(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 10 月 8 日 (08.10.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/199328 A1

(51) 国际专利分类号:
G01N 21/64 (2006.01) *C08F 220/56* (2006.01)
C08J 3/075 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/088308

(22) 国际申请日: 2019 年 5 月 24 日 (24.05.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201910246600.9 2019年3月29日 (29.03.2019) CN

(71) 申请人: 华中科技大学(HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY) [CN/CN]; 中国湖北省武汉市洪山珞喻路1037号, Hubei 430074 (CN)。

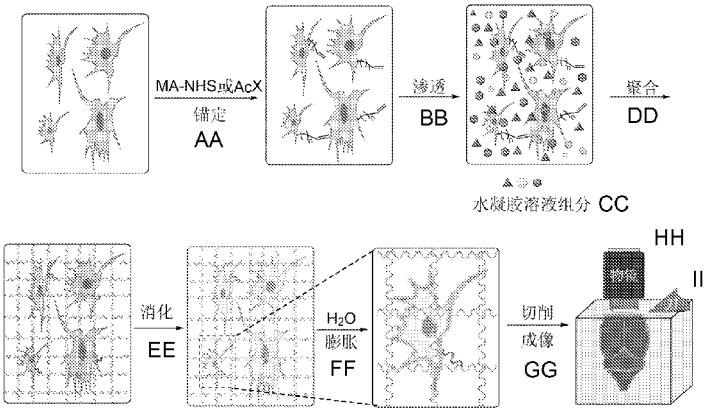
(72) 发明人: 骆清铭(LUO, Qingming); 中国湖北省武汉市洪山珞喻路1037号, Hubei 430074 (CN)。 曾绍群(ZENG, Shaoqun); 中国湖北省武汉市洪山珞喻路1037号, Hubei 430074 (CN)。 陈瑞希(CHEN, Ruixi); 中国湖北省武汉市洪山珞喻路1037号, Hubei 430074 (CN)。 刘秀丽(LIU, Xiuli); 中国湖北省武汉市洪山珞喻路1037号, Hubei 430074 (CN)。 杨雄(YANG, Xiong); 中国湖北省武汉市洪山珞喻路1037号, Hubei 430074 (CN)。

(74) 代理人: 华中科技大学专利中心 (HUAZHONG UNIVERSITY OF SCIENCE AND TECHNOLOGY PATENT AGENCY CENTER); 中国湖北省武汉市洪山区珞瑜路1037号华中科技大学东一楼340室, Hubei 430074 (CN)。

(81) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX,

(54) **Title:** METHOD FOR EXPANSION, CUTTING, AND MICROSCOPIC IMAGING AND SUPERABSORBENT HYDROGEL APPLICABLE IN THE METHOD

(54) **发明名称:** 膨胀切削显微成像方法及适用于该方法的超吸水水凝胶



AA MA-NHS or AcX anchoring
BB Permeation
CC Hydrogel solution components
DD Aggregation
EE Digestion
FF H_2O expansion
GG Cutting and imaging
HH Object lens
II Blade

图 1

(57) **Abstract:** A method for expansion, cutting, and microscopic imaging and a superabsorbent hydrogel applicable in the method. The method is: applying an expansive substance to a biological tissue to be imaged, under the effect of the expansive substance, allowing the biological tissue to expand into an expanded tissue of which the hardness is no less than 15 kPa, and then, combined with mechanical cutting, cutting and imaging the expanded tissue, thus implementing three-dimensional expansion, cutting, and microscopic imaging of the biological tissue, and implementing three-dimensional super-resolution imaging. The method, by controlling the requirement on the hardness of the biological tissue under the effect of the expansive substance, combined with a subsequent process of repeated cutting-imaging, effectively solves the restriction on tissue thickness for super-resolution imaging and the problem of image drifts due to the tissue being soft, difficult to cut, and prone to slippage, and implements three-dimensional super-resolution imaging of a thick biological tissue that is difficult to attain with the prior art.

WO 2020/199328 A1

[见续页]

MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国(除另有指明，要求每一种可提供的地区保护)：ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

(57) 摘要：一种膨胀切削显微成像方法及适用于该方法的超吸水水凝胶，其中方法是将向待成像的生物组织施加膨胀物质，在该膨胀物质的作用下使生物组织膨胀成硬度不低于15kPa的膨胀组织，然后结合机械切削对该膨胀组织进行切削和成像，从而实现生物组织的三维膨胀切削显微成像，实现三维超分辨成像。该方法通过对生物组织在这些膨胀物质作用下硬度值要求等进行控制，与后续重复切削-成像过程相配合，能够有效解决超分辨成像对组织厚度的限制以及组织样本较软、难以切削、且易滑动导致图像漂移等问题，可以实现现有技术难以达到的对于较厚的生物组织三维超分辨成像。

膨胀切削显微成像方法及适用于该方法的超吸水水凝胶

【技术领域】

本发明属于荧光显微成像领域，更具体地，涉及一种膨胀切削显微成像方法及适用于该方法的超吸水水凝胶，利用膨胀切削显微成像方法尤其可实现大体积生物组织样本的三维超分辨成像。

【背景技术】

膨胀显微镜（ExM）是近年来发展起来一种超分辨的技术，它是将生物样本在可膨胀的聚电解质水凝胶中聚合形成致密的交联网络，吸水后将样本在物理上均匀放大，经过这样的物理放大后，衍射受限区域的分子在空间中被分离到更大的距离，因此即使使用传统的衍射受限显微镜也可以分辨。不像其他的超分辨技术需要依赖于特殊的仪器（如超分辨显微镜），ExM 技术与传统显微镜（例如，宽场显微镜、共聚焦显微镜等）相兼容，使细胞和组织在普通、快速、衍射受限的显微镜下实现对标本进行三维纳米级分辨率成像。

目前各种膨胀因子（三维方向均匀膨胀的倍数）的 ExM 已经被发展起来。由最初的 4×发展到了 10×，最新的技术甚至达到了~4.5×4.5 ≈ 20×，成像分辨率也由 70 nm 发展到了 15 nm。研究者们在追求膨胀因子（即膨胀倍数，膨胀因子越高，相应的成像分辨率越高）达到极致的情况下，却忽略了超吸水水凝胶的硬度。目前用于膨胀显微镜的超吸水聚合物均是以丙烯酸钠作为吸水试剂，另外以少量的丙烯酰胺和双丙烯酰胺与之交联形成聚合物网络，吸水膨胀后水凝胶的胶体质地非常软，无法直接用手支撑，实际操作困难。在成像过程中将水凝胶置于玻片上时极易滑动，图像会出现漂移现象，导致聚焦模糊，后期图像处理麻烦。最重要的是，这种质地较软的水凝胶无法用于机械切削成像，即使利用大体积成像的光片照明显微

镜，受限于其物镜工作距离（8 mm），最多只能也获取厚度为 2 mm 的组织（膨胀 4 倍的情况下）的数据，不利于更大体积的样本的数据获取。另外，目前所有的超分辨显微镜都无法实现大体积生物组织的成像。

基于以上提出的问题以及当前对大体积生物组织三维网络超分辨成像的需求，急需建立一种新的超分辨成像方法，利用膨胀显微镜实现生物组织的超分辨成像，同时保证膨胀的样本具有足够的硬度，与机械切削荧光显微镜相结合，利用切削原理打破目前超分辨成像对样本厚度的限制，实现完整组织块的三维超分辨成像。

【发明内容】

针对现有技术的以上缺陷或改进需求，本发明的目的在于提供膨胀切削显微成像方法及适用于该方法的超吸水水凝胶，其中通过对关键的膨胀物质作用，尤其是对生物组织在这些膨胀物质作用下硬度值要求等进行控制，与后续重复切削-成像过程（如序列切削-成像过程）相配合，与现有技术相比能够有效解决组织样本较软、难以切削、且易滑动导致图像漂移、难以实现三维超分辨成像等问题，可以实现现有技术难以达到的对于厚的、或大体积生物组织三维超分辨成像。并且，本发明中特定组成及配比的超吸水水凝胶，尤其适用于该生物组织膨胀切削成像方法，可以使膨胀后的膨胀组织其硬度达到 15 KPa 以上，并且能够使样本组织三维各个方向放大≥4 倍（体积放大≥100 倍），在普通光学显微镜成像的条件下实现超分辨（≥250 nm / 4 = 62.5 nm 的分辨率）的效果；同时与机械切削策略结合，打破目前超分辨成像对样本厚度的限制，实现大体积生物样本的三维超分辨成像。

为实现上述目的，按照本发明的一个方面，提供了一种膨胀切削显微成像方法，其特征在于，该方法是将向待成像的初始生物组织施加膨胀物质，在该膨胀物质的作用下使所述初始生物组织膨胀成硬度不低于 15 KPa 的膨胀组织，然后结合机械切削对该膨胀组织进行切削和显微成像，从而

实现生物组织的三维膨胀切削显微成像，获取三维超分辨数据，实现三维超分辨成像。

作为本发明的进一步优选，所述膨胀物质为超吸水水凝胶，所述初始生物组织与所述超吸水水凝胶交联聚合后吸水膨胀形成硬度不低于 15 KPa 的凝胶块，该凝胶块即为膨胀组织；所述超吸水水凝胶的吸水后膨胀倍数≥2 倍，优选为≥4 倍。

作为本发明的进一步优选，所述将向待成像的初始生物组织施加膨胀物质，在该膨胀物质的作用下使所述初始生物组织膨胀成硬度不低于 15 KPa 的膨胀组织，具体包括以下步骤：

（1）组织锚定：将荧光标记的生物组织使用甲基丙烯酸 N-羟琥珀酸亚胺酯（MA-NHS）或者 6-丙烯氨基乙酸琥珀酸酯（AcX）对生物组织中蛋白质进行锚定；

（2）水凝胶渗透：将步骤（1）中获得的锚定后的生物组织置于配制完成的超吸水水凝胶溶液中进行渗透；

（3）水凝胶聚合：将步骤（2）中获得渗透后的生物样本置于聚合槽中，加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽表面进行封片，然后将聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱进行聚合；

（4）蛋白酶 K 消化：将步骤（3）中获得聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中消化；

（5）去离子水中透析膨胀：将步骤（4）获得消化后的生物组织置于去离子水中透析，每隔 1 h 换一次去离子水，重复 3 ~ 5 次，直至膨胀至样本体积最大。

作为本发明的进一步优选，所述结合机械切削对膨胀组织进行切削和显微成像，具体包括如下步骤：

（a）以所述膨胀组织的表层作为第一层成像层，在荧光显微镜下激发成像，获得第一层的成像，然后切削掉该第一层成像层，得到一次切削后

的膨胀组织；

（b）将步骤（a）得到的一次切削后的膨胀组织其表层作为第二层成像层，在荧光显微镜下激发成像，获得第二层的成像，然后切削掉该第二层成像层，得到二次切削后的膨胀组织；

（c）重复先荧光激发成像、后切削的过程，依次得到第三层、第四层、……的成像，从而得到所述膨胀组织的系列二维图像，然后对这些二维图像进行叠加处理，即可实现整个膨胀组织的三维超分辨成像。

作为本发明的进一步优选，所述结合机械切削对膨胀组织进行切削和显微成像具体是利用自动切削荧光显微镜。

按照本发明的另一方面，本发明提供了一种适用于膨胀切削显微成像方法的超吸水水凝胶，其特征在于，该超吸水水凝胶主要由超吸水化合物、单体、交联剂、引发剂和加速剂组成，其中，超吸水化合物、单体、交联剂、引发剂和加速剂五者的质量之比满足（10-15）：（10-20）：（0.5-2）：(0.5-1)：(0.5-1)。

作为本发明的进一步优选，按重量份计，每 100 份的超吸水水凝胶中，包括 10-15 份的超吸水化合物，10-20 份的单体，0.5-2 份的交联剂，0.5-1 份的引发剂，以及 0.5-1 份的加速剂，其余组分为去离子水。

作为本发明的进一步优选，所述超吸水化合物为亲水化合物，优选为丙烯酸、甲基丙烯酸、海藻酸、衣康酸、巴豆酸、马来酸、意大利酸、2-丙烯酰氨基-2-甲基-1-丙磺酸（AMPS）、乙烯醇、醋酸乙烯、甲基丙烯酸羟乙酯中的一种或多种；更优选为 AMPS、衣康酸、马来酸、意大利酸、乙烯醇、醋酸乙烯中的一种或多种；

所述单体为丙烯酰胺或 N,N-二甲基丙烯酰胺，优选为丙烯酰胺；

所述交联剂为双丙烯酰胺；

所述引发剂为过硫酸铵（APS）或者过硫酸钾（KPS），优选为 APS；

所述加速剂为四甲基乙二胺(TEMED)。

按照本发明的又一方面，本发明提供了上述超吸水水凝胶作为膨胀物质在生物组织的切削显微成像实现生物组织三维超分辨成像中的应用。

通过本发明所构思的以上技术方案，与现有技术相比，通过向生物组织与膨胀物质进行膨胀处理，然后对膨胀后的生物样本进行逐层的切削成像，反复循环，由此获取三维超分辨数据，从而得到膨胀切削显微成像方法。本发明利用膨胀物质使生物组织膨胀为硬度不低于 15 KPa 的组织，便于机械切削；硬度过低的话，组织样本非常软，无法直接用手支撑，切削操作将会非常困难，并且，这些软样本在成像阶段置于玻片上时将极易滑动，图像会出现漂移现象，导致聚焦模糊，三维超分辨成像将非常困难。本发明通过将膨胀后样本的硬度控制为不低于 15 KPa，后续采用重复荧光激发成像－切削（即先荧光激发成像、后切削）过程，利用反复断层成像获取膨胀样品的二维图像，然后对二维图像进行叠加处理，实现整个样本的三维超分辨成像；通过叠加处理，可实现三维立体成像。本发明可实现厚的大体积组织实现超分辨成像，对目前各种超分辨技术对厚度成像存在限制是极大的突破。该方法可应用于生命科学研究中，例如可利用该方法获取连续的生物样品精细结构信息。

本发明膨胀切削显微成像方法，利用膨胀物质，使生物组织膨胀，并形成硬度不低于 15 KPa 的膨胀组织，尤其可以结合自动切削显微成像系统对该膨胀组织同时切削和成像，从而打破超分辨成像对组织厚度的限制，尤其可以实现厚组织的三维超分辨成像。现有技术中，传统的超分辨显微镜成像能够成像的组织厚度往往只有 10～20 μm，膨胀显微镜利用最长工作距离的物镜成像时也要求膨胀组织的厚度不超过 8 mm（膨胀 4 倍的情况下，初始组织厚度不超过 2 mm），而利用本发明，在确保膨胀组织的硬度不低于 15 KPa 的基础上，可实现厘米量级厚度的膨胀组织的成像（膨胀前的初始生物组织的厚度也可达厘米量级），打破了现有技术中超分辨成像对组织厚度的限制，可以实现厚组织的三维超分辨成像。

本发明优选作为膨胀物质的超吸水聚合物，一方面能在吸水膨胀后具有一定的硬度，与自动切片的断层切削显微镜相兼容，实现组织超分辨成像的同时，另一方面，又能打破目前超分辨成像对样本厚度的限制，用于获取大体积组织的三维超分辨数据。

本发明中进一步优选的特定组成及配比的超吸水水凝胶，吸水膨胀后仍然具有一定的硬度能够用于机械切削，尤其可作为膨胀物质应用于上述可切削的光学成像方法；例如，可以将生物组织与超吸水水凝胶进行交联聚合，吸水膨胀后仍然能够保持足够的硬度用于机械切削荧光显微镜进行自动切削成像，通过反复切削成像，直至获取整个样本的图像数据，再通过三维配准等后处理即可得到三维完整图像信息。本发明尤其通过对超吸水水凝胶中交联剂的占比进行控制，既保证了水凝胶的机械强度，又确保了水凝胶的膨胀倍数，有效解决了组织样本较软、难以切削、且易滑动导致图像漂移等问题，尤其可以实现现有技术难以达到的对于较厚的生物组织三维超分辨成像。并且，该超吸水水凝胶既可保证组织各向同性膨胀，不会引起细胞结构的紊乱，又能够对生物组织中标记的荧光蛋白或者荧光染料等信号具有良好的保持率，便于成像。

总体而言，通过本发明所构思的以上技术方案与现有技术相比，能够取得下列有益效果：

（1）本发明提供的膨胀切削显微方法打破了传统的膨胀显微镜以及超分辨显微镜（例如，受激发射损耗显微镜 STED，光激活定位显微镜 PALM 和随机光学重建显微镜 STORM）对组织厚度的限制，可适用于任何厚度、任何体积的生物组织超分辨成像。

（2）本发明所提供的膨胀切削显微成像方法可适用于任何荧光标记的生物组织样本，包括转基因标记和免疫组化标记的生物样本，对样本信号具有良好的保持率，便于成像。

（3）本发明中将特定组分及配比的超吸水水凝胶作为膨胀物质由此对

应得到的膨胀切削显微方法，除了上述特点外，超吸水水凝胶在水溶液中透析达到平衡后，三维各个方向可膨胀≥4 倍且具有一定的硬度，能够与各种软包埋的自动切削荧光显微镜相兼容，用于获取厚的大体积生物组织的三维纳米级超分辨数据。

【附图说明】

图 1 为本发明的可切削膨胀显微镜的成像方法的流程图。

图 2 为厚生物组织的超吸水水凝胶聚合槽 3D 打印示意图。

图 3 为实施例 1 脑片与水凝胶交联聚合吸水膨胀后的照片，左图为放在方格纸上的照片，右图为手支撑起的照片。

图 4 为实施例 2 转基因荧光蛋白 GFP 脑片膨胀前后结果对比图（图 4 中的图 A、图 B）、膨胀因子计算（图 4 中的图 C）和膨胀前后的图像配准结果示例（图 4 中的图 D）。

图 5 为实施例 3 免疫组化标记荧光染料 Alexa546 脑片膨胀前后结果对比图（图 5 中的图 A、图 B）、膨胀因子计算（图 5 中的图 C）和膨胀前后的图像配准结果示例（图 5 中的图 D）。

图 6 为实施例 4 转基因荧光蛋白 GFP 脑块膨胀后三维成像结果示例，图中 X 为 5 mm，Y 为 4 mm，Z 为 3 mm。

图 7 为实施例 5 免疫组化标记荧光染料 Alexa546 膨胀后三维成像结果示例，图中 X 为 5 mm，Y 为 5.5 mm，Z 为 11.3 mm。

【具体实施方式】

为了使本发明的目的、技术方案及优点更加清楚明白，以下结合附图及实施例，对本发明进行进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。此外，下面所描述的本发明各个实施方式中所涉及到的技术特征只要彼此之间未构成冲突就可以相互组合。

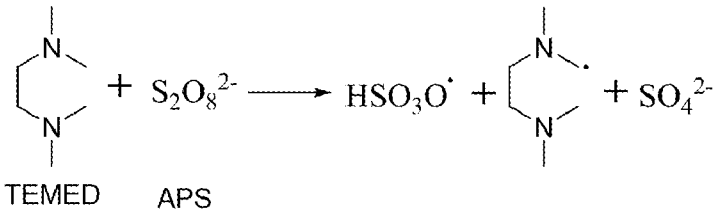
本发明提供的一种可切削的膨胀显微成像三维成像方法，主要是依赖

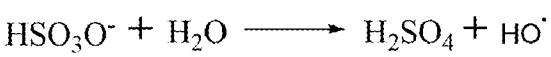
于样本在吸水后到一定的体积后依然能够保持足够的硬度（硬度不低于 15 KPa）。为具体说明，本发明例举的膨胀物质为超吸水水凝胶，超吸水水凝胶主要共包括五种成分：超吸水化合物、单体、交联剂、引发剂和加速剂，所述的水凝胶组分按重量份计，每 100 份的超吸水水凝胶中，超吸水化合物为 10 -15 份，单体为 10 - 20 份，交联剂为 0.5 - 2 份，引发剂和加速剂各 0.5 - 1 份，其他成分为去离子水。

超吸水水凝胶的大分子链上含有能与水分子之间形成大量氢键等化学键的-SO_3H、-OH、-COOH、-$CONH_2$ 等亲水基团，因而分子网络能够不断扩张；从物理结构来看，由于聚合物交联的立体网络结构的存在，能够使吸水树脂网络内外产生渗透压，水分子进入后，由于网格的约束，限制其往外扩散运动，因而又具有很好的保水性能。因此，亲水基团的含量越多，亲水能力越强，会使超吸水聚合物的吸水能力增强。另外，超吸水水凝胶的吸水倍率和强度是相互制约的关系，在同样膨胀倍数的情况下，吸水能力强的水凝胶则会保持更高的机械强度。AMPS 中含有磺酸基基团，与丙烯酸钠中的羧基相比具有更强的亲水能力；衣康酸、马来酸和意大利酸均具有两个羧基基团，比只有一个羧基的丙烯酸钠具有更强的亲水能力，它们与丙烯酸钠作为吸水化合物相比，在同等膨胀倍数的情况下，膨胀后可以提高水凝胶机械强度；另外当多种吸水物质（例如，AMPS 与丙烯酰胺或乙烯醇或醋酸乙烯）同时参与聚合时，由于各种基团形成相互协调作用，也会提高水凝胶的机械强度。配方中的超吸水化合物包括但不限于 AMPS、衣康酸、马来酸、意大利酸、乙烯醇和/或醋酸乙烯。交联剂主要是支撑水凝胶网络的作用，交联的含量越多，水凝胶的机械强度就会越高，但是同时交联剂含量高时又会限制水凝胶的膨胀倍数。本发明中的交联剂包括并不限于双丙烯酰胺。

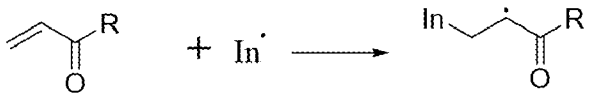
超吸水水凝胶聚合的反应机理如下：

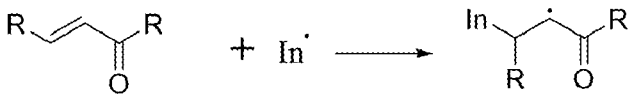
(1) 自由基引发



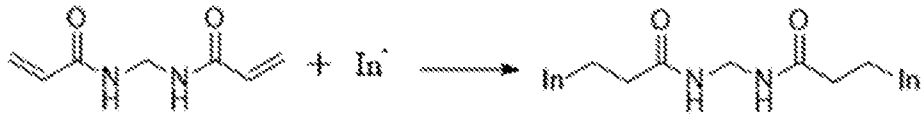


(2) 自由基传播



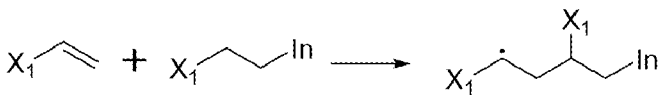


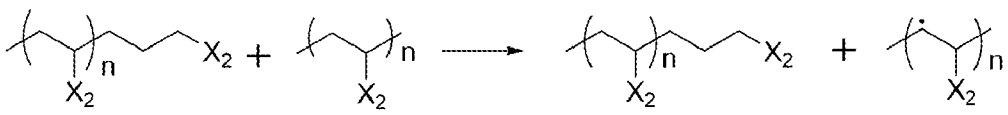
R = NH_2, $NHC(CH_3)_2CH_2SO_3H$, OH, COOH



In· = TEMED·, HSO_3O·, HO·

(3) 聚合链增长及终止





X_1= $C(O)NH_2$, $C(O)NHCH_2NHC(O)$, $C(O)NHC(CH_3)_2CH_2SO_3H$
X_2=X_1 或者增长的链

使用上述膨胀聚合物对生物组织进行处理并成像，如图 1 所示，包括以下步骤：

（1）组织锚定：将荧光标记的组织使用甲基丙烯酸 N-羟琥珀酸亚胺酯

（MA-NHS）或者 6-丙烯氨基乙酸琥珀酸酯（AcX）对生物组织中蛋白质进行锚定。锚定试剂溶剂可以为 2 -（N-吗啉）乙磺酸（MES）的水溶液，包括 100 mM MES，150 mM NaCl，锚定试剂的浓度为 0.1 mg/ml，反应的温度为 4 ℃，锚定时间为 12 h。锚定的目的是向生物组织的蛋白质中引入烯基，用于和水凝胶各组分进行交联反应，将生物组织中的蛋白固定到水凝胶网络上。

（2）水凝胶渗透：锚定后的生物组织置于配制完成的超吸水水凝胶溶液中进行渗透，渗透时间优选为 2 ~ 4 小时，渗透温度优选为 4 ℃。渗透是将组织中充满水凝胶的各个组分。

（3）水凝胶聚合：渗透后的生物样本置于聚合槽中（聚合槽可以采用如图 2 所示的结构），加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽表面进行封片，然后将聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱进行聚合，聚合温度为为 37 ℃，聚合时间为 2 h。

（4）蛋白酶 K 消化：聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中消化，其中消化缓冲液优选为 50 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100, 1 M NaCl 的混合溶液，蛋白酶 K 的浓度优选为 8 units/mL，消化时间优选为 12 h，消化温度优选为 37 ℃。蛋白酶 K 消化的目的是解除生物组织中蛋白的相互作用，使组织能够各向同性膨胀。

（5）去离子水中透析膨胀：消化后的生物组织置于去离子水中透析，每隔 1 h 换一次去离子水，重复 3 ~ 5 次，直至膨胀至样本体积最大。

（6）立体切削成像：膨胀后的生物样本置于自动切削功能的荧光显微镜中成像，先对表层进行成像，然后机械切削掉所述的已成像表层，露出新表层，然后再进行激发使其荧光成像；

（7）重复所述步骤（6）的过程，如此反复断层成像直至获取整个样品的三维图像。

本发明的切削膨胀成像方法，超吸水水凝胶在与生物组织交联聚合吸

水膨胀后，依然能够保持对荧光蛋白和荧光染料标记的生物样本的荧光信号，也能够保证生物组织是各向同性的膨胀，膨胀后与膨胀前相比，所标记信号的紊乱率在 4 %以下。更重要的本发明的超吸水聚合物在保证了膨胀系数达到≥4 的前提下，仍然具有足够的硬度能够用于切削成像，特别适用于大体积生物样本的超分辨数据的获取。

本发明的成像方法可选择用于三维成像的任意成像系统，由于样本膨胀处理后处于完全透明状态，优选为基于光片照明的自动切削成像系统；样本膨胀完成后硬度是类似的琼脂糖包埋的软包埋体系，又优选为软包埋的自动切削成像系统。

以下为实施例：

实施例 1：

一种膨胀切削显微成像方法，其中的关键是将向待成像的初始生物组织施加膨胀物质，在该膨胀物质的作用下使所述初始生物组织膨胀成硬度不低于 15 KPa 的膨胀组织。图 1 是可切削膨胀显微镜的成像方法的流程，实施例 1 是样本与水凝胶交联膨胀完成后的示例，还未进行切削成像（后文表 1 还给出了膨胀组织完成后进行的膨胀因子和硬度的测试结果），具体包括以下步骤：

（1）蛋白质锚定：将小鼠脑片用 MA-NHS 对生物组织中蛋白质进行锚定，向生物组织中引入双键，用于与水凝胶交联。锚定溶剂为 2 -（N - 吗啉）乙磺酸（MES）的水溶液,包括 100 mM MES, 150 mM NaCl，锚定化合物的浓度优选为 0.1mg/ml, 在 4℃下置于水平摇床，锚定 12 小时；

（2）水凝胶渗透：将锚定后的生物组织置于超吸水水凝胶溶液中渗透，在 4℃下置于水平摇床渗透 1 h；

（3）水凝胶聚合：渗透后的生物样本重新置于图 2 所示的聚合槽中，加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽顶部用盖玻片封片，防止有气泡进入，然后将封片后的聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱，37℃聚合 2 h。

（4）蛋白酶 K 消化：将聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中进行消化，其中消化液缓冲液为 50 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100,1 M NaCl 的混合溶液，蛋白酶 K 的浓度为 8 units/mL，置于 37 ℃气浴振荡器中消化 12 h。

（5）去离子水中透析膨胀：消化后的生物组织置于去离子水中透析膨胀，每隔 1 小时换一次去离子水，重复 3 - 5 次，直到膨胀至体积最大。

实施例 2：

GFP 荧光蛋白转基因标记的小鼠脑片的膨胀前后的结果示例：

（1）膨胀前成像：先对 100 μm 厚的荧光蛋白 GFP 标记的脑片在共聚焦显微镜下成像，标记好成像的位置；

（2）蛋白质锚定：将荧光标记的组织使用 MA-NHS 对生物组织中蛋白质进行锚定，向生物组织中引入双键，用于与水凝胶交联。锚定溶剂为 2-（N-吗啉）乙磺酸（MES）的水溶液,包括 100 mM MES, 150 mM NaCl，锚定化合物的浓度为 0.1 mg/ml, 在 4℃下置于水平摇床，锚定 12 h；

（3）水凝胶渗透：将锚定后的生物组织置于超吸水水凝胶溶液中渗透，在 4℃下置于水平摇床渗透 1h；

（4）水凝胶聚合：渗透后的生物样本重新置于图 2 所示的聚合槽中，加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽顶部用盖玻片封片，防止有气泡进入，然后将封片后的聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱，37℃聚合 2 h。

（5）蛋白酶 K 消化：将聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中进行消化，其中消化液缓冲液为 50 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100,1 M NaCl 的混合溶液，蛋白酶 K 的浓度为 8 units/mL，置于 37 ℃气浴振荡器中消化 12 h。

（6）去离子水中透析膨胀：消化后的生物组织置于去离子水中透析膨胀，每隔 1 小时换一次去离子水，重复 3～5 次，直到膨胀至体积最大；

（7）振动切片机切削：将步骤（6）所获得的膨胀后样本（膨胀后样

本的厚度≈ 500 μm）在振动切片机上进行切片，切成 50 μm 厚的薄片；

（8）膨胀后成像：将（7）中所获得的膨胀后的 50 μm 厚的薄片在玻片上进行封片，对步骤（1）成像结果的相同位置进行成像。

实施例 3：

免疫组化标记的小鼠脑片的膨胀前后的结果示例：

（1）脑片免疫组化标记：将 100 μm 厚的脑片置于 PBS 溶液中漂洗 3 次，每次 5min，漂洗后的脑片置于 PBS/0.2% Triton X-100/20% DMSO/0.3 M 甘氨酸溶液中 2 h；然后移入 PBS/0.2% Triton X-100/10% DMSO/6%羊血清的溶液中 2 h，之后将样本置于 PBS/0.2% Tween-20 含有 10 mg/ml 肝素钠(PTwH)溶液中 30 min；然后将样本移入溶解有一抗的 PTwH/5% DMSO/3%羊血清溶液中（一抗兔抗 GFP 稀释比例为 1:600），在 37℃摇床上一抗孵育 8 小时；用 PTWH 溶液在 37℃摇床上对样本漂洗 8 次，每次 5 min，最后一次漂洗换液后过夜；次日将样本移入溶解有二抗的 PTwH /3%羊血清溶液中，在 37℃摇床上二抗孵育 6 h（二抗羊抗兔 Alexa546 稀释比例为 1:600）；最后在常温下，水平摇床上，采用 PTWH 溶液对样本漂洗 4 次，每次 5 min。

（2）膨胀前成像：先对免疫组化标记的脑片在共聚焦显微镜下成像，标记好成像的位置；

（3）蛋白质锚定：将荧光标记的组织使用 MA-NHS 对生物组织中蛋白质进行锚定，向生物组织中引入双键，用于与水凝胶交联。锚定溶剂为 2-（N-吗啉）乙磺酸（MES）的水溶液,包括 100 mM MES, 150 mM NaCl，锚定化合物的浓度为 0.1mg/ml, 在 4℃下置于水平摇床，锚定 12 小时；

（4）水凝胶渗透：将锚定后的生物组织置于超吸水水凝胶溶液中渗透，在 4℃下置于水平摇床渗透 1h；

（5）水凝胶聚合：渗透后的生物样本重新置于图 2 所示的聚合槽中，加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽顶部用盖玻片封片，防止有气泡进

入，然后将封片后的聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱，37℃聚合 2 h。

（6）蛋白酶 K 消化：将聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中进行消化，其中消化液缓冲液为 50 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100,1 M NaCl 的混合溶液，蛋白酶 K 的浓度为 8 units/mL，置于 37 ℃气浴振荡器中消化 12 h。

（7）去离子水中透析膨胀：消化后的生物组织置于去离子水中透析膨胀，每隔 1 小时换一次去离子水，重复 3-5 次，直到膨胀至体积最大；

（8）振动切片机切削：将步骤（7）所获得的生物样本（膨胀后≈ 500 μm）在振动切片机上进行切片，切成 50 μm 厚的薄片；

（9）膨胀后成像：将（8）中所获得的膨胀后的 50 μm 厚的薄片在玻片上进行封片，对步骤（2）成像结果的相同位置进行成像。

实施例 4：

GFP 荧光蛋白转基因标记的小鼠脑块的膨胀前后的结果示例：

（1）蛋白质锚定：将荧光标记的小鼠脑块（体积为 1250×1000×750 μm^3）使用 MA-NHS 对生物组织中蛋白质进行锚定，向生物组织中引入双键，用于与水凝胶交联。锚定溶剂为 2 -（N-吗啉）乙磺酸（MES）的水溶液,包括 100 mM MES, 150 mM NaCl，锚定化合物的浓度为 0.2 mg/ml, 在 4℃下置于水平摇床，锚定 12 小时；

（2）水凝胶渗透：将锚定后的生物组织置于超吸水水凝胶溶液中渗透，在 4℃下置于水平摇床渗透 2 h，换新鲜的渗透液，继续渗透 2 h；

（3）水凝胶聚合：渗透后的生物样本重新置于图 2 所示的聚合槽中，加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽顶部用盖玻片封片，防止有气泡进入，然后将封片后的聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱，37℃聚合 2 h。

（4）蛋白酶 K 消化：将聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中进行消化，其中消化液缓冲液为 50 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100,1 M NaCl 的混合溶液，蛋白酶 K 的浓度为 8 units/mL，置于 37 ℃气

浴振荡器中消化 24 h。

（5）去离子水中透析膨胀：消化后的生物组织置于去离子水中透析膨胀，每隔 1 小时换一次去离子水，重复 3 ～ 5 次，直到膨胀至体积最大；

（6）立体切削成像：将步骤（5）中所得的膨胀后的生物样本置于自动切削功能的荧光显微镜中成像，先对表层进行成像，然后机械切削掉所述的已成像表层，露出新表层，然后再进行激发使其荧光成像；

（7）重复所述步骤（6）的过程，如此反复断层成像直至获取整个样品的三维图像。

实施例 5：

免疫组化标记的小鼠脑块（体积为 1250×1375×2825 μm^3）的膨胀前后的结果示例：

（1）小鼠脑块进行免疫组化标记：首先用 0.01 M PBS 缓冲液对组织进行漂洗 3 次，每次 10 min，然后分别用 20%、40%、60%、80%、100%、100%的甲醇溶液，在 4℃环境下进行脱水，每 20 min。将样本置于 5% H2O2/20% DMSO/CH3OH 混合溶液中，在 4℃环境下进行漂白 12 h。之后依次使用 100%、80%、60%、40%、20%的甲醇溶液和 0.01 M PBS 缓冲液，对样本进行复水，每次 20 min。免疫染色：将经过预处理的样本置于 PBS/0.2% Triton X-100/20% DMSO/0.3 M 甘氨酸溶液中 1 d ，然后将样本移入 PBS/0.2 % Triton X-100/10 % DMSO/6 %羊血清的溶液中 1 d，之后将样本置于 PBS/0.2% Tween-20/10 mg/ml 肝素（PTwH）溶液中过夜。第二天将样本移入溶解有一抗的 PTwH/5 %DMSO/3 %羊血清溶液中（一抗兔抗 GFP 稀释比例 1:300），在 37℃环境下，摇床上一抗孵育 2 d。一抗孵育结束后，用 PTWH 溶液在 37℃摇床上漂洗样本 5 次，每次 1 h，完成最后一次漂洗步骤后过夜。第二天将样本移入含有二抗的 PTw H /3%羊血清溶液中在 37℃环境下（二抗羊抗兔 Alexa 546 稀释比例 1:300），摇床上孵育 2 d。二抗孵育结束后，在 37℃恒温摇床上，用 PTWH 溶液漂洗样本 5 次，

每次 1 h，最后置于 PBS 溶液中漂洗 3 次，每次 30 min。

（2）蛋白质锚定：将荧光标记的小鼠脑块使用 MA-NHS 对生物组织中蛋白质进行锚定，向生物组织中引入双键，用于与水凝胶交联。锚定溶剂为 2 -（N-吗啉）乙磺酸（MES）的水溶液,包括 100 mM MES, 150 mM NaCl，锚定化合物的浓度为 0.2 mg/ml, 在 4℃下置于水平摇床，锚定 12 小时；

（3）水凝胶渗透：将锚定后的生物组织置于超吸水水凝胶溶液中渗透，在 4℃下置于水平摇床渗透 2 h，换新鲜的渗透液，继续渗透 2 h；

（4）水凝胶聚合：渗透后的生物样本重新置于图 2 所示的聚合槽中，加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽顶部用盖玻片封片，防止有气泡进入，然后将封片后的聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱，37℃聚合 2 h。

（5）蛋白酶 K 消化：将聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中进行消化，其中消化液缓冲液为 50 mM Tris (pH 8), 1 mM EDTA, 0.5% Triton X-100,1 M NaCl 的混合溶液，蛋白酶 K 的浓度为 8 units/mL，置于 37 ℃气浴振荡器中消化 24 h。

（6）去离子水中透析膨胀：消化后的生物组织置于去离子水中透析膨胀，每隔 1 小时换一次去离子水，重复 3～5 次，直到膨胀至体积最大；

（7）立体切削成像：将步骤（5）中所得的膨胀后的生物样本置于自动切削功能的荧光显微镜中成像，先对表层进行成像，然后机械切削掉所述的已成像表层，露出新表层，然后再进行激发使其荧光成像；

（8）重复所述步骤（6）的过程，如此反复断层成像直至获取整个样品的三维图像。

按以下方法将上述实施例 1-5 所得的样品进行测试：

实施例 1 中，表 1 是样品编号 1-6 的膨胀因子和硬度测试，其中膨胀因子是将膨胀前凝胶样本修成截面为 $1cm^2$ 的小块，用游标卡尺精确量取截面的边长，置于去离子水中膨胀完成后，再用游标卡尺精确量取其边长，膨

胀后与膨胀前边长的比值即为膨胀因子；膨胀后凝胶强度的测定是使用电子动静态疲劳试验机进行测试，以所得的弹性模量来代表硬度。

表 1 超吸水物质以 AMPS 为例的超吸水聚合物在不同的配比条件下膨胀因子和硬度参量的测试结果一览表

	按重量每 100 份计，下列物质所占比例（其余成分为纯净水）					测试结果	
样品编号	超吸水物质（AMPS 为例）	单体（丙烯酰胺）	交联剂（BIS）	引发剂（APS）	加速剂(TEMED)	膨胀因子	硬度（KPa）
1	15	20	2	0.5	0.5	4.03	210.05 ± 0.35
2	15	20	1	0.5	0.5	4.25	173.23 ± 0.28
3	15	20	1	1	1	4.36	150.05 ± 0.26
4	10	15	1	1	1	4.31	96.89 ± 0.43
5	10	10	1	1	1	4.67	58.62 ± 0.66
6	10	10	0.5	1	1	5.09	34.90 ± 0.91

从表 1 中可以看出当超吸水化合物、单体、交联剂、引发剂以及加速剂五者的质量之比满足（10-15）：（10-20）：（0.5-2）：(0.5-1)：(0.5-1)时，膨胀因子均≥4 且硬度均不低于 15KPa。

实施例 2 和 3 完成样本膨胀后，先使用振动切片机进行切片，切成 50 μm 厚的薄片后，用载玻片和盖玻片进行封片，最后在倒置荧光共聚焦显微镜（ZISS, 710）下进行图像获取。

实施例 4 和 5 完成样本膨胀后，采用自动切削功能的荧光显微镜进行切削成像来获取三维数据。

图 2 是厚生物组织的超吸水水凝胶聚合槽 3D 打印示意图，本发明设计的聚合槽可以通过改变对 XYZ 方向的设置适用于任意大小，任意体积样本

组织的聚合。

图 3 是实施例 1 组织与水凝胶交联聚合物膨胀后的代表照片，另外膨胀后的组织是完全透明的，可以清晰的看出背景纸上的黑色网格（左图），组织与水凝胶交联膨胀后，依然保持了足够的硬度，可以用手支撑且不变形（右图）。

图 4 是实施例 2 转基因荧光蛋白 GFP 小鼠脑片膨胀前后的对比。图 4 中，图 A、图 B 均为膨胀前后的对比结果，图 B 为图 A 中对应白框框出位置的放大，通过细节的对比可以清晰的看出膨胀后比膨胀前的分辨率明显提高，膨胀后树突结构细节清晰可辨。图 4 中图 C 为膨胀因子计算，分别测出图 4 中图 A 所示膨胀前后相同位置的实际距离（在图 C 中分别用短线 c 和 d 表示），膨胀后距离（56.27 μm）与膨胀前距离（12.45 μm）的比值，即得到膨胀因子为 4.52。图 4 中图 D 为膨胀前后的图像配准，配准后可以看出，膨胀前后的图像基本可以完全重合，说明膨胀后图像信息紊乱度较小，保真度较高。

图 5 是实施例 3 免疫组化荧光染料 Alexa546 标记的小鼠脑片膨胀前后的对比。与图 4 的表示方法相同，图 5 中图 A、图 B 均为膨胀前后的对比结果，图 B 为图 A 中对应白框框出位置的放大，同样的，对比可看出膨胀后比膨胀前的分辨率显著提高，膨胀后细节信息清晰可辨。图 5 中图 C 为膨胀因子计算，分别测出图 5 中图 A 所示膨胀前后相同位置的实际距离（在图 C 中分别用短线 c 和 d 表示），膨胀后距离（70.11 μm）与膨胀前距离（14.94 μm）的比值，即得到膨胀因子为 4.69。图 5 中图 D 为图 A 中白框框出位置的膨胀前后的图像配准，配准后可以看出，膨胀前后的图像基本可以完全重合，说明膨胀后图像信息紊乱度较小，保真度较高。

图 6 和图 7 是分别是转基因荧光蛋白 GFP 小鼠和免疫组化小鼠脑块膨胀后三维成像结果， 该结果均是采用自动切削荧光显微镜成像，说明本发明的超吸水聚合物机械强度合适，完全可以适用于切削成像。本发明可实

现厚的大体积组织实现超分辨成像，对目前各种超分辨技术对厚度成像存在限制是极大的突破。

本发明可直接采用现有技术中基于光片照明的自动切削成像系统（如斜光片机械切削系统），也可直接采用现有技术中软包埋的自动切削成像系统（如序列双光子成像系统，相应的，重复多次的切削-成像过程即序列切削-成像过程）。

除了上述实施例中所采用的特定组分的超吸水水凝胶外，本发明中的生物组织膨胀切削显微成像方法也可以采用其他膨胀物质，只要生物组织膨胀后的硬度不低于 15 KPa、能够实现稳定的切削即可。相信随着后续研究的深入，未来也会有越来越多的适用于本发明膨胀切削显微成像方法的膨胀物质出现。

本领域的技术人员容易理解，以上所述仅为本发明的较佳实施例而已，并不用以限制本发明，凡在本发明的精神和原则之内所作的任何修改、等同替换和改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求

1、一种膨胀切削显微成像方法，其特征在于，该方法是将向待成像的初始生物组织施加膨胀物质，在该膨胀物质的作用下使所述初始生物组织膨胀成硬度不低于 15 KPa 的膨胀组织，然后结合机械切削对该膨胀组织进行切削和显微成像，从而实现生物组织的三维膨胀切削显微成像，获取三维超分辨数据，实现三维超分辨成像。

2、如权利要求 1 所述膨胀切削显微成像方法，其特征在于，所述膨胀物质为超吸水水凝胶，所述初始生物组织与所述超吸水水凝胶交联聚合后吸水膨胀形成硬度不低于 15 KPa 的凝胶块，该凝胶块即为膨胀组织；所述超吸水水凝胶的吸水后膨胀倍数≥2 倍，优选为≥4 倍。

3、如权利要求 2 所述膨胀切削显微成像方法，其特征在于，所述将向待成像的初始生物组织施加膨胀物质，在该膨胀物质的作用下使所述初始生物组织膨胀成硬度不低于 15 KPa 的膨胀组织，具体包括以下步骤：

（1）组织锚定：将荧光标记的生物组织使用甲基丙烯酸 N-羟琥珀酸亚胺酯（MA-NHS）或者 6-丙烯氨基乙酸琥珀酸酯（AcX）对生物组织中蛋白质进行锚定；

（2）水凝胶渗透：将步骤（1）中获得的锚定后的生物组织置于配制完成的超吸水水凝胶溶液中进行渗透；

（3）水凝胶聚合：将步骤（2）中获得渗透后的生物样本置于聚合槽中，加入新的超吸水水凝胶溶液中，聚合槽表面进行封片，然后将聚合槽置于含有水的湿盒中，放入烘箱进行聚合；

（4）蛋白酶 K 消化：将步骤（3）中获得聚合后的生物样本置于蛋白酶 K 消化液中消化；

（5）去离子水中透析膨胀：将步骤（4）获得消化后的生物组织置于去离子水中透析，每隔 1 h 换一次去离子水，重复 3 ~ 5 次，直至膨胀至样

本体积最大。

4、如权利要求 1 所述膨胀切削显微成像方法，其特征在于，所述结合机械切削对膨胀组织进行切削和显微成像，具体包括如下步骤：

（a）以所述膨胀组织的表层作为第一层成像层，在荧光显微镜下激发成像，获得第一层的成像，然后切削掉该第一层成像层，得到一次切削后的膨胀组织；

（b）将步骤（a）得到的一次切削后的膨胀组织其表层作为第二层成像层，在荧光显微镜下激发成像，获得第二层的成像，然后切削掉该第二层成像层，得到二次切削后的膨胀组织；

（c）重复先荧光激发成像、后切削的过程，依次得到第三层、第四层、……的成像，从而得到所述膨胀组织的系列二维图像，然后对这些二维图像进行叠加处理，即可实现整个膨胀组织的三维超分辨成像。

5、如权利要求 1 所述膨胀切削显微成像方法，其特征在于，所述结合机械切削对膨胀组织进行切削和显微成像具体是利用自动切削荧光显微镜。

6、一种适用于膨胀切削显微成像方法的超吸水水凝胶，其特征在于，该超吸水水凝胶主要由超吸水化合物、单体、交联剂、引发剂和加速剂组成，其中，超吸水化合物、单体、交联剂、引发剂和加速剂五者的质量之比满足（10-15）：（10-20）：（0.5-2）：（0.5-1）：（0.5-1）。

7、如权利要求 6 所述适用于膨胀切削显微成像方法的超吸水水凝胶，其特征在于，按重量份计，每 100 份的超吸水水凝胶中，包括 10-15 份的超吸水化合物，10-20 份的单体，0.5-2 份的交联剂，0.5-1 份的引发剂，以及 0.5-1 份的加速剂，其余组分为去离子水。

8、如权利要求 6 所述适用于膨胀切削显微成像方法的超吸水水凝胶，其特征在于，所述超吸水化合物为亲水化合物，优选为丙烯酸、甲基丙烯酸、海藻酸、衣康酸、巴豆酸、马来酸、意大利酸、2-丙烯酰氨基-2-甲基-1-

丙磺酸（AMPS）、乙烯醇、醋酸乙烯、甲基丙烯酸羟乙酯中的一种或多种；更优选为 AMPS、衣康酸、马来酸、意大利酸、乙烯醇、醋酸乙烯中的一种或多种；

所述单体为丙烯酰胺或 N,N-二甲基丙烯酰胺，优选为丙烯酰胺；

所述交联剂为双丙烯酰胺；

所述引发剂为过硫酸铵（APS）或者过硫酸钾（KPS），优选为 APS；

所述加速剂为四甲基乙二胺(TEMED)。

9、如权利要求 6—8 任意一项所述超吸水水凝胶作为膨胀物质在生物组织的切削显微成像实现生物组织三维超分辨成像中的应用。

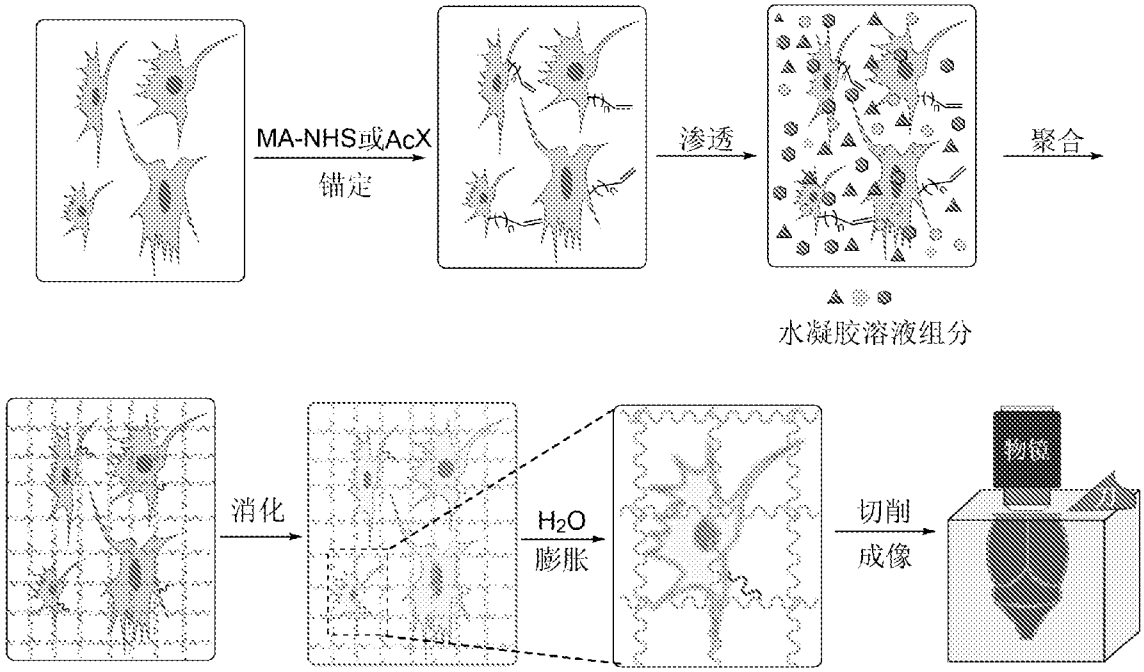


图 1

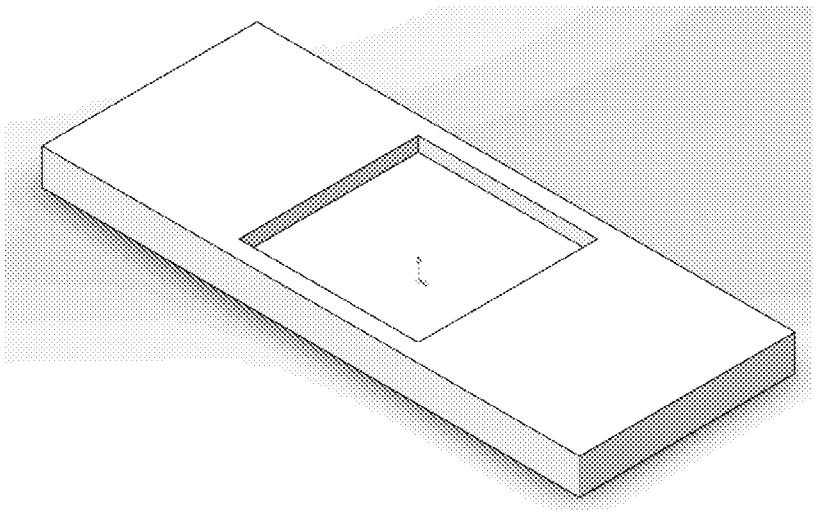


图 2

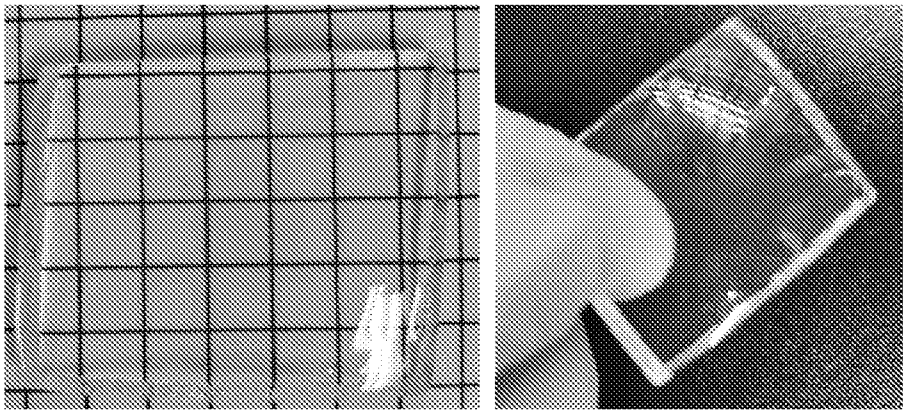


图 3

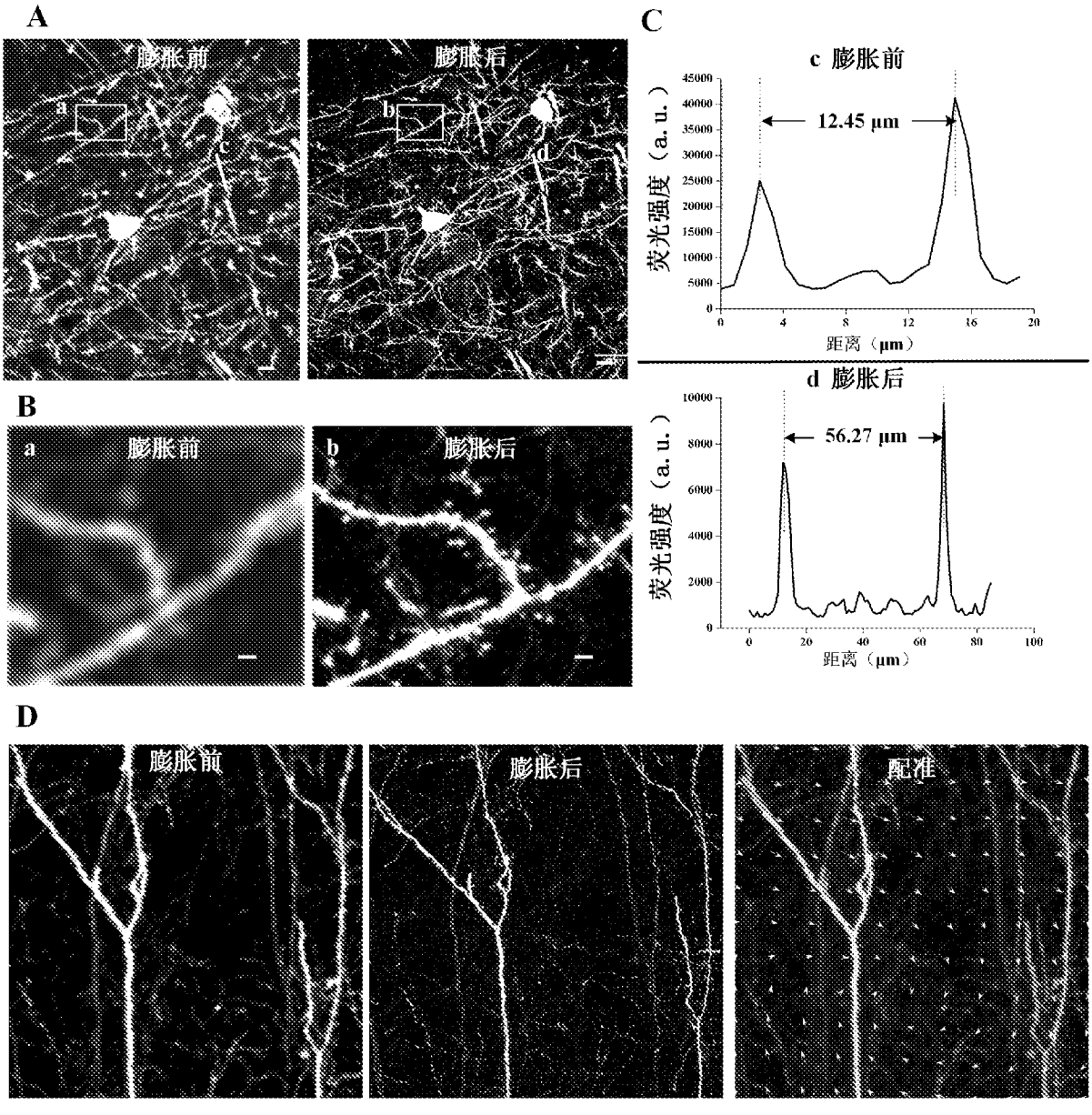

A
膨胀前
膨胀后
a
b
c
d
B
a 膨胀前
b 膨胀后
C
c 膨胀前
12.45 μm
荧光强度（a. u.）
距离（μm）
d 膨胀后
56.27 μm
荧光强度（a. u.）
距离（μm）
D
膨胀前
膨胀后
配准

图 4

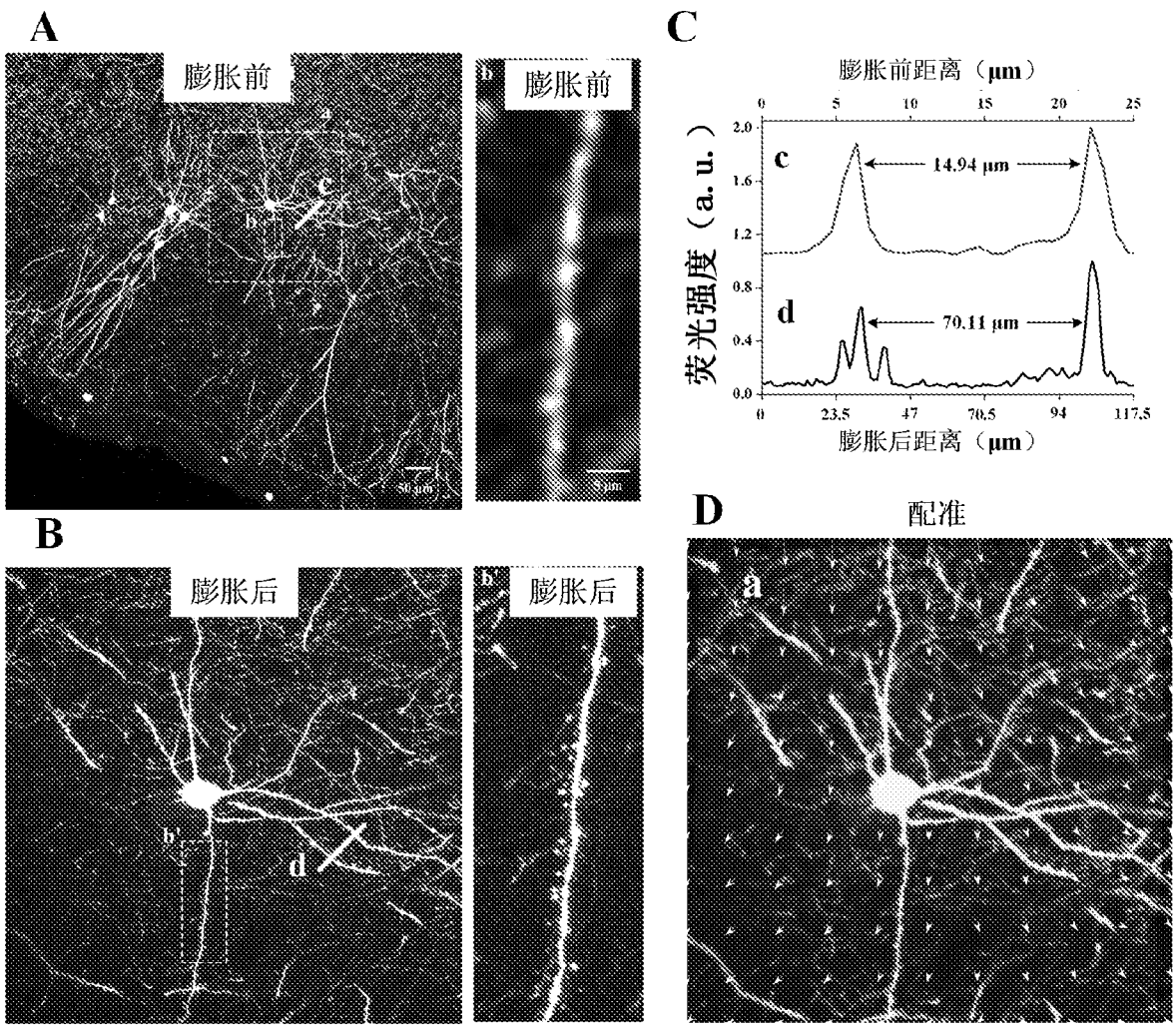

A
膨胀前
膨胀前
B
膨胀后
膨胀后
C
膨胀前距离（μm）
荧光强度（a. u.）
c
14.94 μm
d
70.11 μm
膨胀后距离（μm）
D
配准
a

图 5

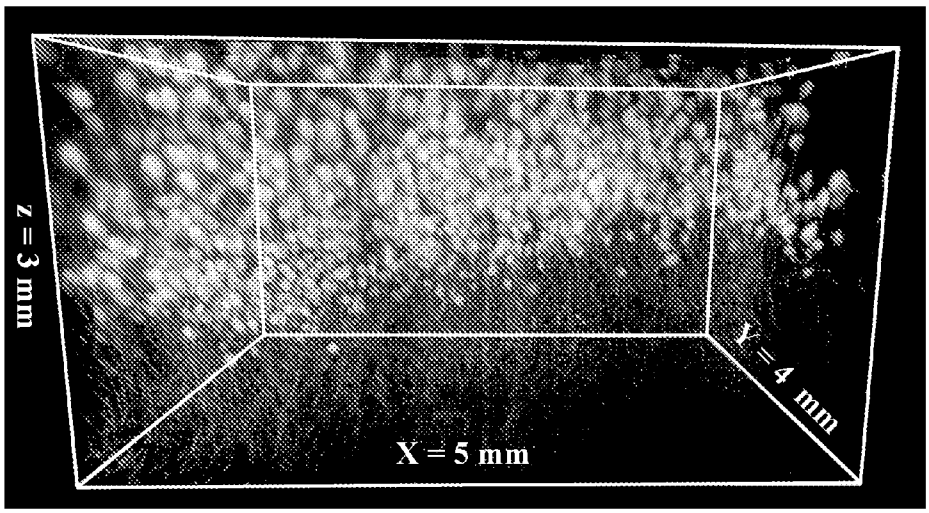

Z = 3 mm
X = 5 mm
Y = 4 mm

图 6



图 7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/088308

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 21/64(2006.01)i; C08J 3/075(2006.01)i; C08F 220/56(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N, C08J, C08F

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

VEN; CNABS: 水凝胶, 切削, 切割, 显微, 膨胀, 硬度, expansion, microscopy, hydrogel, stiffness

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2018160629 A1 (UNIV HOUSTON SYSTEM) 07 September 2018 (2018-09-07) description, paragraphs [0008]-[0009], [0033]-[0034], [0056]-[0058]	1, 4-5
Y	WO 2018160629 A1 (UNIV HOUSTON SYSTEM) 07 September 2018 (2018-09-07) description, paragraphs [0008]-[0009], [0033]-[0034], [0056]-[0058]	2-3, 6-9
Y	WO 2015127183 A2 (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 27 August 2015 (2015-08-27) description, paragraphs [0008]-[0009], [0033]-[0034], [0056]-[0058]	2-3, 6-9
A	CN 104350372 A (THE BOARD OF TRUSTEES OF THE LELAND STANFORD JUNIOR UNIVERSITY) 11 February 2015 (2015-02-11) entire document	1-9
A	CN 105555812 A (LG CHEMICAL, LTD.) 04 May 2016 (2016-05-04) entire document	1-9
A	CN 108139408 A (MASSACHUSETTS INSTITUTE OF TECHNOLOGY) 08 June 2018 (2018-06-08) entire document	1-9

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
25 December 2019	**02 January 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	Authorized officer
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/088308

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2018160629	A1	07 September 2018	None			
WO	2015127183	A2	27 August 2015	JP	6456969	B2	23 January 2019
				JP	2017511883	A	27 April 2017
				EP	3108218	A2	28 December 2016
				EP	3108218	A4	15 November 2017
				JP	2019056708	A	11 April 2019
				US	10309879	B2	04 June 2019
				US	2016116384	A1	28 April 2016
CN	104350372	A	11 February 2015	AU	2013300171	A1	06 November 2014
				EP	2883030	A1	17 June 2015
				JP	2015533210	A	19 November 2015
				JP	6228205	B2	08 November 2017
				HK	1204677	A1	27 November 2015
				US	2015144490	A1	28 May 2015
				KR	20150043241	A	22 April 2015
				WO	2014025392	A1	13 February 2014
				IN	9073DEN2014	A	22 May 2015
				EP	2883030	A4	02 March 2016
				AU	2013300171	B2	14 September 2017
				CN	104350372	B	02 March 2018
				US	2017219465	A1	03 August 2017
CN	105555812	A	04 May 2016	US	9849439	B2	26 December 2017
				EP	3020737	A4	29 March 2017
				US	2016184799	A1	30 June 2016
				KR	20150040476	A	15 April 2015
				JP	6286055	B2	28 February 2018
				CN	105555812	B	24 November 2017
				JP	2016537490	A	01 December 2016
				EP	3020737	A1	18 May 2016
				WO	2015053538	A1	16 April 2015
CN	108139408	A	08 June 2018	EP	3332258	A1	13 June 2018
				CA	2994957	A1	16 February 2017
				WO	2017027368	A1	16 February 2017
				US	10317321	B2	11 June 2019
				US	2017089811	A1	30 March 2017

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/088308

A. 主题的分类

G01N 21/64(2006.01)i; C08J 3/075(2006.01)i; C08F 220/56(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N, C08J, C08F

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用）)

VEN;CNABS:水凝胶，切削，切割，显微，膨胀，硬度，expansion, microscopy, hydrogel, stiffness

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2018160629 A1 (UNIV HOUSTON SYSTEM) 2018年 9月 7日 (2018-09-07) 说明书[0008]-[0009]，[0033]-[0034]，[0056]-[0058]段	1，4-5
Y	WO 2018160629 A1 (UNIV HOUSTON SYSTEM) 2018年 9月 7日 (2018-09-07) 说明书[0008]-[0009]，[0033]-[0034]，[0056]-[0058]段	2-3，6-9
Y	WO 2015127183 A2 (MASSACHUSETTS INST TECHNOLOGY) 2015年 8月 27日 (2015-08-27) 说明书[0008]-[0009]，[0033]-[0034]，[0056]-[0058]段	2-3，6-9
A	CN 104350372 A (斯坦福大学托管董事会) 2015年 2月 11日 (2015-02-11) 全文	1-9
A	CN 105555812 A (株式会社LG化学) 2016年 5月 4日 (2016-05-04) 全文	1-9
A	CN 108139408 A (麻省理工学院) 2018年 6月 8日 (2018-06-08) 全文	1-9

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 12月 25日	2020年 1月 2日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 刘梅 电话号码 62084122

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/088308

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2018160629	A1	2018年 9月 7日		无		
WO	2015127183	A2	2015年 8月 27日	JP	6456969	B2	2019年 1月 23日
				JP	2017511883	A	2017年 4月 27日
				EP	3108218	A2	2016年 12月 28日
				EP	3108218	A4	2017年 11月 15日
				JP	2019056708	A	2019年 4月 11日
				US	10309879	B2	2019年 6月 4日
				US	2016116384	A1	2016年 4月 28日
CN	104350372	A	2015年 2月 11日	AU	2013300171	A1	2014年 11月 6日
				EP	2883030	A1	2015年 6月 17日
				JP	2015533210	A	2015年 11月 19日
				JP	6228205	B2	2017年 11月 8日
				HK	1204677	A1	2015年 11月 27日
				US	2015144490	A1	2015年 5月 28日
				KR	20150043241	A	2015年 4月 22日
				WO	2014025392	A1	2014年 2月 13日
				IN	9073DEN2014	A	2015年 5月 22日
				EP	2883030	A4	2016年 3月 2日
				AU	2013300171	B2	2017年 9月 14日
				CN	104350372	B	2018年 3月 2日
				US	2017219465	A1	2017年 8月 3日
CN	105555812	A	2016年 5月 4日	US	9849439	B2	2017年 12月 26日
				EP	3020737	A4	2017年 3月 29日
				US	2016184799	A1	2016年 6月 30日
				KR	20150040476	A	2015年 4月 15日
				JP	6286055	B2	2018年 2月 28日
				CN	105555812	B	2017年 11月 24日
				JP	2016537490	A	2016年 12月 1日
				EP	3020737	A1	2016年 5月 18日
				WO	2015053538	A1	2015年 4月 16日
CN	108139408	A	2018年 6月 8日	EP	3332258	A1	2018年 6月 13日
				CA	2994957	A1	2017年 2月 16日
				WO	2017027368	A1	2017年 2月 16日
				US	10317321	B2	2019年 6月 11日
				US	2017089811	A1	2017年 3月 30日