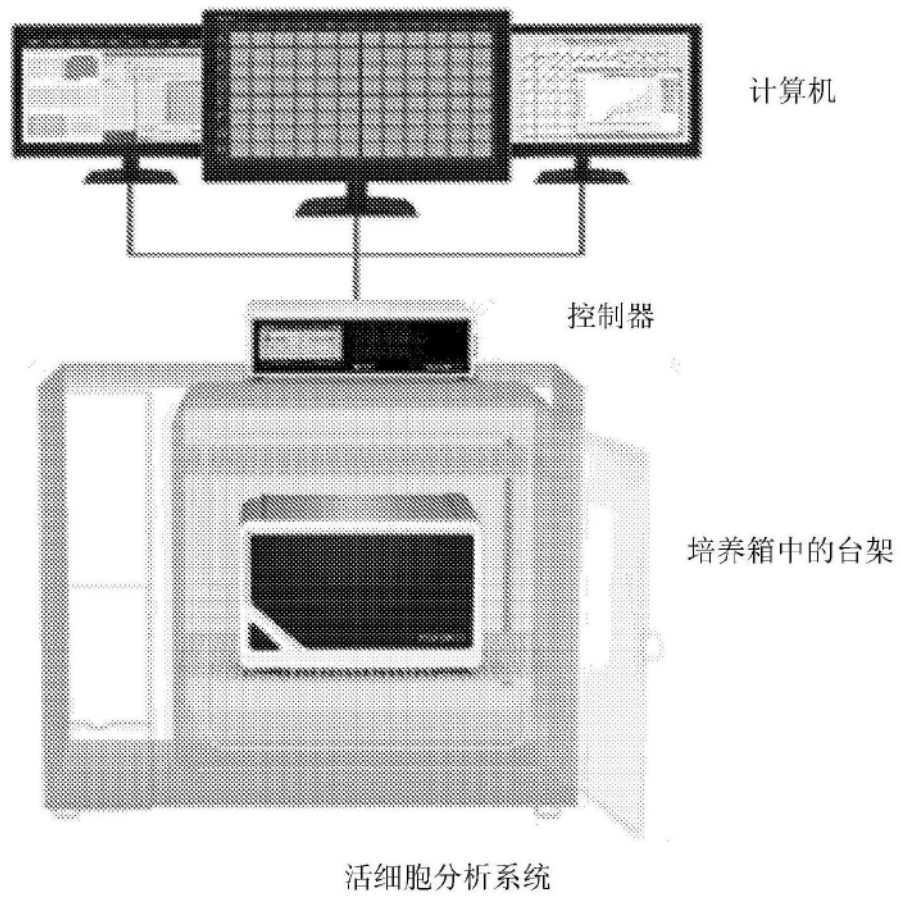
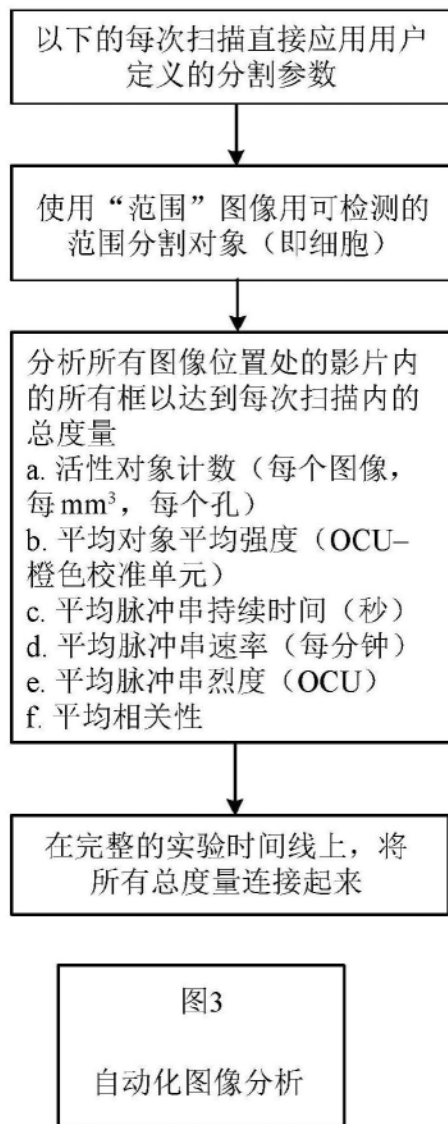


图9



图10



自动化图像分析

图11

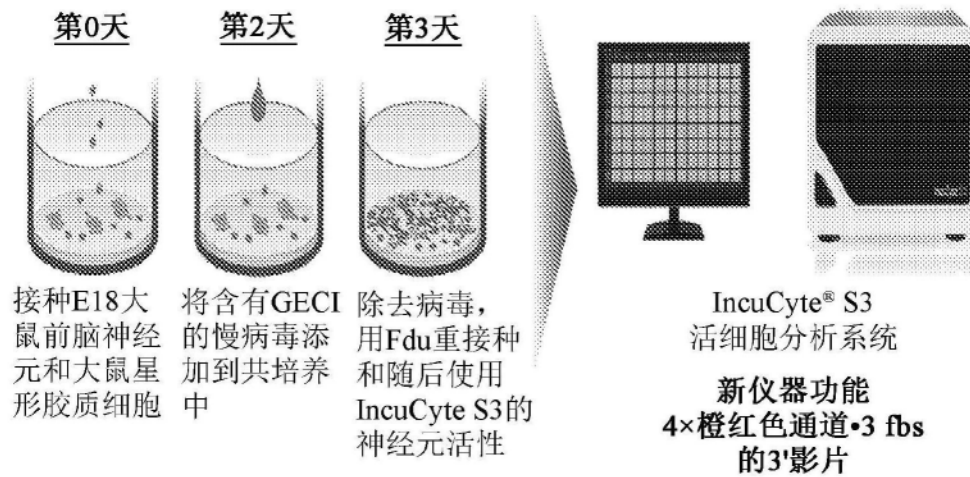
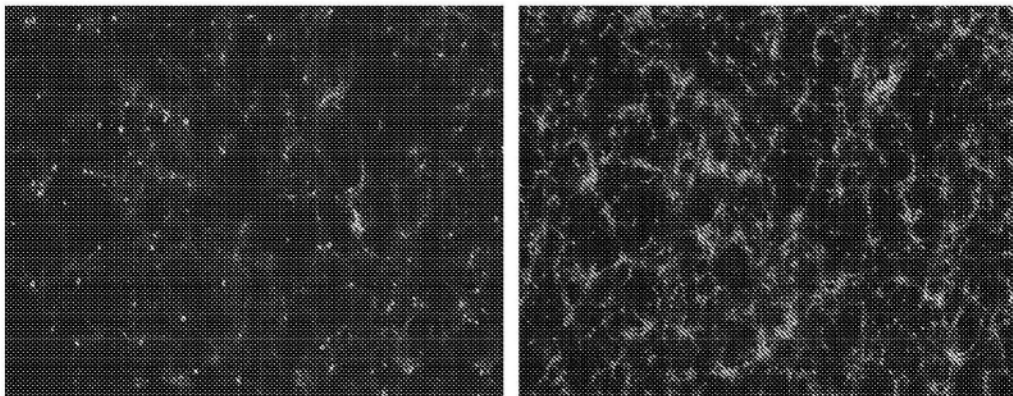


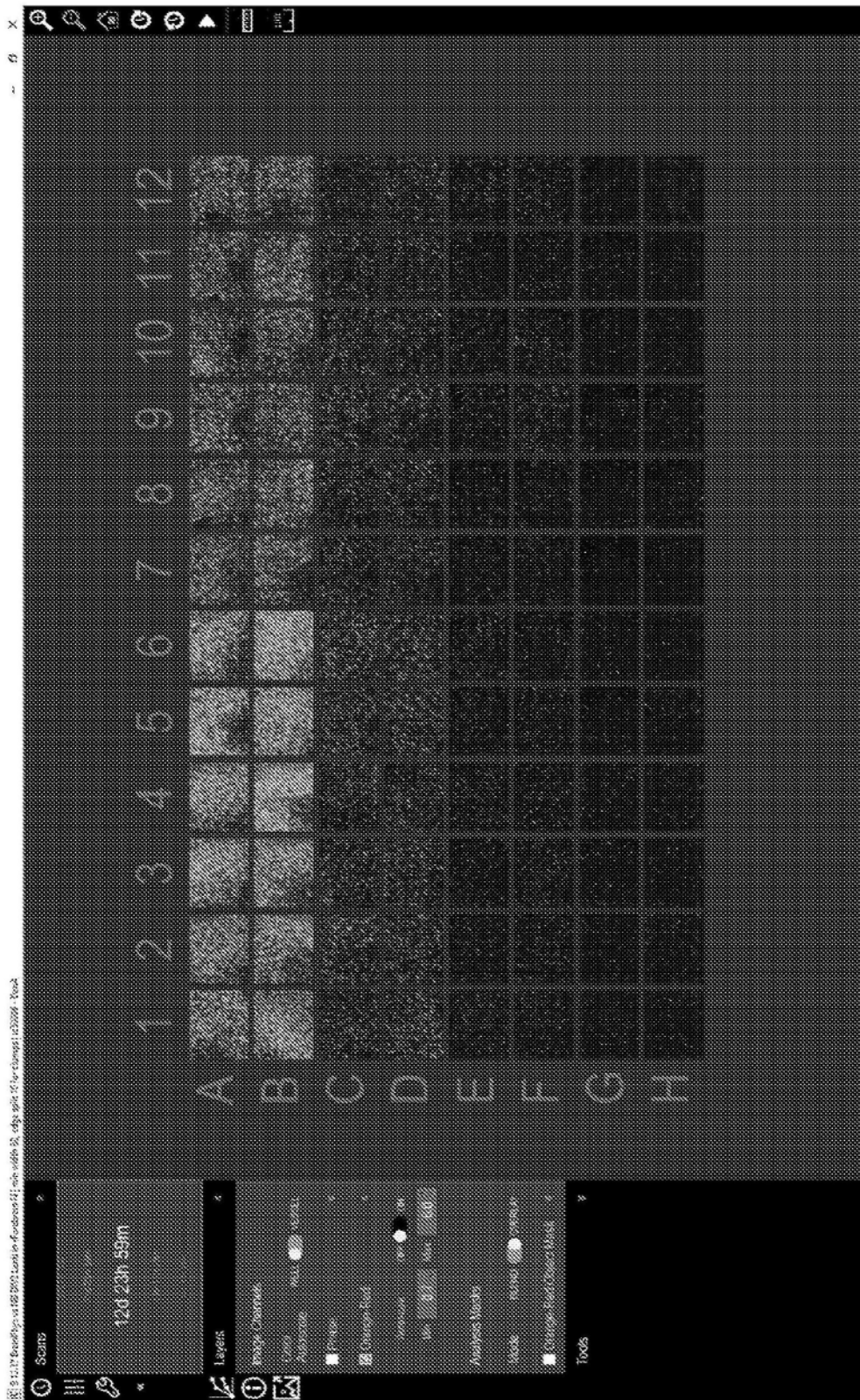
图12



自动化神经元活性分析和度量

使每个时间点的数据集可视化。荧光图像表示完整3'视频采集内的活性范围。迅速查看活性对象中的差异。内置分析工具便于典型生物学家进行数据分析。未分割范围图像（左）和分割范围图像（右）。

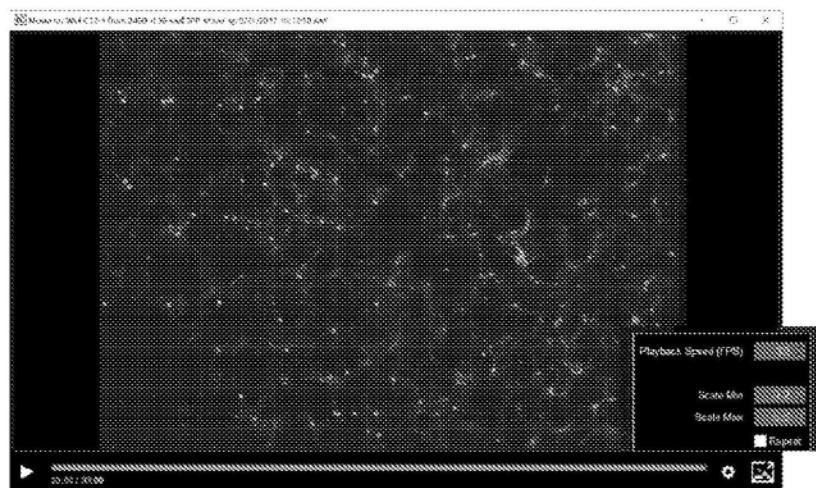
图13A



自动化神经元活性分析和度量

用户界面设计成使每个时间点的完整数据集可视化。荧光图像表示完整3分钟视频采集内的活性“范围”。迅速查看活性对象中的差异。

图13B

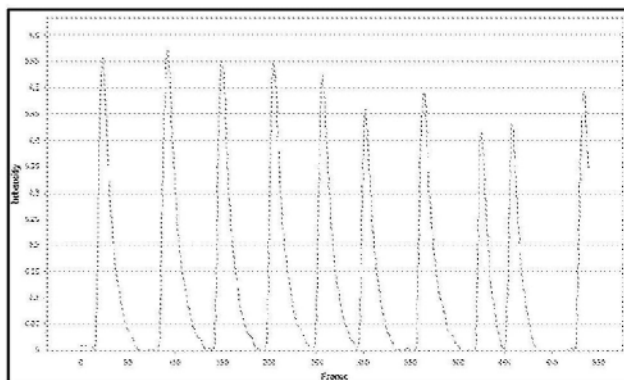


影片查阅和导出工具

为了简单、定性地查阅数据，将影片观看和导出工具整合到用户界面内。为了定性检查细胞形态学和培养卫生，也提供相差图像（图像未显示）。

图13C

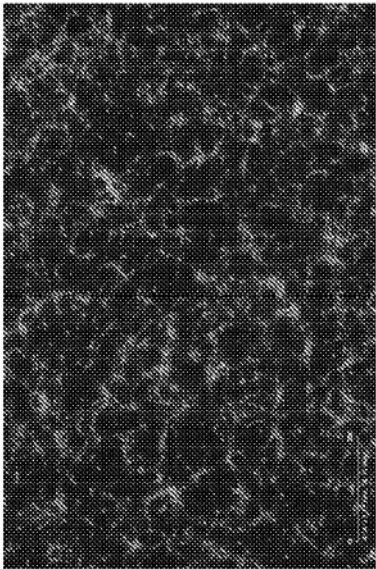
- 活性对象计数（每个图像）
 - 在3分钟扫描内至少突发一次的对象的数量
- 对象平均强度（OCU）
 - 总扫描时间内对象的平均强度
- 平均脉冲串烈度（OCU）
 - 总扫描时间内每个脉冲串下的面积除以脉冲串的持续时间
- 平均脉冲串持续时间（秒）
 - 总扫描时间内每个脉冲串的持续时间
- 平均脉冲串速率（脉冲串/分钟）
 - 总扫描时间内脉冲串数量
- 平均相关性（低=0，高=1）
 - 图像内每对对象的平均相关性（连接性）



自动化神经元活性分析和度量

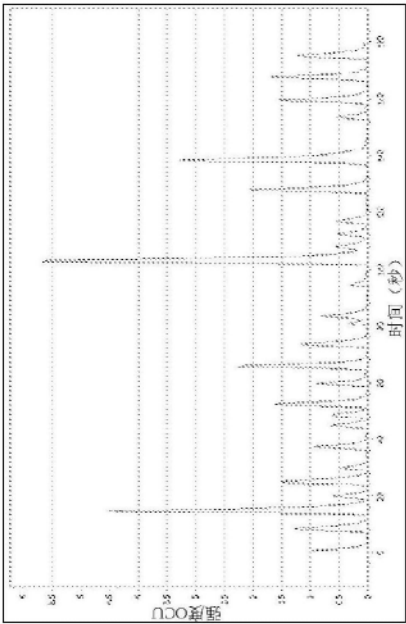
在每次计划扫描处设置高级度量描述。内置分析工具便于典型生物学家进行数据分析。

图13D



自动化神经元活性分析和度量
迅速查看活性对象中的差异。

图13E



自动化神经元活性分析和度量
迅速查看单个的对象（细胞）的活性迹线中的差异。

图13F

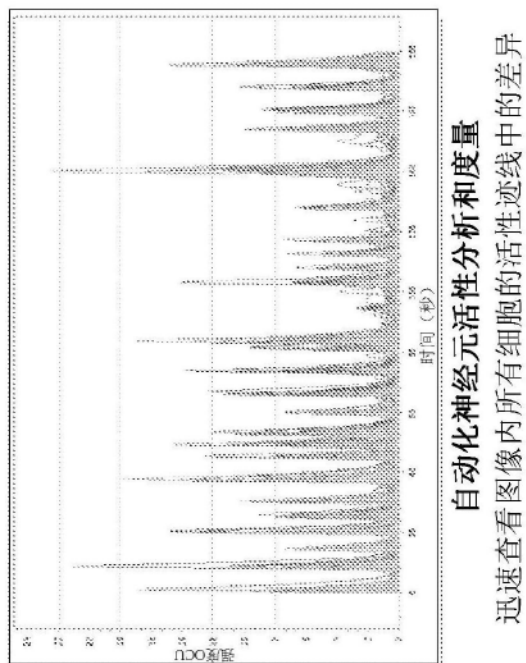
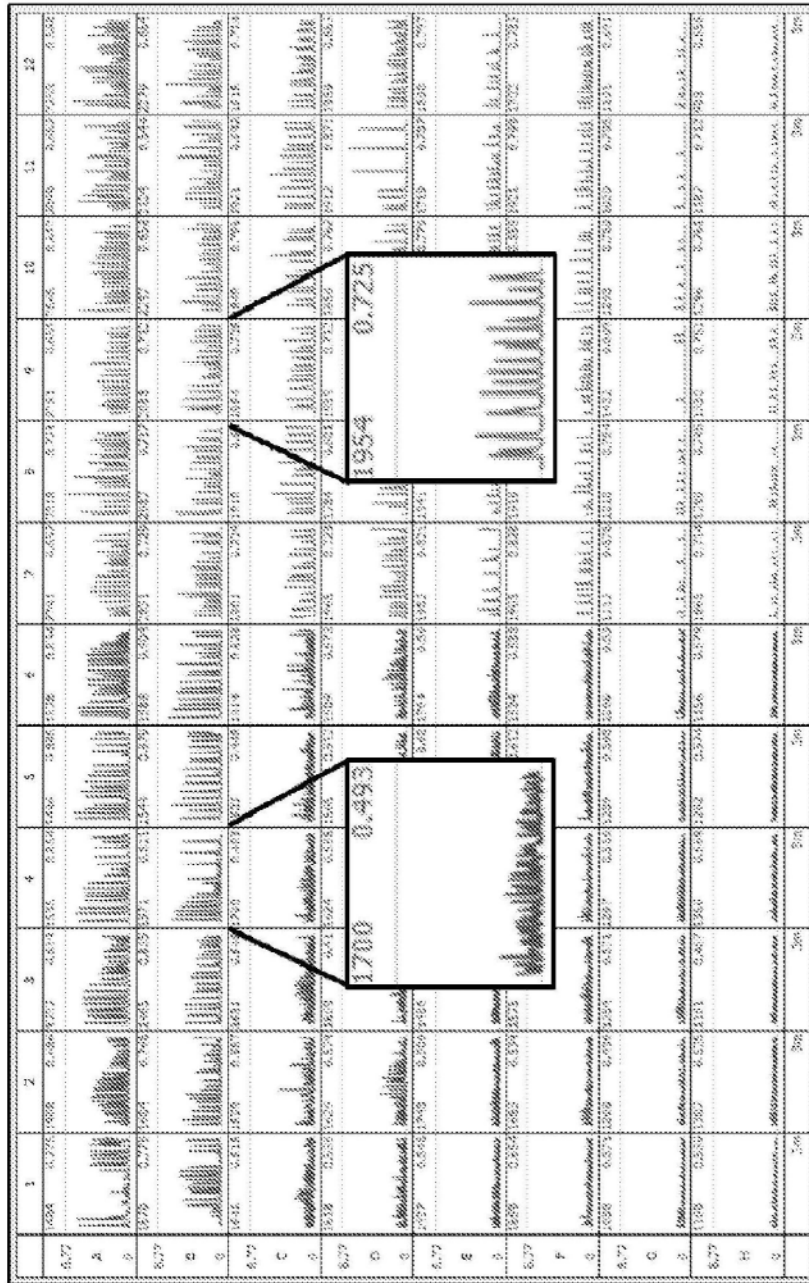


图13G

总迹线—3分钟内地平均强度

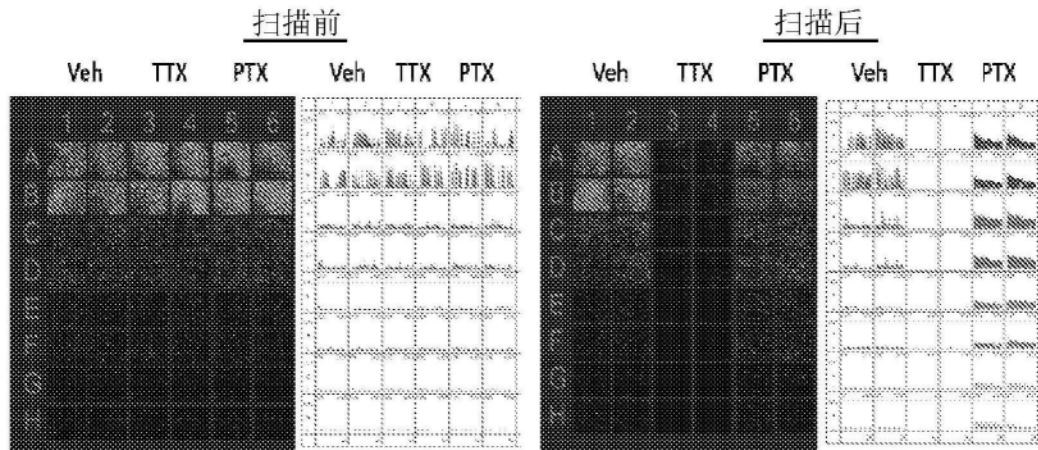


全孔平均强度的总迹线提供数据的完整板视图以及活性对象#和平均相关性度量

在每次扫描后，用户可以在这个96孔微孔表示的数据中绘制出全部对象的平均强度。在每个孔位置的左上角可以找到衍生出这些数据的活性对象的数量，同时可以在右上角找到平均相关性（连接性/同步性的测量）。每个孔位置的X轴是时间（总扫描时间3分钟），而Y轴描述的是孔内所有测量对象的平均荧光强度。

图13H

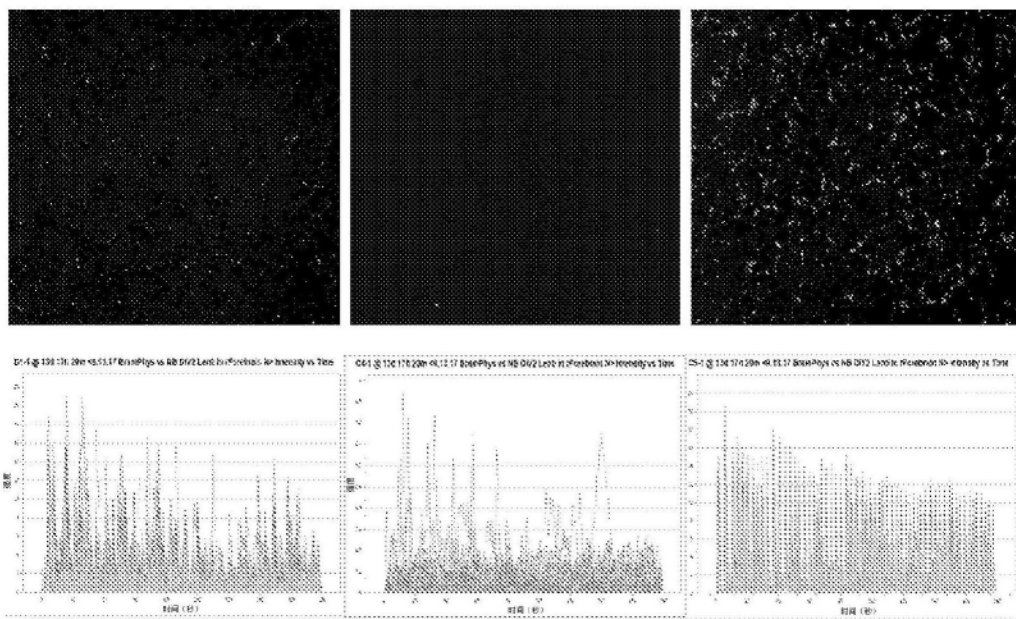
印防己毒素和河豚毒素对E18大鼠前脑神经元的药理作用



用河豚毒素 (TTX, $1 \mu\text{M}$) 或印防己毒素 (TTX, $100 \mu\text{M}$) 的终点药理。PTX治疗提高脉冲串速率和相关性 (连接性)。TTX治疗显著降低所有测量的度量, 表明所测量的活性由突触驱动

图13I

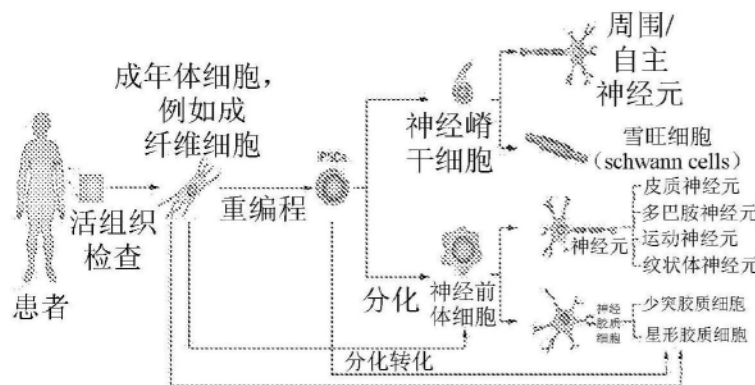
印防己毒素和河豚毒素对E18大鼠前脑神经元的药理作用



用河豚毒素 (TTX, $1 \mu\text{M}$) 或印防己毒素 (TTX, $100 \mu\text{M}$) 的终点药理。PTX治疗提高脉冲串速率和相关性 (连接性)。TTX治疗显著降低所有测量的度量, 表明所测量的活性由突触驱动

图13J

iPSC衍生的神经元提供了能够使用人类疾病模型进行研究的希望

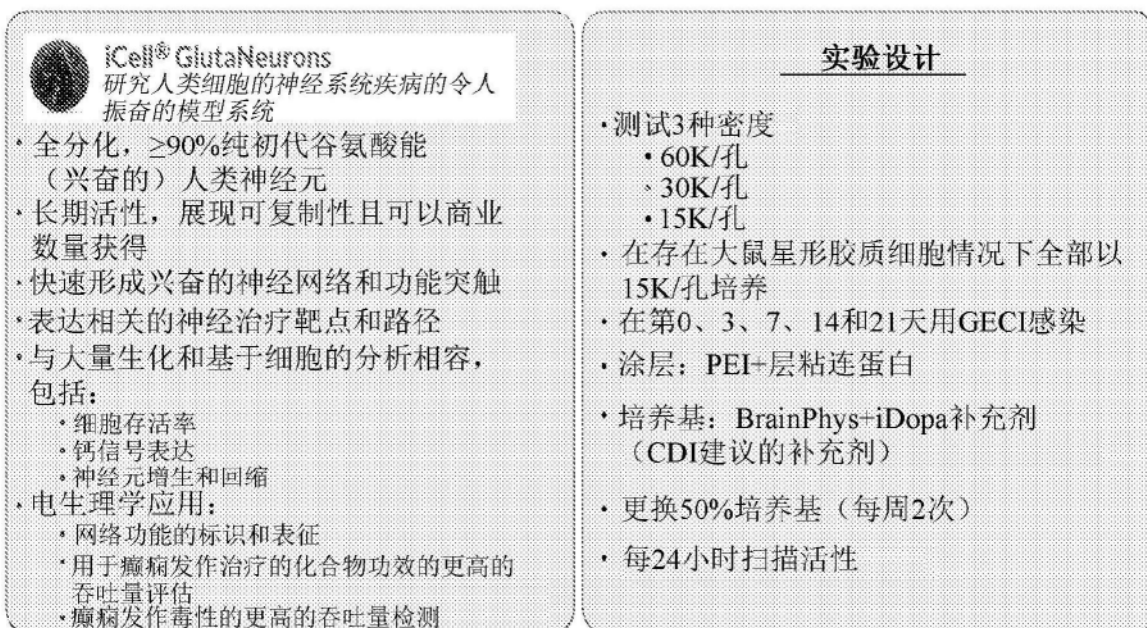


《自然综述》(Nature Review) | 《神经学》(Neurology)

- 仅在10年前第一次重编程成功
- 分化协议仍在深入开展多种神经元类型的分化工作
- 表征所得细胞的是狂野西部 (wild west)
 - 神经元?
 - 类神经元?
- 表面标记意义不大
- 常见问题:
 - 你们如何培养那些细胞?
 - 你们使用什么培养基?
 - 你们使用的涂层是什么?
 - 共培养吗? 如何进行呢?

这些模型还不是很成熟。本发明的系统和方法提供分析这类模型的分析工具以提供它们的表征和改良。

图14



iCell GlutaNeurons的实验设计

图15

iCell GlutaNeuron自发活动力学分析-在本次30天的实验过程中观察到iCell GlutaNeuron中平均脉冲串速率的显著变化

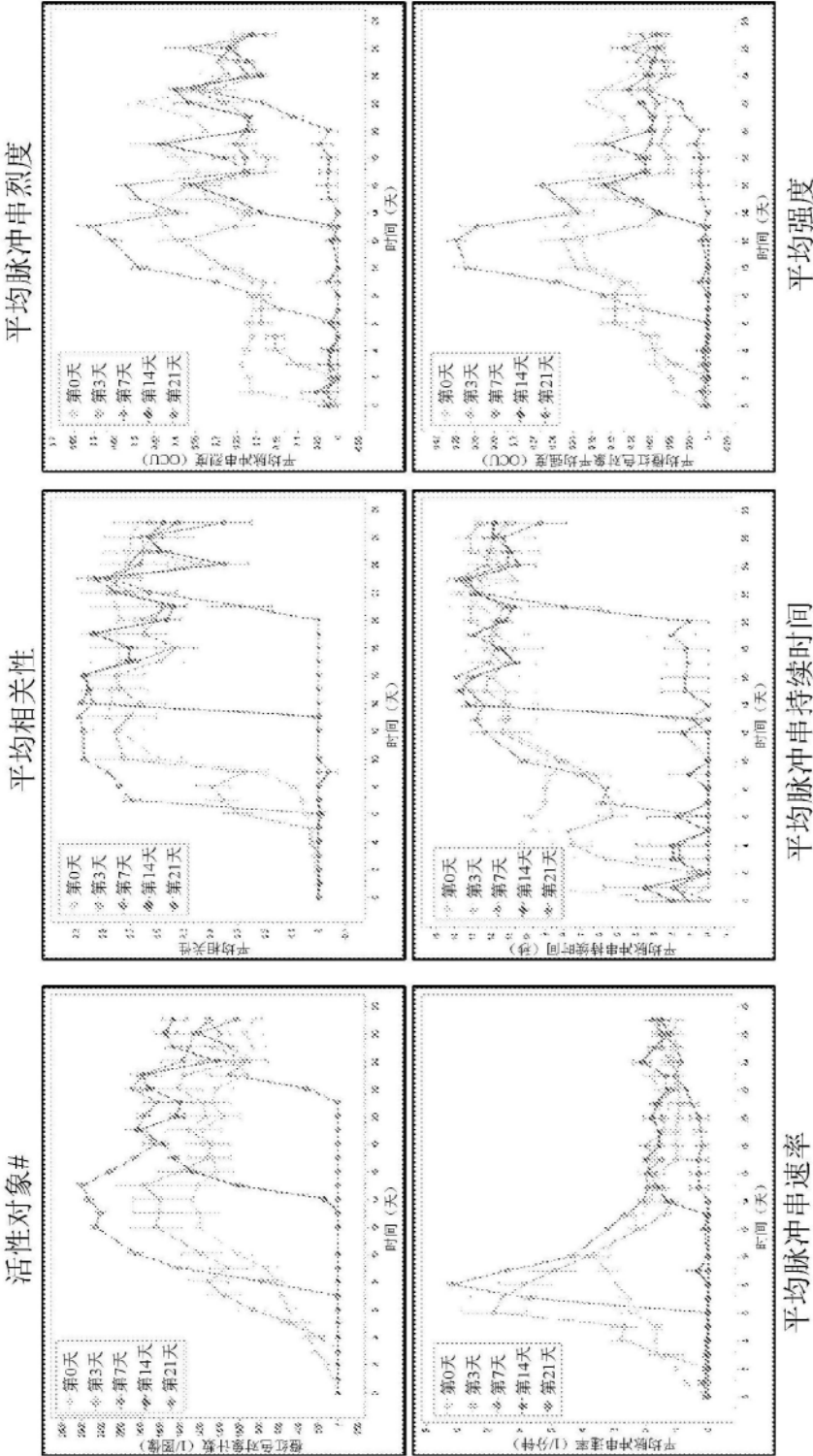
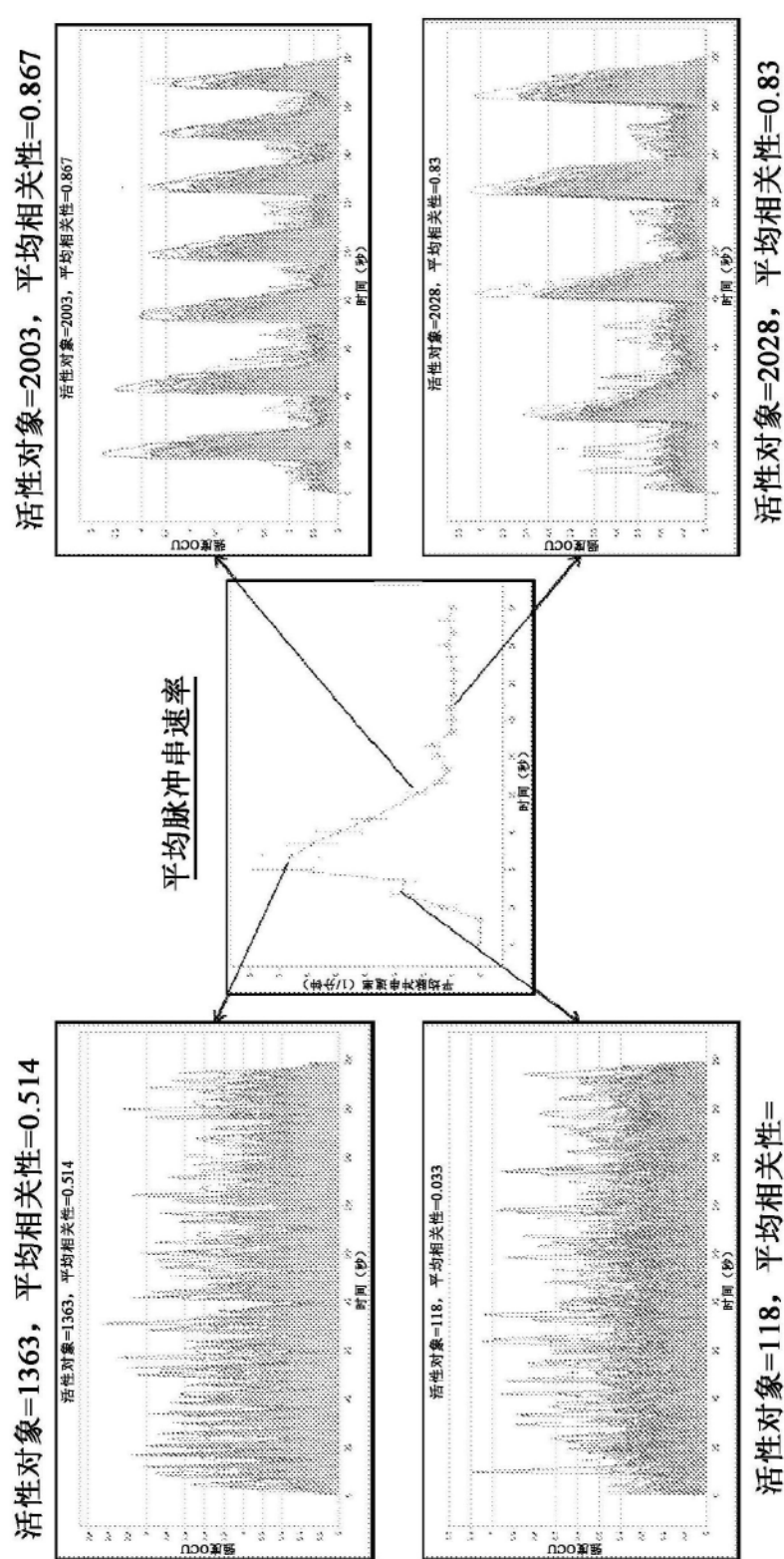


图16A

来自细胞动力学国际公司的iCell GlutaNeuron以30,000个细胞/孔接种，其中共培养的大鼠星形胶质细胞以15,000个细胞/孔接种在涂有PEI/层粘连蛋白的96孔培养盘上。在第3天或第21天用GECI试剂感染神经元，并对自发神经元活性进行持续27天的监测和分析。自动化量化度量包括：活性对象#、平均相关性、平均脉冲串强度、平均脉冲串速率和平均脉冲串持续时间 $N \geq 3$ 。没有发现在第3天和第21天GECI感染后的时间点之间的度量差异。无论在转导的第几天（第0天或第21天），在培养的第30天观察到相同的活性和相关性度量。这些结果表明，GECI本身的存在（表达近30天）不显著影响这些细胞的活性。

iCell GlutaNeuron自发活性动力学分析



整个实验的第3天的GECI感染的所有活性对象/孔的实例迹线图以突出随时间推移活性（迹线）的差异。还注意到相关活性的差异（在早期的时间点不相关，在后期的时间点较相关）。脉冲串速率的变化是意料之外的。显然，这对何时进行实验有很大的影响。

图16B

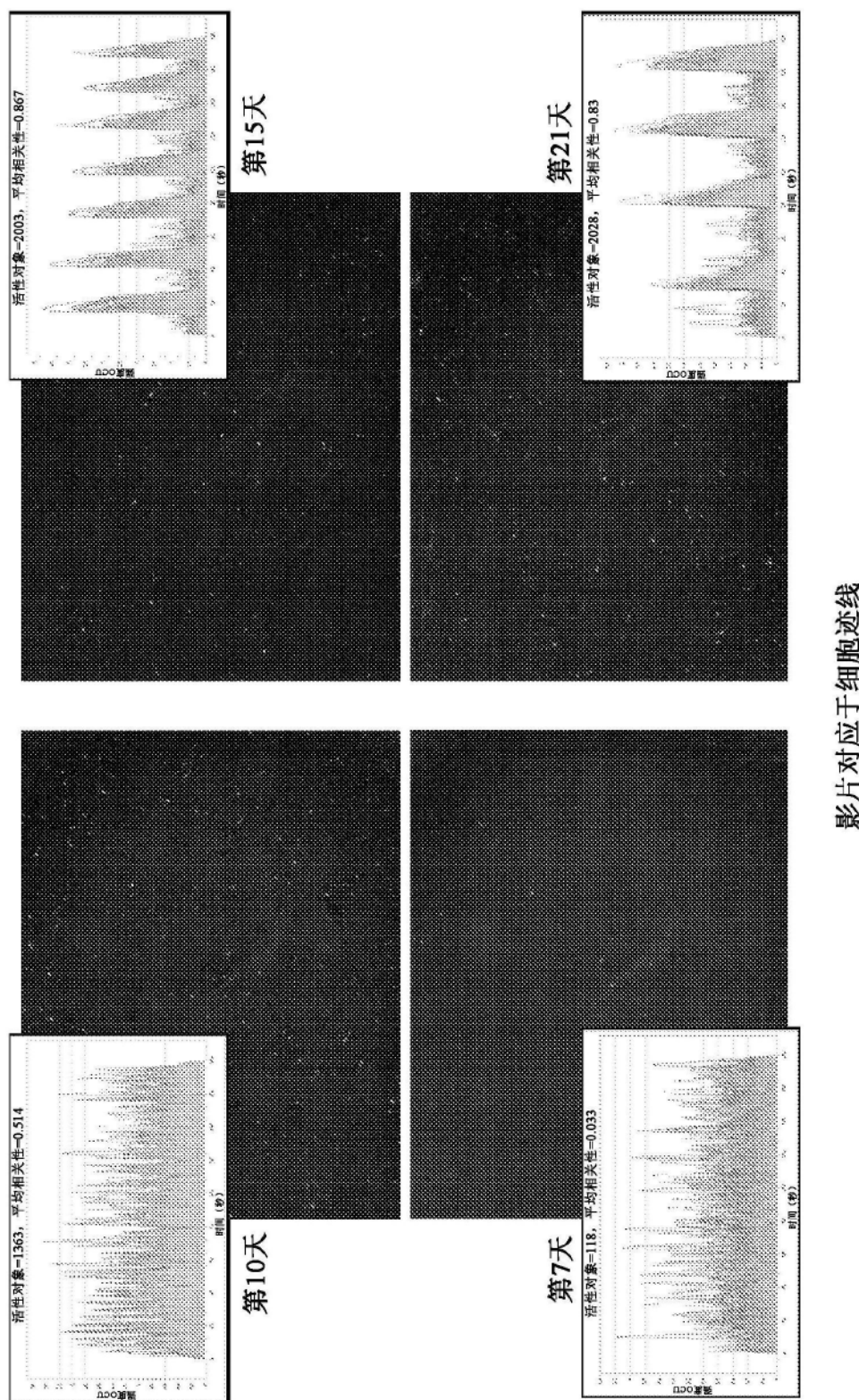
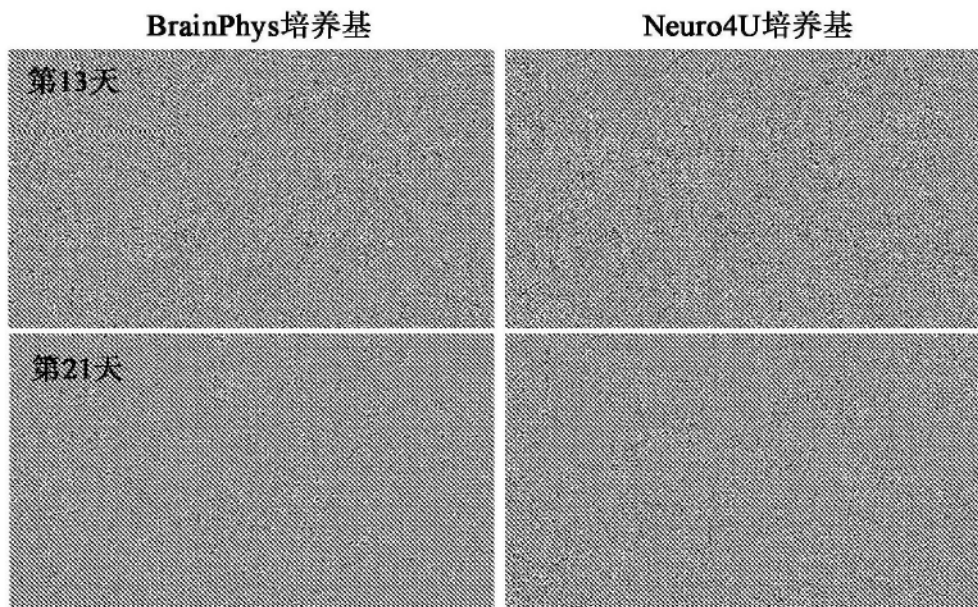


图16C

总结-iCell GultaNeuron

- ✧ 最佳的感染时间是接种后2天以上
- ✧ iCell GlutaNeuron迅速具有活性，并在培养12天内接近完成相关
- ✧ GECI的长期表达似乎并没有改变网络活性或连接性的发展
- ✧ 脉冲串速率随时间推移发生显著变化
- ✧ （数据未显示）-iCell GABANeuron在同一时间框内显示活性然而，在单细胞培养或20天的共培养中未观察到连接性

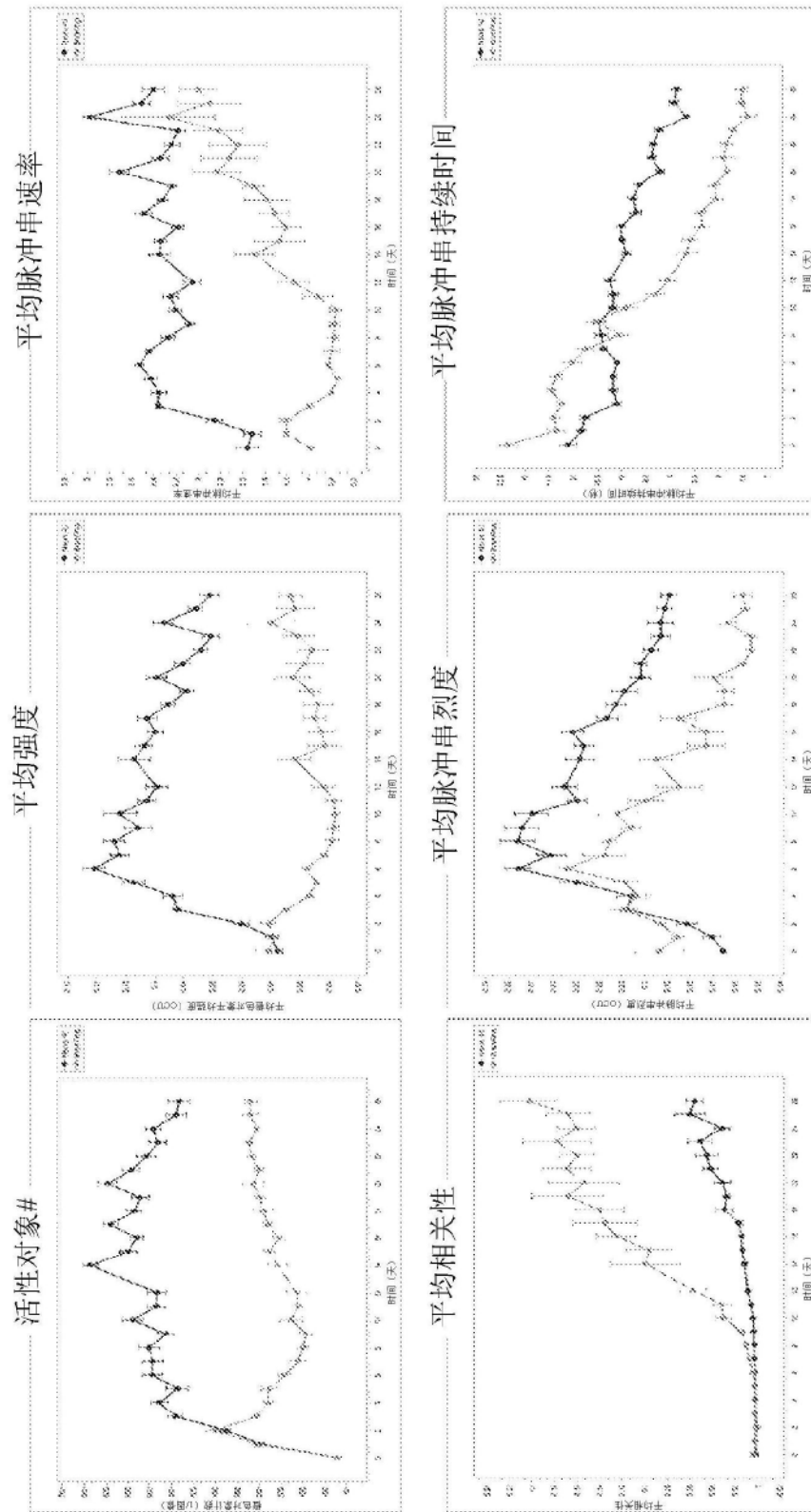
图16D



来自Ncardia的Peri_4U神经元以25,000个细胞/孔接种，其中共培养的大鼠星形胶质细胞以15,000个细胞/孔接种在PEI/层粘连蛋白涂层上。在第2天用GECI试剂感染神经元，并在BrainPhys培养基或Neuro_4U培养基中培养。在第13天或第21天细胞形态不受培养基差异的影响

Peri_4U形态学+自发活性分析

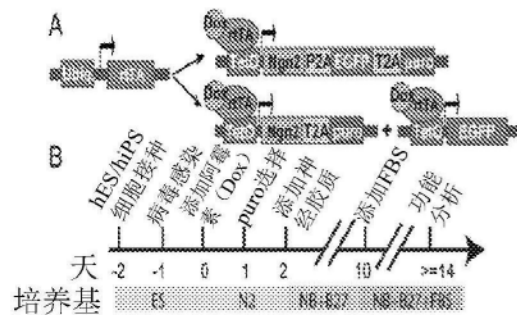
图17A



在整个实验中量化自发活性的度量。n≥3。除了平均相关性，所有分析的度量在Neuro 4U培养基中都有增加

Peri_4U形态学+自发性分析

图17B



《神经学》2013年6月5日；78(5): 785-798.
Doi:10.1016/j.neuron.2013.05.029

- 测试细胞稳定表达GECI
- 测试用GECI转导的细胞的几种密度和病毒MOI
- 接种细胞，允许分化7天，然后用GECI转导
- 在存在大鼠星形胶质细胞的情况下全部以15K/孔培养
- 涂层：基质胶
- 2种培养基：BrainPhys和3N+SMI补充剂
 - 在有或无生长因子（GF）的情况下生长
- 更换50%培养基（每周2次）
- 每24小时扫描活性

在iNeuron中也进行了活性测量

图18A

iNeuron 的活动取决于培养基条件和生长因子补充剂

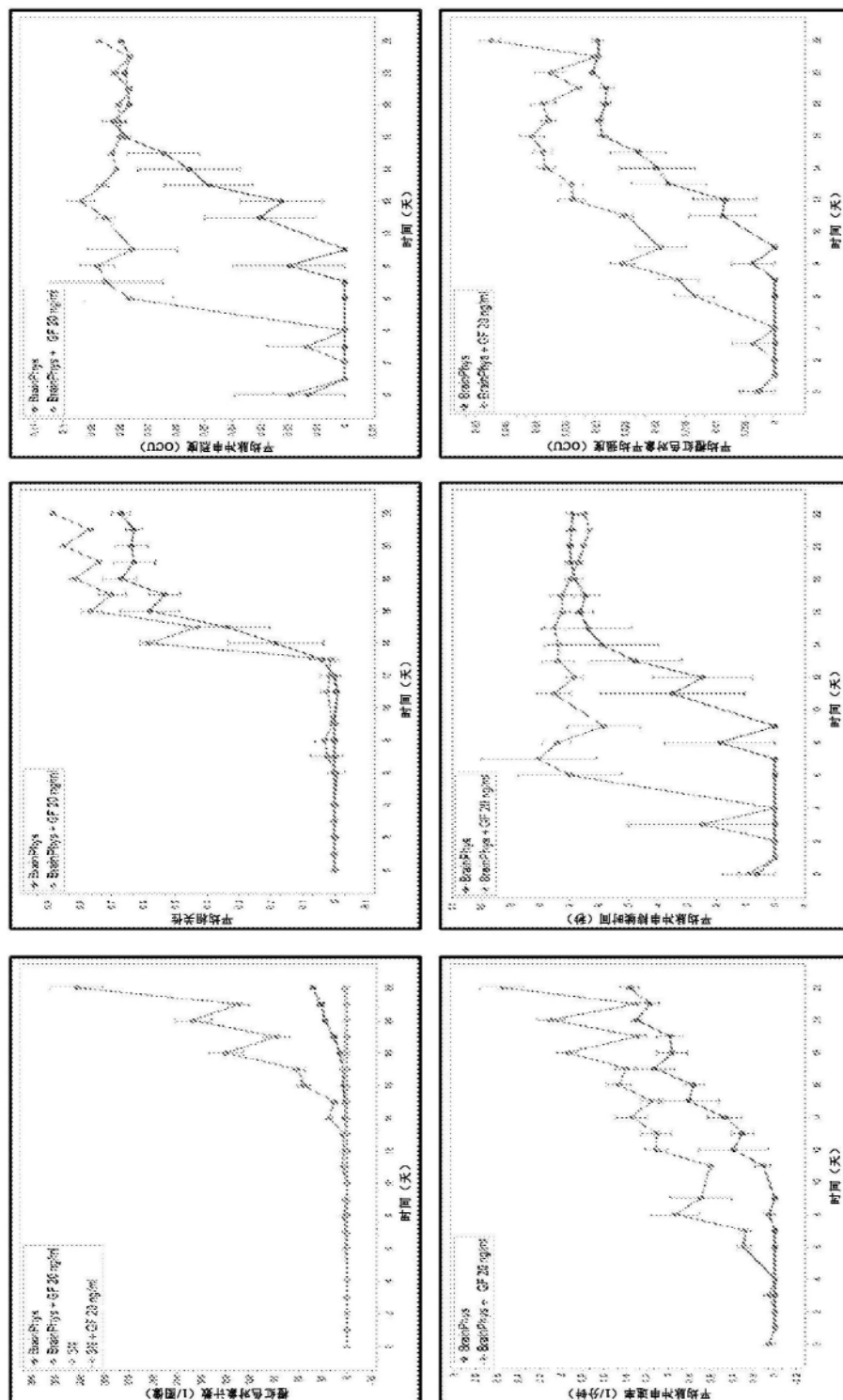


图18B

在3N培养基中培养的细胞中，无论FGF2是否存在，都没有检测到任何活性，这是非常令人惊讶的。如果你看看培养物（下一张幻灯片），显然在3N中培养的细胞中有一个神经元的复杂网络，但没有检测到活性。这确实是神经元长度/复杂性的结构测量与功能活性不相关的一个很好的实例。

此数据也说明了生长因子的存在可以对神经元活性有显著的影响，因为用FGF2培养的细胞比在没有FGF2的情况下培养的相同细胞更快地具有活性。

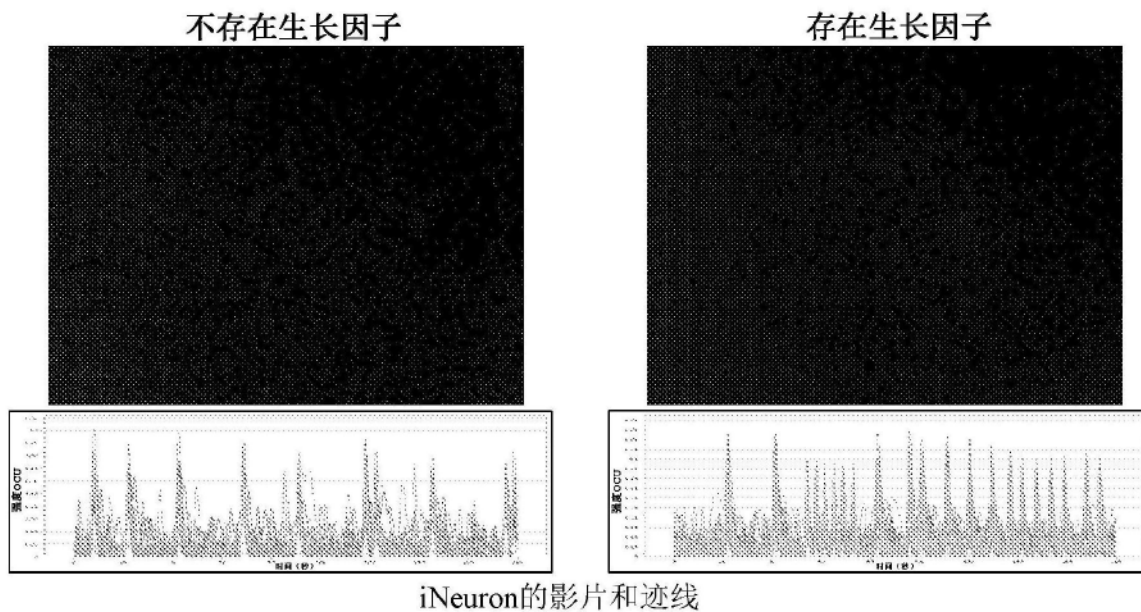
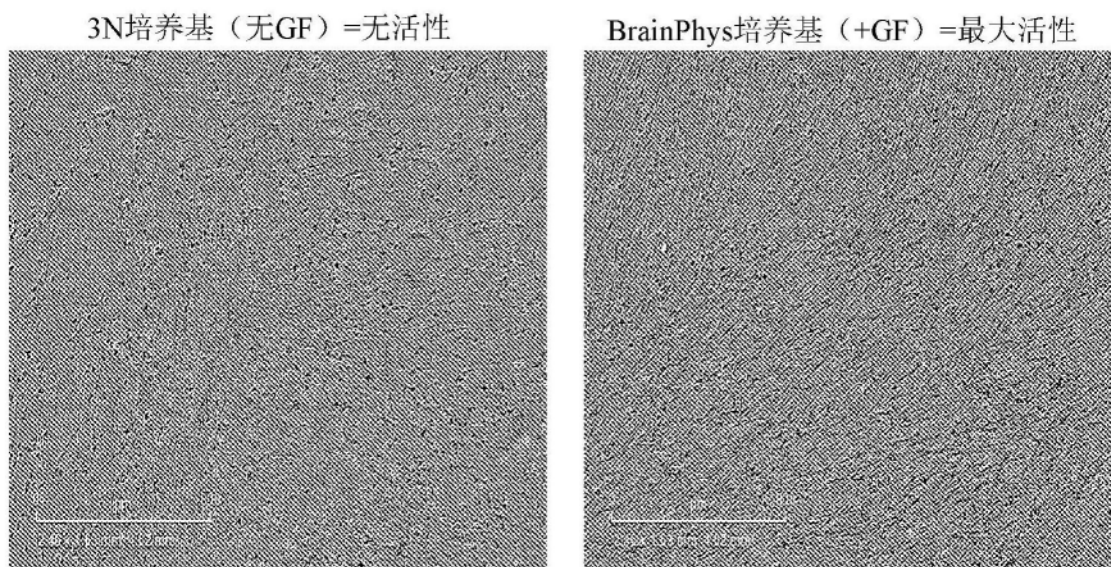


图18C



3N培养基中培养的iNeuron与BrainPhys的相差图像

如前所述，在3N中生长的细胞是健康的，且显示出显著的网络复杂性。然而，使用这些方法没有检测到活性的测量

图18D

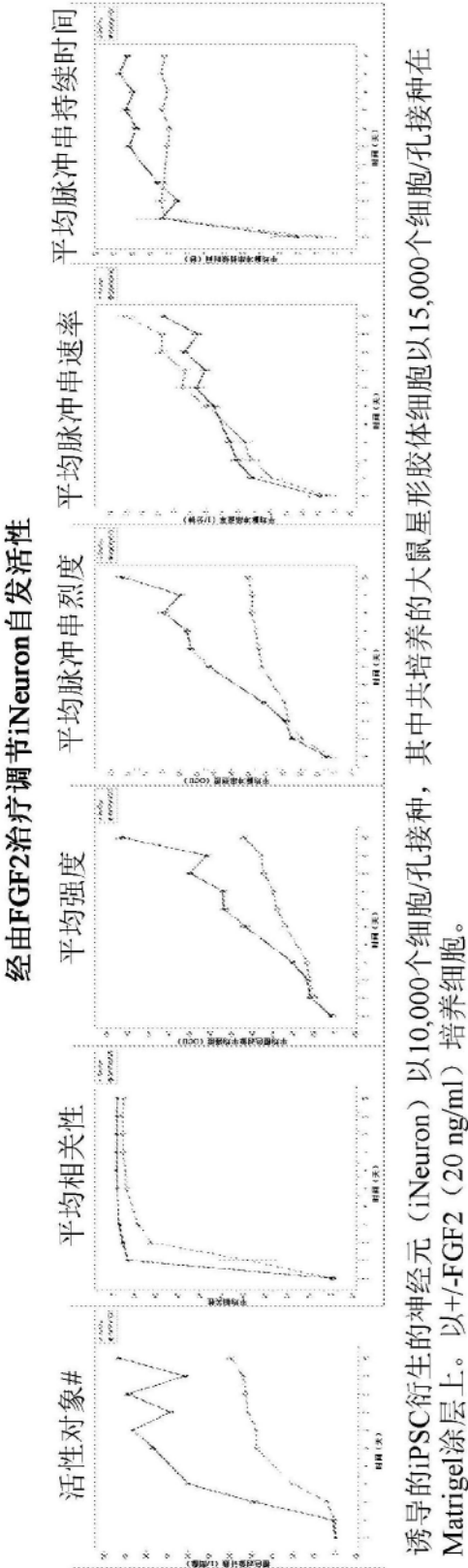


图18E

总结-iNeuron

- ※ 直到第14天（或以后）才发现显著活性
- ※ 在3N培养基中没有检测到活性；需要BrainPhys
- ※ “生长因子”的存在对网络动力学的成熟以及所有活性度量有显著和深刻的影响
- ※ “生长因子”的存在对连接性的影响较小，即一旦细胞变得活跃，它们大多是相关/同步的。
- ※ 复杂神经元形态的存在并不能预测活性
- ※ *在lenti GECI模型中重复实验，结果类似

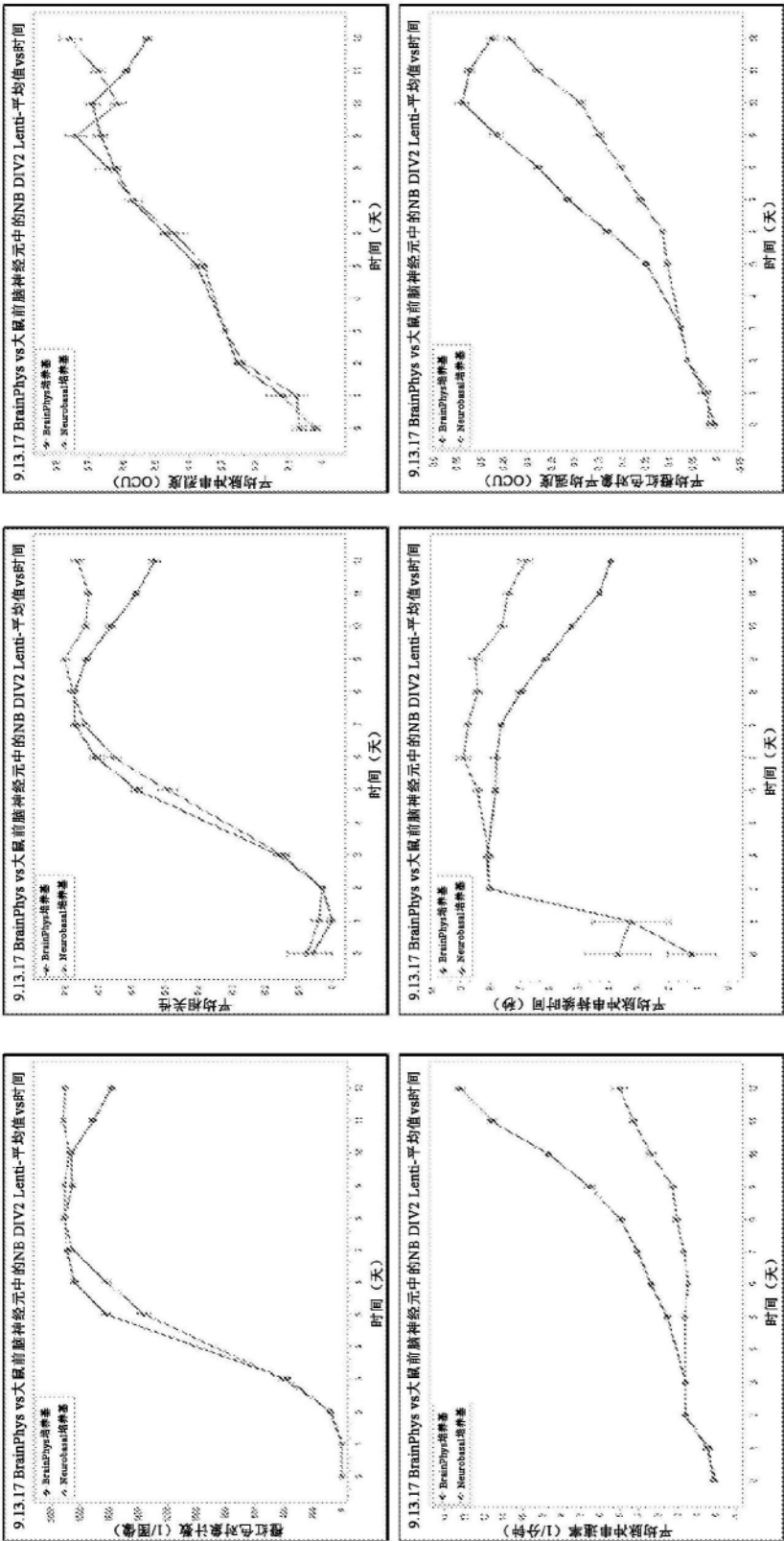
图18F

组	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	大鼠前脑神经元 (1) 40K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 50K/孔 DIV2感染 BrainPhys培养基 80 μL GECI											
B	大鼠前脑神经元 (1) 20K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 15K/孔 DIV2感染 BrainPhys培养基 40 μL GECI											
C	大鼠前脑神经元 (1) 20K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 15K/孔 DIV2感染 Neurobasal培养基 40 μL GECI											
D	大鼠前脑神经元 (1) 10K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 15K/孔 DIV2感染 BrainPhys培养基 20 μL GECI											
E	大鼠前脑神经元 (1) 10K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 15K/孔 DIV2感染 Neurobasal培养基 20 μL GECI											
F	大鼠前脑神经元 (1) 5K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 15K/孔 DIV2感染 BrainPhys培养基 10 μL GECI											
G	大鼠前脑神经元 (1) 5K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 15K/孔 DIV2感染 Neurobasal培养基 10 μL GECI											
H	大鼠前脑神经元 (1) 5K/孔 大鼠星形胶质细胞 (2) 15K/孔 DIV2感染 Neurobasal培养基 10 μL GECI											

- 测试4种密度
 - 40K/孔
 - 20K/孔
 - 10K/孔
 - 5K/孔
- 在存在大鼠星形胶质细胞情况下全部以15K/孔培养
- 涂层: PDL
- 2种培养基: BrainPhys (蓝色) 和 Neurobasal (红色) +SMI补充剂
- 更换50%培养基 (每周2次)
- 每24小时扫描活性

E18大鼠前脑神经元的密度优化

图19

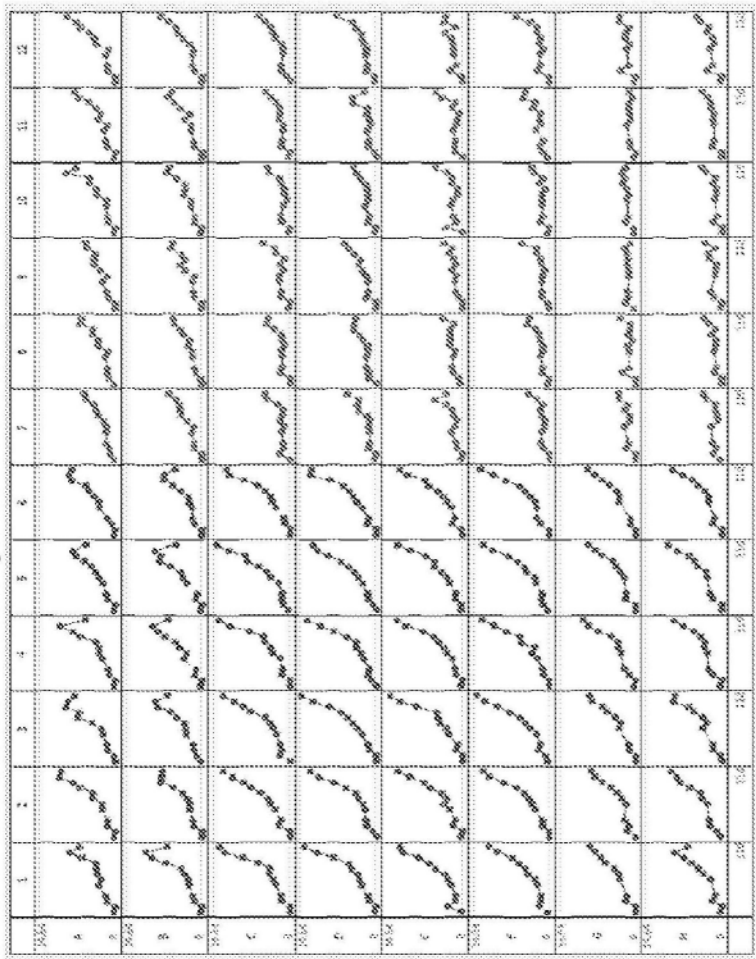


生长培养基 (neurobasal vs. BrainPhys) 对共培养的E18大鼠前脑神经元活性的影响

观察到对活性对象的数量、平均脉冲串强度和相关的性的影响很小。在这15天的分析过程中，观察到对脉冲串持续时间、脉冲串速率和平均强度的影响更显著。

图20

E18大鼠前脑数据总结
脉冲串速率-BrainPhys (蓝色) vs Neurobasal (红色)



- 除了最大的细胞密度仅观察到最小的差异外，在BrainPhys中培养的细胞中检测到的脉冲串速率显著高于在Neurobasal中培养的同细胞
- 脉冲串持续时间也受到类似的影响，但方向相反，因此在这两个测试条件下，整体活性相似
- PTX治疗增加脉冲串速率和相关性，减少脉冲串持续时间
- TTX治疗显著降低所有测量的度量

96孔微板视图说明了整个11天的实验过程中从孔到孔的测量的一致性。X轴以天为单位（从第0天到第11天.....每个标记表示一次扫描）。Y轴表示脉冲串速率。在BrainPhys中培养的细胞脉冲串速率比那些在neurobasal中培养的细胞高。此观察与细胞密度无关。

图21

多种类型的神经元

细胞	类型	设置	供应商	分化	优选培养基	r: 相关性>0.5*
大鼠E18前脑	初代	共培养	赛默飞世尔/全球干细胞有限公司	无	BrainPhys或NB	7天
iCell GlutaNeurons	iPSC	单培养和共培养	CDI	未知	BrainPhys	7天
iCell GABA Neurons	iPSC	单培养和共培养	CDI	未知	BrainPhys	??
iCell DopaNeurons	iPSC	共培养	CDI	未知	BrainPhys	12-15天
MyCell DopaNeurons (A53T)	iPSC	共培养	CDI	未知	BrainPhys	12-15天
Peri.4U	iPSC	共培养	Ncardia	未知	Ncardia	>30天??
CNS.4U	iPSC	共培养	Ncardia	未知	Ncardia	32-34天
iNeurons	iPSC	共培养	Academic	Neurogenin2	BrainPhys	16-20天

图22