



(21) 申请号 201980026142.6

(22) 申请日 2019.02.19

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112041660 A

(43) 申请公布日 2020.12.04

(30) 优先权数据
62/710,576 2018.02.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.10.15

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/018631 2019.02.19

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/161406 EN 2019.08.22

(73) 专利权人 加利福尼亚大学董事会
地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 卢煜华 韩媛媛

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262
专利代理师 李健 武晶晶

(51) Int.Cl.
G01N 15/14 (2024.01)
G01N 15/01 (2024.01)
G01N 15/10 (2024.01)
G01N 21/00 (2006.01)
G06T 17/00 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2012078531 A1, 2012.03.29
CN 107209041 A, 2017.09.26
US 2017082531 A1, 2017.03.23

审查员 郑洁

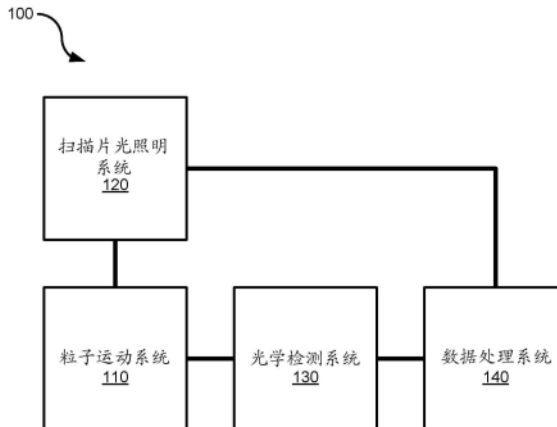
权利要求书3页 说明书23页 附图26页

(54) 发明名称

用于移动粒子三维成像的系统、装置与方法

(57) 摘要

公开了用于移动中的粒子的无相机、高吞吐量三维成像的方法、装置、系统以及应用。在一些方面,系统包括:粒子移动装置,以允许粒子沿着行进路径移动;光学照明系统,以在粒子的行进路径的范围中产生光的非对称照明区域,该光学照明系统在粒子移动的同时在多个时间点处扫描粒子的多个部分;光学检测系统,与粒子移动装置光学连接,以获得与在行进路径上的移动期间与粒子体积相对应的粒子不同部分相关联的光信号数据;以及数据处理单元,以处理由光学检测系统获得的光信号数据并产生包括指示粒子的3D特征的信息的数据。



1. 用于移动粒子的三维(3D)成像的系统,所述系统包括:

(i) 粒子移动装置,所述粒子移动装置包括配置为允许粒子在第一方向上沿着行进路径移动的基板;

(ii) 光学照明系统,所述光学照明系统配置为在粒子的所述行进路径的范围中产生光的非对称照明区域,所述光学照明系统在所述粒子正在移动的同时在多个时间点处扫描所述粒子的多个部分,

其中光的所述非对称照明区域包括一个比其他照明维度更薄以形成类似于照明平面的形状的照明维度,

其中所述光学照明系统包括:配置为产生光束的光源,所述光束与光重定向装置光学耦合,

其中所述光重定向装置配置为通过将所述光束重定向至不同的角度来修改所述光束,并且所述光重定向装置与一个或多个无源光学组件光学耦合,以将重定向的光塑形为照明移动中的粒子的光的所述非对称照明区域;

(iii) 光学检测系统,配置成在时间点检测粒子中的单独的点,从而允许在一对一的基础上进行空间到时间的映射,

其中所述光学检测系统与所述粒子移动装置光学连接,并且配置为获得在所述粒子沿所述行进路径移动期间与所述粒子的、对应于所述粒子的体积的不同部分相关联的光信号数据,

其中所述光学检测系统包括:一个或多个光电探测器和空间滤波器,其中所述空间滤波器位于所述粒子移动装置与所述一个或多个光电探测器之间,

其中所述空间滤波器包括多个孔,所述多个孔沿第二方向定位并与第一方向成一倾斜角排列,使得每个孔配置为过滤光的所述非对称照明区域以对应于所述粒子的体素,

其中所述第一方向的分辨率由所述多个孔中的孔之间的距离决定,而所述第二方向的分辨率由所述多个孔中的孔的数量决定;以及

(iv) 数据处理单元,与所述光学检测系统进行通信,所述数据处理单元包括处理器,所述处理器配置为处理由所述光学检测系统获得的所述光信号数据并产生包括指示所述粒子的3D特征的信息的数据,以从时域信号重构所述粒子的3D图像,

其中,所述光学照明系统配置成提供沿扫描轴的高速扫描。

2. 根据权利要求1所述的系统,其中,光的所述非对称照明区域在垂直于所述第一方向的第二方向上指向所述行进路径的所述范围,以使得光的所述非对称照明区域的第一扫描形成包括所述第一方向和所述第二方向的第一平面;以及其中,所述光学检测系统的图像平面沿着垂直于所述第一方向和所述第二方向的第三方向布置,以使得光的所述非对称照明区域的第二扫描形成与所述第一平面平行的且沿着所述第三方向随着与所述第一平面的距离而变化的第二平面。

3. 根据权利要求2所述的系统,其中,所述光学照明系统配置为:在所述粒子在所述第一方向上移动的同时,在第一时间点扫描所述粒子的、在所述第一平面中的第一部分,并在第二时间点扫描所述粒子的、在所述第二平面中的第二部分,从而产生空间上映射到所述粒子的时序信号。

4. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述数据处理单元配置为逐体素产生所述粒子的

3D图像。

5. 根据权利要求4所述的系统,其中,所述粒子的3D图像数据包括:在三个轴上的 $1\mu\text{m}$ 或更高的空间分辨率,以及在所述三个轴上的 $20\mu\text{m}$ 或更大的视场。

6. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述粒子移动装置包括:粒子流动池,包括在所述基板上形成的通道,以允许包含所述粒子的流体流经作为所述行进路径的所述通道。

7. 根据权利要求6所述的系统,其中,所述粒子在所述通道中的流速为至少 0.2ms^{-1} ,并且其中,所述系统配置为以每秒500个粒子或更大的吞吐量产生所述粒子的所述数据。

8. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述粒子被固定到所述基板,并且其中,所述粒子移动装置包括定位系统,所述定位系统配置为相对于所述光学照明系统和所述光学检测系统移动所述基板,以使得所述粒子沿着所述行进路径移动并被带入光的所述非对称照明区域被扫描的范围。

9. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述空间滤波器的所述多个孔以图案布置,其中,所述图案的每个孔沿着所述第一方向间隔开并且所述图案的每个孔的位置相对于所述图案的另一个孔沿着垂直于所述第一方向的第二方向变化。

10. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述光重定向装置包括声光偏转器(AOD)。

11. 根据权利要求10所述的系统,其中,所述AOD能够由所述数据处理单元编程来以至少 100kHz 的速度产生周期性角度变化。

12. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述光重定向装置包括扫描镜的多路复用阵列和/或扫描光栅的多路复用阵列。

13. 根据权利要求10至12中的任一项所述的系统,其中,所述一个或多个无源光学组件选自自由柱面透镜、透镜、棱镜和空间滤光器组成的组,以在所述行进路径上对重定向的光进行塑形。

14. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述一个或多个光电探测器包括光电倍增管。

15. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述光学检测系统还包括与所述光重定向装置光学耦合的物镜。

16. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述光学检测系统包括光学耦合至所述空间滤波器的物镜。

17. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述光学检测系统还包括一个或多个导光元件,以将所述光从所述空间滤光器引向多个光电检测器。

18. 根据权利要求17所述的系统,其中,所述光学检测系统还包括两个或更多个光电检测器,所述两个或更多个光电检测器配置为基于由细胞发射或散射的两个或更多个光带或两个或更多个类型的光来产生两个或更多个对应的信号。

19. 根据权利要求1所述的系统,其中,所述粒子包括活细胞。

20. 用于移动粒子的三维(3D)成像的方法,所述方法包括:

沿第一方向移动粒子;

在所述粒子移动的同时,通过将单独的光的非对称照明区域指向相应范围,逐部分地扫描所述粒子的多个部分;

通过空间滤波器对移动中的所述粒子的扫描部分上的光的所述非对称照明区域的部分进行空间滤波,所述空间滤波器包括多个孔,所述多个孔沿第二方向定位并与第一方向

成一倾斜角排列,使得每个孔配置为过滤光的所述非对称照明区域以对应于所述粒子的体素并允许通过所述空间滤波器的与所述粒子的体积相对应的某些光信号被检测到;以及检测在空间上滤波的光信号,以获得映射到检测时间点的三个维度中的单独的体素,其中所述第一方向的分辨率由所述多个孔中的孔之间的距离决定,而所述第二方向的分辨率由所述多个孔中的孔的数量决定。

21. 根据权利要求20所述的方法,还包括:

将由光源产生的光束修改为所述单独的光的非对称照明区域。

22. 根据权利要求20所述的方法,其中扫描所述粒子的所述多个部分包括将所述光束重定向到不同的角度,以及将重定向的光束塑形为光的非对称照明区域。

23. 根据权利要求20所述的方法,其中,第一单独的光的非对称照明区域在垂直于所述第一方向的第二方向上指向所述粒子的行进路径,以使得所述第一单独的光的非对称照明区域的第一扫描形成包括所述第一方向和所述第二方向的第一平面;以及其中,用于检测的图像平面沿着垂直于所述第一方向和所述第二方向的第三方向布置,以使得第二单独的光的非对称照明区域的第二扫描形成与所述第一平面平行的并且沿着所述第三方向随着与所述第一平面的距离而变化的第二平面。

24. 根据权利要求20所述的方法,还包括:

处理所述光信号,以产生包括指示所述粒子的3D特征的信息的数据。

25. 根据权利要求24所述的方法,包括:基于根据所产生的数据的逐体素构造来产生所述粒子的3D图像。

26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述粒子的所述数据包括:在三个轴上的 $1\mu\text{m}$ 或更高的空间分辨率以及在所述三个轴上的 $20\mu\text{m}$ 或更大的视场。

27. 根据权利要求24所述的方法,其中以每秒500个粒子或更大的吞吐量产生所述粒子的所述数据。

28. 根据权利要求20所述的方法,其中通过包括在基板上形成的通道的粒子流动池移动所述粒子,以使得包含所述粒子的流体沿所述第一方向流经所述通道。

29. 根据权利要求20所述的方法,其中所述粒子被固定到基板,并且通过定位系统移动所述基板,以使得所述粒子在所述基板上沿着所述第一方向移动。

30. 根据权利要求20所述的方法,其中所述粒子包括活细胞。

用于移动粒子三维成像的系统、装置与方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利文件要求于2018年2月16日提交的标题为“三维成像流式细胞术的系统、装置与方法 (SYSTEMS, DEVICES AND METHODS FOR THREE-DIMENSIONAL IMAGING FLOW CYTOMETRY)”的第62/710,576号美国临时专利申请的优先权和权益。上述专利申请的全部内容通过引用作为本专利文件的公开内容的一部分并入本文。

[0003] 联邦赞助的研究或开发

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院 (NIH) 的政府支持下完成的,批准号为DA045460。政府享有本发明的某些权利。

技术领域

[0005] 本专利文件涉及用于流式细胞术的技术与系统。

背景技术

[0006] 流式细胞术是用于在诸如活细胞等的粒子通过流体流动时检测和分析这些粒子的技术。例如,流式细胞术装置可用于当细胞和/或生化分子或分子簇以串行方式被询问时,基于细胞和/或生化分子或分子簇的光、电、声和/或磁响应来表征细胞和/或生化分子或分子簇的物理和生化特性。典型地,流式细胞术使用外部光源来询问粒子,从中可检测到由输入光和粒子之间的一种或多种相互作用(例如,前向散射、侧面散射和荧光)引起的光信号。通过流式细胞术测量的性质包括粒子的相对尺寸、粒度和/或荧光强度。

发明内容

[0007] 公开了与三维成像流式细胞术 (3D-IFC) 有关的方法、装置、系统和应用。

[0008] 在一些方面,用于对移动的粒子进行三维 (3D) 成像的系统包括:粒子移动装置,包括基板,用于允许粒子在第一方向上沿着行进路径移动;光学照明系统,用于在粒子的行进路径的范围中产生光的非对称照明区域,该光学照明系统在粒子移动的同时在多个时间点处扫描粒子的多个部分,光的非对称照明区域包括一个比其他照明维度更薄的形成类似于照明平面的形状的照明维度,该光学照明系统包括产生光束的光源,该光源与光重定向装置光学耦合,以通过重定向光束将光束修改至不同的角度,以使光的非对称照明区域指向粒子移动的行进路径;光学检测系统,与粒子移动装置光学连接,且可操作为获得在粒子沿行进路径移动期间与对应于粒子的体积的粒子不同部分相关联的光信号数据,其中光学检测系统包括:一个或多个光电探测器和位于粒子移动装置和一个或多个光电探测器之间的空间滤波器,该空间滤波器包括多个孔,以选择性地允许粒子的扫描部分上的光的非对称照明区域的一部分穿过空间滤波器并被一个或多个光电探测器检测到;以及数据处理单元,与光学检测系统进行通信,该数据处理单元包括处理器,其中,处理器配置为处理由光学检测系统获得的光信号数据并产生包括指示粒子的3D特征的信息的数据。

[0009] 在一些方面,用于对移动的粒子进行三维 (3D) 成像的方法包括:沿第一方向移动

粒子;在粒子移动的同时,通过将单独的光的非对称照明区域指向相应范围,逐部分地扫描粒子的多个部分;对移动中的粒子的扫描部分上的光的非对称照明区域的部分进行空间滤波,以允许检测通过空间滤波器的与粒子体积相对应的某些光信号;检测经过空间滤波的光信号,以获得映射到检测时间点的三个维度中的单独的体素。

[0010] 本专利文件和所附附录中描述的主题内容可以以提供以下一个或多个特征的特定方式来实现。

附图说明

[0011] 图1A示出了根据本技术的三维成像流式细胞术(3D-IFC)系统的示例性实施方式的框图。

[0012] 图1B示出了图1A所示的3D-IFC系统的数据处理系统的示例性实施方式的框图。

[0013] 图1C示出了根据本技术的3D-IFC系统的示例性实施方式的示意图。

[0014] 图1D示出了在图1C的对象平面处流动的细胞和位于图1C的图像平面处的空间滤波器的图示。

[0015] 图2示出了图示时域信号与包括空间光强度的空间信息之间的关系的原则的示意图。

[0016] 图3A和图3B示出了根据一些示例性实施方式的、来自示例性3D-IFC系统的时域信号的数据图。

[0017] 图4A至图4I示出了根据一些示例性实施方式的、由示例性3D-IFC系统捕获的2D图像和3D图像的数据图。

[0018] 图5A示出了根据本技术的3D-IFC系统的示例性实施方式的示意图。

[0019] 图5B示出了描绘沿着图5A的对象平面流动的细胞和位于图5A的图像平面处的空间滤波器的图示。

[0020] 图5C示出了由示例性3D-IFC系统的数据处理系统产生的3D重构空间的示例。

[0021] 图5D至图5F示出了根据一些示例性实施方式的、演示时间到3D空间映射的示例性3D-IFC系统的示例性输出。

[0022] 图6A至图6C示出了根据一些示例性实施方式的、使用与 $1\mu\text{m}$ 荧光珠绑定的被CFSE染色的HEK-293细胞的示例性3D-IFC系统的图像和数据图。

[0023] 图7A和图7B示出了根据一些示例性实施方式的、由示例性3D-IFC系统成像的荧光 γ H2AX病灶的图像和数据图。

[0024] 图8A至图8D示出了根据一些示例性实施方式的、描绘由示例性3D-IFC系统确定的白细胞细胞形态的图像和数据图。

[0025] 图9示出了根据一些示例性实施方式的、在示例性3D-IFC系统中使用的微流体系统的示例。

[0026] 图10示出了根据一些示例性实施方式的、用于空间滤波器设计的示例的示意图。

[0027] 图11示出了根据本技术的3D-IFC系统的示例性实施方式的示意图。

具体实施方式

[0028] 生物学的核心挑战是将一个群体中异质个体的表型与其基因型相关联,以了解他

们在多大程度上符合所观察到的群体行为或作为推动疾病的例外或成为对健康的威胁的能力而脱颖而出。虽然光学显微镜一直是研究生物标本的形态和分子组成的基础方法,但流式细胞术已成为许多生物医学应用中定量高吞吐量单个细胞表征的黄金标准。常规成像流式细胞术(IFC)是将光学成像的一些方面与流式细胞术相结合的技术。例如,IFC可同时地根据大量群体细胞中的各个细胞生成整体平均的测量结果和高含量的空间量度,而没有由于实验条件的变化而引起的干扰。但是,现有IFC系统的一个重要限制是,无论使用哪种光学检测方法和计算算法,都只能获得2D细胞图像。3D断层扫描的缺失会导致对象的遮挡、焦深导致的模糊、z轴空间分辨率下降以及由于将3D细胞投影到2D图像而导致的伪影。例如,对于2D显微成像,如果在细胞中心观察到荧光探针,则其位置(例如,膜、胞质溶胶、细胞核)是不明确的。对于与2D成像(其取决于定向到成像平面的细胞)相关的一些应用(例如,内化测量、探针共定位以及点计数)而言,3D图像可提供更完整、更准确的细胞和细胞器形态的表型以及核酸和蛋白质定位,以支持生物学见解,其中,2D成像取决于成像平面的细胞定位。因此,需要针对流动中的单个细胞进行快速且连续的3D图像采集。

[0029] 使用荧光显微镜的连续的、亚毫秒级的时间分辨率的需求仍未得到解决。流动中的成像细胞可对大量群体细胞快速地执行高吞吐量形态、易位和细胞信号分析。与单点流式细胞术相比,三维成像流式细胞术(3D-IFC)提供了关于荧光和/或散射光的3D空间分布的高含量信息,可用于高吞吐量稀有细胞检测和异质现象研究。

[0030] 公开了用于移动中的粒子的无相机、高吞吐量三维成像的方法、装置、系统和应用。在某些方面,例如,三维成像流式细胞术(3D-IFC)系统以片光荧光显微镜结构布置,其在单个平面照亮标本同时在垂直方向上检测信号,例如,通过空间滤波器。例如,3D-IFC系统可包括:在z方向上提供高速扫描的声光偏转器。例如,3D-IFC系统可包括单元素光电检测器,以检测通过每个信号通道中的空间滤波器的荧光光学信号,并从时域检测器输出中重构3D图像。3D-IFC系统集成了扫描片光、细胞的流动移动和空间滤波器,以使得检测器能够在一次检测细胞中的单独的点,这允许在一对一的基础上进行空间到时间的映射,即,所谓的时空转换。

[0031] 虽然用于移动粒子的三维成像的系统、方法和装置的一些公开的实施方式在本文描述为主要用于对流式细胞术进行成像,以促进对基本概念的理解,但是应当理解,所公开的实施方式也可包括用于通过其他方式或形式移动粒子的技术和系统,并可用于其他应用。

[0032] 当细胞/粒子/对象穿过(例如,通过流动、滑动、下落或其他机制)由光学照明区域定义的光学询问区域时,所公开的系统、方法和装置能够将移动中的对象(例如,细胞、粒子或其他对象)的3D特征逐像素地映射到检测器输出处的时序信号,其中,光学照明区域是指“片光”,即,快速扫描。在一些实施方式中,所公开的系统、方法和装置包括放置在光学检测器前面的空间滤波器/掩模,以仅允许从特定体积(例如,点体积)及在特定时间生成的光信号到达检测器。特定体积或特定时间点之外的信号会被空间掩模阻挡。

[0033] 图1A示出了根据本技术的、用于移动粒子的三维成像的被标记为100的系统的示例性实施方式的框图。系统100包括粒子移动系统110、与粒子移动系统110进行连接的扫描片光照明系统120、与粒子移动系统110进行连接的光学检测系统130以及与光学检测系统130和/或扫描片光照明系统130进行通信的数据处理系统140。在一些实施方式中,系统100

通过转换关于在空间和时间之间流动的样本的光学检测信息以根据所转换的信息构建三维图像,从而作为单点检测器进行操作。例如,当样本通过粒子移动系统110移动时,照明系统120没有将光聚焦在样本的单点上,而是沿着2D平面聚焦光,同时光学检测系统130基于空间滤波器图从平面照明样本周围的三维空间中检测单独的光点,该空间滤波器图具有仅允许某些部分光穿过的模式,以限制某些点信号进入检测器。这种光机械技术在二维(例如,平面“片光”)中构造三维物体上的光,同时在物体移动的同时扫描平面片光的经光学屏蔽的一维点。系统100能够以快速流速(例如,10cm/秒)产生粒子、细胞或其他移动中的物体的3D细胞断层图像,从而允许高吞吐量的3D成像。

[0034] 在系统100的一些实施方式中,粒子移动装置100包括允许粒子在第一方向(例如,移动方向)上沿行进路径移动的基板。扫描片光照明系统120配置为在粒子的行进路径的范围内产生片光,该扫描片光照明系统120在粒子移动的同时在多个时间点扫描粒子的多个部分。所产生的扫描片光是光的非对称照明区域,其包括一个比其他照明维度更薄的照明维度,以形成类似照明平面的形状。扫描片光照明系统120包括产生光束的光源(例如,激光),该光源光学耦合到光重定向装置,以通过将光束重定向到不同角度而修改光束,以使片光指向粒子移动的行进路径。光学检测系统130与粒子移动装置110在光学上进行连接,并且可操作以获取在粒子沿行进路径移动期间与粒子的不同部分相关联的光信号数据,其中,粒子的不同部分对应于粒子的体积。光学检测系统130包括一个或多个光电检测器和位于粒子移动装置110与一个或多个光电检测器之间的空间滤波器,其中,空间滤光器包括一个或多个孔,以选择性地允许粒子的扫描部分之上的光的非对称照明区域的一部分穿过空间滤波器并被一个或多个光电探测器检测。数据处理单元140与光学检测系统130(并且,在一些实施方式中,与扫描片光照明系统120)进行通信,并配置为处理由光学检测系统130获得的光学信号数据并产生包括指示粒子的3D特征的信息的数据。

[0035] 在一些实施方式中,粒子移动系统110在这样的相关实施方式中有时被称为“流动池”,其包括具有流体通道的基板,其中,该流体通道用于携带包含流动样本(例如,粒子、活细胞或其他对象)的流体样品。在一些实施方式中,粒子流动池系统包括流动聚焦系统,以向流体通道中的细流提供受限的样品流体。在一些实施方式中,流动池的流体通道配置为在询问范围中是光学透明的,从而允许清晰的光路。包含流动样本的流体沿着流动方向流经流体通道中的询问区域,其中成像系统120针对包括单个粒子或单个细胞的每个粒子获得光学数据。

[0036] 然而,在一些实施方式中,粒子移动系统110包括固定一个或多个粒子、细胞(或用于询问的其他对象)的基板,其中该基板相对于扫描片光照明系统120以及光学检测系统130而移动,使得粒子、细胞等被带入询问范围,在该询问范围照亮扫描片光,并且从该范围可以检测到处于和/或通过该粒子、细胞等的光。在这样的实施方式中,粒子移动系统110包括装置定位系统,该系统包括移动台(例如,由电机或其他驱动装置驱动)以移动基板,以使得固定在其上的粒子沿着行进路径移动并被带入在其上扫描片光的范围。

[0037] 在一些实施方式中,扫描片光照明系统120包括产生光的光源,该光将被构造为用于在粒子移动系统110的流体通道中流动的粒子上照明的片光。在一些实施方式中,光源包括激光器;和/或在一些实施方式中,光源包括高亮度LED或超发光二极管。照明系统120包括用于将由光源产生的光束重定向到不同角度的装置,该装置可被编程为以高速(例如,至

少100kHz至1MHz的范围)产生周期性角度变化。光束重定向装置可与无源光学组件(例如,圆柱透镜或其他光学组件,例如透镜、棱镜或空间滤光镜)光学耦合,以对重定向的光进行塑形并产生允许对移动中的粒子进行光学切片的结构化的片光照明。例如,照明系统120可用于在一次照亮粒子的薄片或细线,例如,粒子上的扫描片光。

[0038] 在一些实施方式中,例如,光重定向装置包括声光偏转器(AOD)装置。例如,AOD可以以高光学效率提供可控的、高速的光束角度变化,其中AOD移动光束的能量而不会损失光束部分。虽然AOD能够可靠地、快速地、高效地重定向光,但它是波长敏感的,并且对于在系统100的实现中要采用的波长不同的多个光束的一些应用而言可能不是最佳的。

[0039] 例如,在一些实施方式中,除了AOD或替代AOD,光重定向装置可包括不受波长限制的扫描镜的多路复用阵列和/或扫描光栅的多路复用阵列。例如,诸如扫描镜的单独的光学组件将提供大约20kHz的扫描速度;但是,扫描镜的多路复用阵列可配置为提供例如200kHz的高速。

[0040] 在一些实施方式中,光学检测系统130可以以与粒子、细胞等的行进路径正交的任何角度放置,例如,垂直于粒子流动池的具有清晰光学路径的流体通道。在一些实施方式中,光学检测系统130包括光电检测器和位于光电检测器的图像平面处的空间滤波器,以选择性地允许来自粒子的特定位置的光穿过,以用于光电检测器的检测。基于以下条件的组合,光学检测系统130可操作为基于(a)粒子的流动移动,(b)扫描片光照明,以及(c)空间映射滤波器的结合以顺序定时的方式从粒子的每个位置检测光强度(例如,包括荧光和散射)来检测3D对象在时间上的1D光学数据点。因此,由光学检测系统130的光电检测器记录的时域信号具有从空间到时间的一对一的关系。在一些实现中,光学检测系统130包括滤光器,以便收集和检测荧光与散射光。例如,光学检测系统130可包括用于检测荧光和/或散射光的多个通道的多个光电检测器。

[0041] 在一些实施方式中,空间滤波器包括表面,该表面具有在表面上以图案布置的多个孔(开口或狭缝)。在一些实施方式中,狭缝沿着粒子移动的第一方向和垂直于第一方向的第二方向间隔开,其中相邻狭缝的位置相对于图案的另一狭缝沿着第二方向变化。在一些示例中,孔可配置为其他几何图像和形状,例如,包括但不限于,正方形、矩形、梯形、三角形等,或者包括椭圆形、圆形等的其他弯曲形状。在各种实施方式中,可基于将由可检测的光信号构造的图像数据的期望分辨率来选择孔的尺寸。例如,孔的直径或长度可以由指向图像平面的光的放大强度乘以期望的分辨率来确定。在一个示例中,如果期望的分辨率是1 μm 并且检测模块170的物镜是20x,则狭缝将配置为具有20 μm 的直径。类似地,例如,如果期望的分辨率是0.5 μm 并且检测模块170的物镜是50x,则狭缝将配置为具有25 μm 的直径。在一些实现中,例如,相对较小的孔(相对于粒子的尺寸)有效地允许将检测到的光作为增量函数进行处理。

[0042] 数据处理系统140配置为处理检测到的光信号数据并产生指示粒子、细胞等的三维特征的数据(例如,数据集),从中可构建粒子、细胞等的3D图像或密度分布。例如,数据可表示3D空间中的光密度分布,这与从常规3D成像模式(例如,共焦显微镜)获得的3D图像有很大不同。在一些实施方式中,数据处理系统140包括与光学检测系统130进行通信的数据流传输单元。数据处理系统140可包括处理器和存储器(数据处理单元),以根据在光学检测系统130捕获的检测到的光学信号数据来为每个粒子重构3D图像。在一些实现中,例如,图

像重构算法驻留在数据处理单元上,该数据处理单元包括照明和检测协议的规范并相应地控制扫描片光照明系统120和光学检测系统130。在一些实施方式中,数据处理系统140包括图像处理单元,以处理图像数据来确定与粒子相关联的性质。

[0043] 图1B示出了示例性系统100的数据处理系统140的示例性实施方式的框图。在各种实现中,数据处理系统140体现在一个或多个个人计算装置(例如,包括台式或膝上型计算机)、可通过因特网(称为“云”)(包括云中的服务器和/或数据库)访问的计算机系统或通信网络中的一个或多个计算装置,和/或一个或多个移动计算装置,例如,智能手机、平板电脑或可穿戴式计算机装置(包括智能手表或智能眼镜)上。数据处理系统140包括处理器和存储器,其中,处理器用于处理数据,存储器与处理器进行通信以存储和/或缓冲数据。例如,处理器可包括中央处理单元(CPU)或微控制器单元(MCU)。在一些实现中,处理器可包括现场可编程门阵列(FPGA)或图形处理单元(GPU)。例如,存储器可包括并存储处理器可执行代码,当由处理器执行处理器可执行代码时,配置数据处理系统140执行各种操作,例如,诸如接收信息、命令和/或数据、处理诸如来自系统100的信息和数据,以及将处理后的信息/数据传输或提供给诸如致动器或外部显示器的另一装置。为了支持数据处理系统140的各种功能,存储器可存储信息和数据,例如,指令、软件、值、图像以及由处理器处理或引用的其他数据。例如,各种类型的随机存取存储器(RAM)装置、只读存储器(ROM)装置、闪存装置以及其他合适的存储介质可用于实现存储器的存储功能。在一些实现中,数据处理系统140包括输入/输出(I/O)单元,以将处理器和/或存储器连接到其他模块、单元或装置。在一些实施方式中,例如对于移动计算装置来说,数据处理系统140包括无线通信单元,例如,诸如发射机(Tx)或发射机/接收机(Tx/Rx)单元。例如,在这种实施方式中,I/O单元可诸如利用与典型数据通信标准兼容的各种类型的无线接口将处理器和存储器与无线通信单元连接,其可用于数据处理系统140与其他装置的通信中,例如,在云中或用户装置中的一个或多个计算机之间。数据通信标准包括但不限于蓝牙、蓝牙低功耗(BLE)、Zigbee、IEEE 802.11、无线局域网(WLAN)、无线个人局域网(WPAN)、无线广域网(WWAN)、WiMAX、IEEE 802.16(全球微波访问互操作性(WiMAX))、3G/4G/LTE/5G蜂窝通信方法以及并行接口。在一些实现中,数据处理系统140可使用经由I/O单元的有线连接与其他装置进行连接。数据处理系统140还可以与其他外部接口、数据存储源和/或视觉或音频显示器等进行连接,以检索和传送可由处理器处理、存储在存储器中、或者在显示装置或外部装置的输出单元上展示的数据和信息。

[0044] 图1C示出了根据系统100的一些实施方式的3D-IFC系统150的示例性实施方式的图。如图所示,3D-IFC系统150包括粒子流动池151,该粒子流动池151包括与片光照明模块160和检测器模块170连接的、用于携带流体样品的流体通道,其中,流体样品包含流动样本(例如,粒子,活细胞等)。片光照明模块160包括光学耦合到柱面透镜161的声光偏转器(AOD)165以及物镜(OL)163,它们布置在具有光源169(例如,激光器,诸如488nm激光器)的光学照明路径中。例如,柱面透镜161放置于AOD 165之后,以将光聚焦(例如,使激光束聚焦)在一个方向上以形成扫描片光。对于每个频率,AOD都会产生不同角度的偏转一阶光束,因此会随时间产生扫描。包括空间滤波器(SP)171的检测器模块170布置在与流动系统151连接的物镜172和光学光电检测器179(例如,光电倍增管(PMT))之间的光学检测路径中,以从流动对象(例如,细胞、粒子等)捕获光学信号数据。在一些实现中,检测器模块170检测光学信号数据的一个或多个特定光谱范围。同样地,在图1C所示的一些实施方式中,例如,检

测器模块170包括：在分光路中光学耦合到二向色镜 (DM) 173 (其中，二向色镜 (DM) 173 光学耦合到带通滤波器 (BP) 175) 的空间滤波器171以及光电探测器179 (例如, PMT)。例如, 可垂直于检测进行照明。空间滤波器171被放置在图像平面处。在一些实施方式中, 3D-IFC系统150包括透镜或光导, 以在系统的另一组件的指定位置聚焦和/或引导光。在一些实施方式中, 例如, 通过诸如每个通道数字记录装置每秒100兆采样 (MS/s) 来收集PMT信号。

[0045] 在一些示例性实施方式中, 将3D-IFC系统150以片光荧光显微镜构造布置, 其在单个平面上照亮流动样本, 同时在垂直方向上检测到信号。声光偏转器 (AOD) 165可在z方向上提供高速扫描。诸如PMT 179的单元素光电探测器检测通过每个通道中的空间滤波器171的荧光, 并由时域检测器输出重构图像。结合扫描片光、细胞的流动移动以及空间滤波器, 检测器一次仅检测细胞中的单独的点, 从而可进行空间到时间的转换。

[0046] 图1D示出了描绘沿着对象平面流动的示例性流动样本 (例如, 细胞) 和位于图像平面处的空间滤波器171的图示。在一些实施方式中, 空间滤波器171包括具有以图案 (例如, 狭缝) 布置的多个孔 (开口) 的表面, 其中图案的每个孔沿y轴 (平行于流动方向) 间隔开, 并且相对于图案的另一个孔, 图案的每个孔的位置沿x轴 (垂直于流动方向) 变化, 以使得沿y轴的每个孔沿x轴处于不同位置。在图1D所示的示例性空间滤波器171中, 孔包括直径约20 μ m的圆形 (例如, 椭圆或圆) 狭缝。

[0047] 如图所示, 平面片光是在x-y平面中创建的, 其中沿y轴 (粒子流向) 定义光的宽度, 而x轴 (照明方向) 是光的权重。在该图中, z轴是由AOD 165控制的扫描轴。在一些实现中, 片光的厚度 (z轴) 约为1 μ m。当细胞在通道中移动时, 沿y轴执行对细胞的光学点扫描; 并且由空间滤波器图171完成x轴扫描。在该示例中, 在z方向上进行扫描, 由片光照明模块160产生的片光具有0.6 μ m的腰部 (z方向) 和在y方向上的250 μ m的长度。该空间滤光器具有十个20 μ m (x方向) 乘以10 μ m (y方向) 的狭缝, 这些狭缝以一个接一个的方式分开放置。

[0048] 图2A至图2D示出了表明时域信号 (右) 与在被描绘为3D空间中的立方体的空间信息 (左) 之间的关系图, 示出了空间光强度。图2A示出了表示3D对象 (在示例中的球形) 的光强度的来自3D-IFC的时域信号的示例; 每个时间点对应于3D空间中的特定体素。图2B示出了表示整个3D对象的xy平面投影的信号的范围的示例。图2C示出了其中突出显示的每个部分表示3D空间的一个yz平面部分的光强度的示例。在这些示例中, 每个部分的持续时间是对象在对象平面中行进20 μ m的时间, 该时间等于图像沿着空间过滤器通过一个狭缝到另一个狭缝的时间。图2D示出了其中突出显示的一个单峰表示z方向上一行的光强度的示例, 其中片光进行一个扫描周期。

[0049] 以下等式可用于描述系统100的实施方式的一些方面。例如, 当发送到声光偏转器 (AOD) 的声换能器的声频以正弦形式变化时, z方向上的片光的位置f (t) 可描述为

$$[0050] \quad f(t \in (0, T/2)) = v_1 t$$

$$[0051] \quad f(t \in (T/2, T)) = 2z_0 - v_1 t \quad (1)$$

[0052] 例如, 如果声频以锯齿波的方式变化, 则f (t) 可描述为

$$[0053] \quad f(t) = v_1 t, \quad (2)$$

[0054] 其中, T是扫描周期, v_1 是z方向的扫描速度, z_0 是z方向上片光的腰部。

[0055] 片光照明I (x, y, z, t) 可以写成

$$[0056] \quad I(x, y, z, t) = C \cdot e^{-\frac{(z-f(t))^2}{\sigma^2}} \approx C \cdot \delta(z - f(t)) \quad (3)$$

[0057] 空间滤波器的特征函数 $F(x, y)$ 设计为

$$[0058] \quad F(x, y) = \sum_{q=1}^N \delta(x - q) \cdot \delta(y - qL), \quad (4)$$

[0059] 其中 $x=1, 2, \dots, N$ 是空间滤波器上的狭缝的数量, L 是 y 方向上的狭缝长度。

[0060] 测得的PMT信号 $S(t)$ 可以表示为

$$[0061] \quad S(t) = \int_{x,y,z} \text{Cell}(x, y - Mv_2t, z) I(x, y, z, t) F(x, y) dx dy dz = \int_{x,y} \text{Cell}(x, y - Mv_2t, f(t)) F(x, y) dx dy \quad (5)$$

[0062] 其中, M 是检测系统的放大倍数, $\text{Cell}(x, y, z)$ 是3D细胞荧光强度分布图。

[0063] 该示例性方法在一对一的基础上将3D细胞图像映射到时域光强度中。

[0064] 系统100的示例性实施方式的实现可用于诸如活细胞的生物样本的成像与特征描述。例如,单个细胞可以在流动池试管内以 0.1m/s 的速度流动的悬浮液中成像。在本文描述的示例性实施方式中,已经成像的一些单个细胞样品包括被CellTrace CFSE染色的HEK293T细胞,其中, $1\mu\text{m}$ 荧光珠与HEK293T细胞的细胞膜绑定。

[0065] 图3A和图3B示出了来自示例性3D-IFC系统150的时域信号的数据图的示例。对象(即,被CellTrace CFSE染色的HEK293T细胞,其细胞膜上绑定了 $1\mu\text{m}$ 荧光珠)可以以 0.1m/s 的速度流动。在图3A中,数据图示出了从一个通道(例如,520/40nm带通)的PMT输出的时域数据,图3B示出了从另一通道(例如,650nm长通)的PMT输出的时域数据。检测到的包络可用于重构细胞的2D图像。图3A和图3B的数据图示出了以3D-IFC系统150为例的细胞的时域信号裁剪。在这些示例性实现中,在 z 方向上在 $25\mu\text{m}$ 的范围内以 200kHz 扫描片光。

[0066] 图4A至图4I示出了由示例性3D-IFC系统150捕获的HEK293T细胞的2D图像和3D图像的示例性数据图,其中,HEK293T细胞被CellTrace CFSE染色,且其细胞膜上绑定了 $1\mu\text{m}$ 荧光珠。在图4A至图4C中,数据图示出了分别示出绿色通道(401)、红色通道(402)和重叠(403)图像数据的2D图像,其中,2D图像是由示例性3D-IFC系统150捕获和重构的。在这些数据图中,比例尺代表 $5\mu\text{m}$ 。在图4D至图4F中,数据图示出了3D重构图像,该3D重构图像示出了由示例性3D-IFC系统150产生的绿色通道(404)、红色通道(405)以及合并的(406)3D重构图像数据。在这些数据图中,立方体笼表示 $20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ 的空间。图4G至图4I示出了3D图像的绿色通道(透视图407-411)、红色通道(透视图412-417)和重叠(透视图418-423)中的3D成像细胞的六种不同的2D透视图。如3D重构图像所示,不同视角的2D透视图具备不同的特征。

[0067] 图4A至图4I中所示的3D图像展示细胞膜上有四个荧光珠,但是2D图像包含关于珠的数量的不清楚信息。在流动系统中,几乎无法控制对象的定向,因此捕获仅具有一个视角的2D图像会产生检测误差,尤其是在相对位置很重要的情况下。由于生物样本本质上是三维的,因此捕获3D图像提供关于样本的完整信息。

[0068] 描述了用于实现和/或制造示例性3D-IFC系统150的示例性方法。在上述示例性实现中,使用了 100mW 488nm 激光器(iBeam-SMART, Toptica),该激光器具有高斯能量分布的椭圆形光束,该光束经过准直、聚焦后扩展,以照亮 $1.2\mu\text{m}$ (z 方向)乘以 $250\mu\text{m}$ (y 方向)的区域。由模块化、扫频射频电源(Isomet)驱动AOD(Isomet)被用于在不同时间产生具有不同输出角度的偏转激光束,并因此在 z 方向上扫描激光束。使用柱面透镜和 $10 \times / 0.25$ 物镜来

形成片光。通过10×/0.25物镜(Mitutoyo)收集来自样品的荧光发射,并由每个通道的一个PMT(Hamamatsu)检测来自样品的荧光发射。PMT读数由PCIE DAQ卡(Advantech)记录。

[0069] 空间滤波器的制造可包括以下技术。空间滤波器的设计在AutoCAD中绘制,并以每英寸20,000点(dpi)的速度打印到透明掩模上。在6英寸玻璃晶片上以每分钟3,000转(rpm)的速度旋转一层负性光刻胶(NR9-1500PY,Futurrex,Inc.)。将晶片在150℃的热板上加热3分钟,然后通过透明掩模暴露于UV光(EVG620NT, EV Group)。紫外线照射后,将晶片在100℃下再烘烤3分钟,之后在RD6(Futurrex, Inc.)中显影12秒。将300nm厚的铝膜溅射到玻璃晶片上。在金属剥离之后,形成了空间滤波器的图案,并将玻璃晶片切成12mm乘以12mm的片。为了帮助将空间滤波器固定在流式细胞术系统中,将具有十个20μm乘以10μm的狭缝的空间滤波器安装到通过3D打印方法制造的样品架上。

[0070] 细胞样品的制备可包括以下技术。将HEK293T人胚肾细胞样品在10cm培养皿中用培养基(DMEM,10%胎牛血清,1%青霉素链霉素)培养至90%融合。100倍稀释储备溶液中的1.0μm荧光珠(Ex/Em:488/645nm,T8883,Thermo Fisher)后,将100μL稀释后的溶液与10mL新鲜细胞培养基混合并添加到细胞培养板中。连续培养10小时后,用4%多聚甲醛收获并固定HEK293T细胞,在1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)中洗涤并重悬。固定后,将细胞用CellTrace CFSE细胞增殖试剂盒(Ex/Em:492/517nm,Thermo Fisher)进行染色。在每次成像实验之前,将悬浮液在PBS中稀释至200个细胞/μL的浓度。

[0071] 所公开的3D-IFC系统和方法的示例性应用可包括以下内容。

[0072] DNA损伤:当电离辐射或细胞毒性化学试剂引起DNA损伤,形成双链断裂(DSB)时,磷酸化蛋白γ-H2AX病灶迅速形成并以1:1的方式表示DSB。使用针对γ-H2AX的抗体,通过流式细胞术和免疫荧光显微镜对γ-H2AX进行的检测和可视化来评估DNA损伤、相关的DNA损伤蛋白以及DNA修复。2D成像技术和手动量化已被许多研究人员广泛使用。然而,根据2D图像计数病灶的数量不仅劳动强度大,而且当病灶数量大并且在一个角度上发生重叠时是不可靠的。与2D技术相比,以高吞吐量获得3D空间分辨率对于分析γ-H2AX的数量、面积和密度具有显著优势。例如,本文所述的3D-IFC系统150的示例性实施方式可提供适合于γ-H2AZ病灶定量的高吞吐量细胞仪。

[0073] FISH:荧光原位杂交(FISH)可有效地检测和定位染色体上特定DNA序列的存在或不存在,并在疾病诊断和预后评估中达到高精度。FISH信号分析通常在2D显微图像上进行。但是,当两个探测到的FISH信号在深度方向上易位的投影图像平面中重叠时,可能会发生检测误差。对于早期或细微的疾病,检测少量异常细胞会使诊断有差异,这种检测误差可能是至关重要的。本文描述的3D-IFC系统150的示例性实施方式可适合于FISH信号的3D可视化,并可提高针对一些临床病例的分析的整体准确性。

[0074] 内化/内吞作用:许多细胞处理过程,例如,(1)吞噬细胞识别、结合、内化并消除病原体 and 细胞碎片;(2)细胞抗体的摄取和呈递;(3)细胞外来体和其他纳米粒子的吸收;(4)通过测量内化来评估细胞药物的摄取和加工。2D宽视场显微图像或成像细胞计数图像只提供关于相对位置的不完整信息。例如,从2D显微图像来看,如果观察到粒子正好位于细胞的中心,则很难分辨粒子是在细胞膜上(在细胞的顶部)或者粒子是在细胞质内或者甚至是在细胞核中。相反,人们在多个焦平面上拍摄图像来解决此类问题。本文所述的3D-IFC系统150的示例性实施方式可针对这些内化研究执行连续的高吞吐量分析。

[0075] 描述了无相机、高吞吐量3D-IFC系统、方法和装置的进一步实施方式和实现,其用于基于光学部分显微镜对流动中的单个细胞的3D荧光和暗场图像的捕获对诸如细胞的对象进行成像。所公开的无相机、高吞吐量3D-IFC系统和方法提供了以约为每秒500个细胞的吞吐量共同捕获流动中的单个细胞的3D荧光和无标记侧向散射图像的能力。

[0076] 例如,在一些示例性实现中,高吞吐量3D-IFC系统利用片光扫描照明技术和时空转换检测技术,使得无需照相机即可实现由单元素光电探测器读数实现荧光和无标签的3D细胞图像重构。在示例性实现中,利用光电倍增管(PMT)的速度和灵敏度优势,示例性3D-IFC系统使用多种扫描技术以在流式细胞术体系结构中添加空间信息。3D成像可通过穿过第一(z-)轴上激光扫描、流动穿过第二(y-)轴的细胞转变以及沿第三(x-)轴布置的多个针孔的使用,以从每个细胞60,000个体素中产生荧光和无标签信息。通过精确地将时间映射到空间,一个时间点的光电探测器读数对应于3D空间中的一个体素。下文描述的示例性结果示出以对应于每秒大约500个细胞的吞吐量的 $0.2\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 的速度流动的单个细胞的荧光和90度无标记侧向散射(SSC)成像的3D-IFC。

[0077] 图5A示出了根据系统100的一些实施方式的、标记为550的3D-IFC系统的另一示例性实施方式。如图所示,3D-IFC系统550包括流动系统551,该流动系统551包括用于承载流体样品的流体通道,其中,流体样品包含与3D-IFC系统550的片光照明模块560和检测器模块570连接的流动样本(例如,粒子、活细胞等)。片光照明模块560包括:光学耦合的柱面透镜(CL)561和声光偏转器(AOD)565以及照明物镜(IO)563(例如50X/0.55照明物镜),布置在具有光源569(例如,激光器)的光学照明路径上。柱面透镜561放置在AOD 565之后,以在一个方向上(例如,使激光束聚焦)聚焦光,以形成扫描片光。例如,在一些实施方式中,片光照明模块560包括在柱面透镜561和AOD 565之间的镜元件564,以在保留光路的同时允许照明模块560的组件的各种位置的布置,以在流动样品上传递光。在一些实施方式中,针对每个频率,AOD 565以不同角度产生偏转的一阶光束,并因此随时间产生扫描。在一些实现中,在进入正方形横截面石英流动池之前,通过鞘对流体样品进行2D流体动力学聚焦,参考图9进一步进行讨论。

[0078] 检测器模块570包括空间滤波器(SP)571,布置在检测器物镜(DO)572(例如,10X/0.28检测物镜)与光学光电检测器579之间的光学检测路径中,以捕获来自流动物体(例如,细胞、粒子等)的光信号数据,其中,检测器物镜(DO)572与流动系统551连接。空间滤波器571放置在光电检测器579的图像平面处。例如,光电检测器579可配置为包括一个或多个光电检测器(例如,诸如光电倍增管(PMT)),以使得检测器模块570检测光信号数据的特定的光谱范围。如图5A所示,在一些实施方式中,例如,检测器模块570包括光学耦合的一个或多个二向色镜(DM)573和空间滤波器571,其中,二向色镜(DM)573在分离光路中光学耦合至对应的光电检测器579(例如,PMT)。在一些实施方式中,系统550配置成在分离光路中利用光电检测器579将一个或多个二向色镜(DM)573光学耦合至对应的带通滤波器(BP)175。例如,如图5A所示,流动样本的照明配置为垂直于检测定向。在一些实施方式中,3D-IFC系统550包括透镜或光导,以在系统的另一组件的指定位置聚焦和/或引导光。

[0079] 3D-IFC系统550包括数据处理系统140的示例性实施方式,其包括与数字转换器(DIG)580(例如, $125\text{MS} \cdot \text{s}^{-1}$)连接的处理单元(例如,包括处理器和存储器),数字化地处理检测器模块570的示例性PMT的输出信号。

[0080] 在3D-IFC系统550的示例性实现中,悬浮细胞可在具有正方形横截面的石英流动池中形成2D流体动力学聚焦的单行,在图9中进一步详细示出。在图5A的示例中,通过激光激发形成流动池551(例如,具有衍射受限的束腰并且高度为 $200\mu\text{m}$ 至 $400\mu\text{m}$)上的片光(x-y平面),以非常高的速率(例如, 200kHz)在z方向上进行扫描。例如,当粒子或细胞以 $0.2\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 的速度处流过整个光学询问时,像素化视场由具有X乘以Y乘以Z体素的3D空间表示,如图5C所示。

[0081] 图5B示出了描绘沿着对象平面流动的示例性流动样本(例如,细胞)的光学询问区域和位于图像平面的空间滤波器571的图示。空间滤波器571包括具有以图案布置的多个孔的表面,其中,该图案的每个孔沿y轴(平行于流动方向)间隔开,并且其位置相对于图案的另一个孔沿x轴(垂直于流动方向)发生变化。如图5B所示,H表示片光的高度; θ 表示流量(y轴)和垂直线之间的倾斜角。照明片光在z轴上水平地传播并扫描,样品在y轴上流动,x是正交轴。

[0082] 图像平面处的空间滤波器使用针孔在x轴上产生线扫描。例如,空间过滤器上的针孔阵列与流动蒸汽呈倾斜角度 θ 排成一列,因此针孔阵列也沿x方向行进。以这种方式,每个针孔允许来自具有不同的x-指数的体素的光传递到PMT检测器(例如,稍后在本公开讨论该示例性掩模的细节)。当在空间滤波器的第一个针孔处出现流动的细胞时,成像过程开始。在第一片光扫描期间(例如, $5\mu\text{s}$),收集具有 x_1y_1 指数的体素 z_{1-z} 的光强度。随着细胞在y中顺流而下流动到下一个位置 x_1y_2 ,生成相应的体素 z_{1-z} 。重复此过程,直到当整个2D yz-部分在 x_1 处成像时细胞完全地通过针孔1。随着细胞在y方向(例如,流动方向)上向下游移动,其到达接下来的针孔并记录在 x_2 到 x_x 处的yz-部分。例如,参见图5C。

[0083] 图5C示出了由3D-IFC系统550的数据处理系统产生的3D重构空间的示例。从该处理来看,例如,X-轴上的分辨率由针孔的数量(例如,在x方向上的像素化视场)确定;Y-轴的分辨率由两个狭缝之间的距离(例如,y方向上的像素化视场)确定;以及Z-轴的分辨率由片光扫描范围(例如,z方向上的像素化视场)确定。

[0084] 图5D至图5F示出了3D-IFC系统550的示例性输出。在系统550的示例性实现中,检测到的时域多参数信号(例如,多色荧光、FL1和FL2,以及侧向散射、SSC、光强度)与AOD驱动器的调谐电压的参考输出同步,其中,参考输出表示检测到的体素的z-位置。例如,以 200kHz 的扫描速率,在 $5\mu\text{s}$ 的时间段内,从时域信号恢复z轴上的一维(1D)强度分布(例如,参见图5D)。在针孔之间约为 $100\mu\text{s}$ 的细胞行进期间,执行约20个激光扫描周期,并从PMT读数中恢复yz平面2D图像阵列(例如,参见图5E)。随着细胞穿过整个询问区域,恢复2D yz平面图像的堆栈,并重构最终的3D图像,其中有序的针孔数指示体素的x-位置。在图5F所示的示例中,对应于每秒500个细胞的吞吐量,一个10针孔的空间滤波器产生十个2D yz平面图像以及1ms的信号长度。在该实现中,示例性系统550中使用的PMT和数字转换器的带宽(例如, 150MHz 和 125MHz)分别支持每个3D细胞图像60000个体素的吞吐量。将3D空间中的每个 $20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}\times 20\mu\text{m}$ 的3D单元图像调整为 $100\times 100\times 100$ 像素的大小,用于3D图像分析和定量测量。

[0085] 为了测量通过时空变换进行图像重构的每个细胞的速度,将针孔的上游和下游的成对的狭缝添加到光学空间滤波器中(参见图10)。穿过检测区域的细胞的测量的速率以及片光扫描速率的已知频率确保3D-IFC图像中的每个体素具有不同的时域值,并且所有体素

都可以从单元素PMT及时谨慎地捕获。然后根据时域信号重构3D细胞图像。

[0086] 图5D描绘了在z轴上产生一维光强度分布的一个片光扫描周期。一个时间点的PMT电压读数对应于z轴上一个体素的光强度。

[0087] 图5E描绘了当对象沿y轴行进时,多次扫描在一个针孔扫描周期内在yz平面产生2D轮廓。每个部分(用虚线分隔)对应于2D图像堆栈中一行的光强度。

[0088] 图5F描绘了当对象完全地穿过空间滤波器覆盖区域时,时域信号包含xyz空间中的3D轮廓的完整信息。每个部分对应于一个2D图像部分。在图5F中,AOD是指AOD驱动器的调谐电压;FL1是指荧光检测通道1的PMT读数;FL2是指荧光检测通道2的PMT读数;SSC是指侧向散射光检测通道的PMT读数。

[0089] 例如,为了证明3D-IFC系统550的细胞成像能力,以 $0.2\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ 的流速对悬浮的单个细胞进行成像。系统550的示例性实现产生了哺乳动物细胞的示例性图像数据,包括双色荧光和未标记的暗场(侧向散射)3D图像。对于示例性实现,用细胞内羧基荧光素染料(CFSE)对HEK293细胞进行染色,并用随机数量的 $1\mu\text{m}$ 荧光羧酸酯修饰的聚苯乙烯珠绑定HEK293细胞。

[0090] 图6A至图6C示出了使用被CFSE染色的HEK-293细胞的3D-IFC系统550的示例性实现的图像和数据图,其中,被CFSE染色的HEK-293细胞与 $1\mu\text{m}$ 荧光珠绑定。图6A描绘了恢复的2D yz平面图像的示例以及CFSE荧光、珠以及SSC(下排)的聚合的3D表面渲染视图。图6B描绘了与珠绑定的细胞的3D图像和直方图检测事件的示例。3D空间中的相对位置关系指示3D-IFC中的粒子计数与细胞定向无关。在细胞与四个珠绑定的示例中,特定角度的遮挡可能是利用2D图像进行粒子计数的误差来源。图6C描绘了基于强度的3D SSC图像处理的示例。图6C的左列示出了图7A中所示的细胞的3D SSC图像的强度直方图。 $P(x, y, z)$ 是使用3D荧光图像所确定的尺寸为 $1\mu\text{m}$ 的珠的位置;在每个珠的位置的 $\pm 1\mu\text{m}$ 区域内,可找到3D SSC图像中的局部强度峰值。在图6C中,比例尺代表 $5\mu\text{m}$ 。在示例性实现中,流速为 $0.2\text{m}/\text{s}$ 。CFSE是细胞内羧基荧光素染料,其中Ex/Em:488/517;珠是羧酸盐修饰的荧光微球,其中Ex/Em:488/645;以及SSC是90度侧向散射。

[0091] 参照图6B,注意到,虽然2D珠图像重叠,但是3D-IFC从重构的3D图像中解析出精确的粒子数量,这对于一些定位和共定位特征是重要的。在流动系统中,细胞及其内部结构是随机定向的,因此,2D图像可能源于不利的观察视角。然而,使用所公开的3D-IFC系统,可通过3D-IFC细胞断层摄影术获得多个视角,这可以提供改善的相对位置关系和点计数结果,这有利于机器视觉和人类可视化。例如,使用侧向散射暗场成像模式,3D-IFC系统550产生了散射光的3D空间分布。当对象被可见光照亮时,折射率变化将散射光,并且散射范围的尺寸和折射率分布决定散射光的分布。3D SSC图像表示流体(PBS, $n\sim 1.335$),细胞($n\sim 1.3-1.6$)以及聚苯乙烯珠($n\sim 1.6$)之间的那些折射率(n)变化的空间分布。如图6C所示,基于强度的高通滤波的SSC图像指示细胞体积,并且高通滤波的SSC图像与珠的荧光图像相关。

[0092] 所公开的3D-IFC系统能够获得常规成像流动系统实际上无法获得的信息。以下面为例。当电离辐射或细胞毒性化学剂以双链断裂(DSB)的形式引起DNA损伤时,磷酸化的蛋白质 γ -H2AX(γ H2AX)以1:1的方式在DSB处形成病灶。通过抗 γ -H2AX免疫标记,病灶反映DNA损伤和DNA修复能力。现今使用2D成像技术和手动定量,但是由于视角依赖性,从2D图像进行病灶计数是劳动密集型的并且是不可靠的。为了评估3D-IFC系统的病灶计数,可以在

6Gy的 γ 射线照射后对CMK3细胞中免疫标记的 γ H2AX病灶成像(例如,多形性胶质母细胞瘤细胞系)。代表性的细胞图像在图7A和图7B中显示。此示例性数据显示, γ H2AX病灶的数量与荧光强度无关,因此,使用常规流式细胞术指标的基于强度的测量很难反映DNA损伤。相反,3D-IFC系统550能够准确、快速地分析 γ H2AX阳性病灶的数量。

[0093] 图7A和图7B示出了描绘由3D-IFC系统550成像的荧光 γ H2AX病灶的示例性结果的图像和数据图。图7A示出了被CFSE和缀合了PerCP/Cy5.5的 γ H2AX抗体染色的放射损伤的胶质母细胞瘤CMK3细胞的代表性3D图像;及其在 $x=10\mu\text{m}$ 处的两色荧光2D yz 平面合并图像部分。3D图像的高质量示出了3D-IFC适合于DNA损伤病灶相关的研究。图7B示出了 γ H2AX强度和病灶计数中的917个检测事件的散点图的示例,以及在散点图中的标记范围(i)-(iv)内的细胞图像。数据显示,病灶计数与标记的 γ H2AX的荧光强度无关,因此使用常规流式细胞术指标的基于强度的测量无法评估DNA损伤的程度。在图像中,比例尺代表 $5\mu\text{m}$ 。示例性实现期间的流速为 0.2m/s 。对于CFSE,细胞内羧基荧光素染料,Ex/Em为:488/517;对于PerCP-Cy5.5:DNA损伤抗体缀合染料,Ex/Em为:490/677。

[0094] 外周血白细胞形态是用于急性和纵向评估的重要临床诊断和预后措施。进行了3D-IFC系统550的示例性实现,以证明这种外周血白细胞形态。

[0095] 图8A至图8D示出了描绘由3D-IFC系统550确定的白细胞细胞形态的图像和数据图。图8A示出了白细胞的代表性2D透射图像(左列)和3D图像。图8B示出了图8A所示的第一细胞的SSC信号的强度直方图的示例,以及Orthoslice视图和Volume视图中的其3D轮廓。基于3D SSC图像的细胞体积估计与荧光体积匹配。图8C示出了CFSE(FL1)体积和基于SSC的估计细胞体积中589个检测事件的散点图。图8D示出了根据基于SSC的估计细胞体积和SSC强度计算出的细胞直径的散点图。在这些图中,比例尺代表 $5\mu\text{m}$ 。对于示例性实现,流速为 0.2m/s 。

[0096] 图8A示出了以三种成像模式进行的白细胞的代表性3D-IFC成像:2D透射图像(例如,3D-IFC参数)以及3D荧光和侧向散射图像。白细胞SSC信号不仅指示核粒度,而且提供从低强度(低折射率)SSC成像获得的细胞容量分析。这里,3D SSC信号的两个或更多个强度带可用于生成两个或更多个反映其相应折射率的图像,例如,细胞质和细胞核;而常规流动SSC强度信号主要由细胞核贡献。如图8B和8C所示,可使用3D SSC图像产生与透射和荧光结果相匹配的细胞体积。

[0097] 下面描述关于在3D-IFC系统550的示例性实现中使用的用于获得和产生结果的材料和方法的更多信息。

[0098] 在一些实施方式中,粒子移动系统110(例如,粒子流动池实施方式)可包括如图9所示的微流体系统,其可连续地将悬浮细胞引入光学询问区域。由于细胞在微通道横截面中的位置与所有 x -、 y -和 z 方向上的光学视场对齐,因此在方形截面的中心通过紧密地聚焦细胞获得细胞的可再现且稳定的流速。将通过注射泵注射的样品中的悬浮细胞在流体动力学上聚焦为单流。鞘流用于在 x -和 z 方向上限制流动细胞。气压泵与液体流量计一起用于提供稳定的鞘流。在鞘流和样品流的交界处,管端为特别地锥形,以保持对称流动。样品和鞘之间的流率比例被精确控制到100:1,以确保粒子在光学视场内以高速流动。

[0099] 图9示出了用于示例性3D-IFC系统550的示例性粒子流动池551的微流体系统900的示例。图9包括与锥形管连接的示例性微流体系统900的图和照片。如图中所示,流体中的

悬浮粒子或细胞可通过通道流到示例性石英流动池,该示例的石英流动池的横截面尺寸为 $250\mu\text{m} \times 250\mu\text{m}$,以及长度为20mm。

[0100] 在系统100的一些示例性实施方式中,光学系统以片光荧光显微镜配置(类似于图1C或图5A所示)布置,其在垂直(z-)方向上检测到信号的同时在单个平面中照射样品。在3D-IFC系统550的示例性实现中,使用具有高斯能量分布的圆形光束形状的1000mW 488nm激光(相干),将其准直、扩展,并随后聚焦,以照亮 $0.6\mu\text{m}$ (z方向)乘以 $250\mu\text{m}$ (y方向)的区域。使用柱面透镜和 $50\times/0.55$ 物镜(Mitutoyo)以形成片光。在光学系统中配置了声光偏转器(AOD),以在z方向产生高速扫描(例如,在此实现中为200kHz)。

[0101] 单像素光电探测器可检测通过每个通道中空间滤波器的荧光或散射光,并从时域输出中重构图像。例如,对于空间滤波器579,针孔被垂直地布置。如图5B所示,使流动(y-)方向倾斜以创造角度 θ ,该角度 θ 由x方向上的视场 D_x 、y方向上的视场 D_y 和针孔X的数量确定, $\theta = \tan^{-1}(D_x / (X \cdot D_y))$ 。另外,由于z方向照明片光扫描范围大于细胞尺寸并且扫描速度更高,通常比y方向上的细胞行进速度快20倍以上,所以当细胞通过一个针孔时,记录一个yz平面图像部分的光强度;当细胞通过下一个针孔时,获取另一个yz平面图像堆栈。例如,结合扫描片光、细胞的流动移动和空间滤波器,检测器一次仅检测出细胞中单个体素的荧光,从而允许一对一的时间到空间的映射。可通过以下等式对该概念进行数学建模。测得的PMT信号 $S(t)$ 可表示为:

$$[0102] \quad S(t) = \iiint \{ \iiint C(x', y', -v_c t, z) I(z, t) \text{psf}(x-x'), y-y' \} dx' dy' \} \cdot F(Mx, My) dx dy dz = \iiint \{ C(x, y - v_c t, z) I(z, t) \} \cdot F(Mx, My) dx dy dz$$

[0103] (6)

[0104] 其中, $C(x, y, z)$ 是3D细胞荧光或散射光强度分布图, $I(z, t)$ 是片光照明, $F(x, y)$ 是空间滤波器的特征函数, v_c 是细胞流动速度, M 是检测系统的放大倍数。

[0105] 可改变发送到AOD中的声换能器的声频来偏转光束,以在不同的z-位置上创造照明。可通过各种类型的波形(例如正弦波、三角波等)生成产生声频的连续变化的调谐电压。为了获得最高的激光功率效率,将调谐电压设置为以锯齿形的方式变化,因此在z方向 $z_0(t)$ 上的片光的位置可描述为:

$$[0106] \quad z_0(t \in (nT, (n+1)T)) = v_i(t - nT)$$

$$[0107] \quad n=0, 1, 2, \dots \quad (7)$$

[0108] 其中, T 是片光照明扫描周期, v_i 是z方向上的扫描速度。

[0109] 通过使用柱面透镜,使激光发散以形成在y方向上的高度为 $200\mu\text{m}$ - $400\mu\text{m}$ 的片光。扫描片光照明 $I(z, t)$ 可描述为高斯光束:

$$[0110] \quad I(z, t) = k \cdot e^{-\frac{(z-z_0(t))^2}{\sigma^2}} \quad (8)$$

[0111] 使用过采样的PMT信号读数,z方向上的空间分辨率受到衍射限制。测量高斯光束腰部为 $0.73\mu\text{m}$,并近似为德尔塔函数,以简化计算:

$$[0112] \quad I(z, t) \approx k \cdot \delta(z - z_0(t)) \quad (9)$$

[0113] 在图10中示出空间滤波器的两个示例。

[0114] 图10示出了用于空间滤波器设计的示例的图。在图像平面放置了空间滤波器的两个示例。尺寸为 $10\mu\text{m} \times 200\mu\text{m}$ 的顶部两个长缝和底部两个长缝被用于速度检测。空间滤波器

上的其他针孔分别为 $10\mu\text{m} \times 20\mu\text{m}$ (左) 和 $10\mu\text{m} \times 10\mu\text{m}$ (右), 用于在x方向分别以 $2\mu\text{m}$ 和 $1\mu\text{m}$ 的体素尺寸捕获3D图像。针孔的布置使激光束腰对齐。

[0115] 撇开用于速度检测的狭缝, 将空间滤波器的特征函数 $F(x, y)$ 设计为

$$[0116] \quad F(x, y) = \sum_{q=1}^N \delta(x - x_q) \cdot \delta(y - y_q) \quad (10)$$

[0117] 其中, $q=1, 2, \dots, N$ 是空间滤波器上的针孔数。针孔的尺寸与检测物镜的数值孔径、细胞流动速度和信号采样率一起决定了x方向上和y方向上的空间分辨率。

[0118] 在示例性实现中, 使用电子束光刻制造空间滤波器, 并且遮光区域由厚度为250nm的铬制成。

[0119] 具有上述近似值, 当 $y_{q+1} - y_q$ 大于细胞尺寸 (直径), 并且细胞投影与第j个针孔重叠时,

$$[0120] \quad S(t) = \int C(x, y - Mv_c t, z_0(t)) \delta(x - x_q) \delta(y - y_q) dx dy = C(x_j, y_j - Mv_c t, z_0(t)) \quad (11)$$

[0121] 使用 $10 \times / 0.28$ 检测物镜并且假设细胞在景深之内, 并且未考虑在多个z处的示例性系统PSF。由PMT (Hamamatsu) 检测到的光强度信号首先由带宽从DC到150MHz的放大器 (Hamamatsu) 放大, 然后由每个通道的最大采样率为125MS/s的数字转换器 (ADVANTECH) 进行数字化。

[0122] 因此, 此示例性方法一对一地将3D细胞图像映射到时域光强度。根据上述等式, 在MATLAB中编写了3D图像构建算法。由于细胞流动速度 v_c 的微小变化, 每个细胞的3D图像的原始尺寸可能会略有不同。在示例性实现中, 然后将原始3D图像的尺寸调整为 $100 \times 100 \times 100$ 像素。在ImageJ中执行3D图像批处理。

[0123] 图11示出了根据3D-IFC系统550的一些实施方式的、标记为1150的3D-IFC系统的另一示例性实施方式。3D-IFC系统1150包括附加检测路径, 例如, 提供2D透射成像模式。如图中所示, 阴影部分 (图的右下部) 描绘了透射图像检测的组件; 其包括与数据处理系统 (例如, DIG 580) 进行数据通信的用于具有单狭缝 (例如, 尺寸为 $50\mu\text{m} \times 2\text{mm}$) 的透射检测的空间滤波器1171、检测物镜 (DO) 572 (例如, $50 \times / 0.55$ 检测物镜), 光电检测器1172 (例如, PMT、光电倍增管)。

[0124] 以下描述了用于制备细胞的示例性方法。

[0125] 具有荧光珠的细胞。在一些示例性实现中, 用完全培养基 (DMEM, 10% 胎牛血清, 1% 青霉素链霉素) 将人胚胎肾293 (HEK-293) 细胞在10cm培养皿中培养至90%汇合。将储备溶液 (2% 固体) 中 $1.0\mu\text{m}$ 荧光珠 (Ex/Em: 488/645nm, 例如, T8883, ThermoFisher) 100倍稀释后, 将 $100\mu\text{L}$ 稀释溶液与10mL新鲜细胞培养基混合并加入到细胞培养板。连续培养10小时后, 收获HEK-293细胞并用CellTrace CFSE细胞增殖试剂盒 (Ex/Em: 492/517nm, 例如, C34554, ThermoFisher) 以 $20\mu\text{M}$ 的工作浓度对HEK-293细胞进行染色。染色过程后, 将细胞用4%多聚甲醛固定、在1X磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 中洗涤并重悬。在每次成像实验之前, 将细胞悬液在PBS中稀释至1000个细胞/ μL 的浓度。

[0126] CFSE染色。在一些示例性实现中, 可将HEK-293细胞在10cm培养皿中用完全培养基培养至98%汇合, 然后收集并在1X PBS中重悬至浓度为 1×10^6 个细胞/mL。将CFSE细胞增殖试剂盒 (Ex/Em 492/517nm, 例如, C34554, Thermo Fisher) 以 $20\mu\text{M}$ 的工作浓度添加到细胞悬液中。将细胞在 37°C 孵育30分钟后, 使用新鲜的培养基 (DMEM) 淬灭染色过程, 用1X PBS洗涤

HEK-293细胞并用4%多聚甲醛固定HEK-293细胞。将固定的细胞在1X PBS中洗涤并重悬。方案还应用于染色CMK3细胞和人血白细胞。

[0127] CMK3细胞辐射治疗和免疫染色。在一些示例性实现中,在培养皿中用完全培养基(DMEM-F12,2%B27补充剂,1%青霉素链霉素,1%谷氨酰胺,100 $\mu\text{g}/\text{L}$ EGF,100 $\mu\text{g}/\text{L}$ FGF,0.24%肝素)培养人胶质母细胞瘤CMK3细胞。收获细胞,并将细胞在1X PBS中重悬至 1×10^6 个细胞/mL的浓度,然后用CFSE进行染色。为了诱导DNA双链断裂(DSB),使用铯源辐照器以6Gy辐照处理CMK3细胞。照射30分钟后,将处理的细胞用1X PBS洗涤一次,并用1%多聚甲醛固定。将固定的细胞用PBS洗涤两次。然后将70%乙醇添加至细胞,并将细胞在冰上孵育1小时。乙醇处理后,将细胞用PBS洗涤两次,并在室温下于1%TritonX-100中孵育10分钟。然后,将细胞用PBS洗涤一次,并在室温下在震动器上于PBS中的5%牛血清白蛋白(BSA)中孵育30分钟。然后将细胞用PBS洗涤一次,并在抗磷酸组蛋白H2A.X(Ser139)抗体、克隆JBW301中以1:300稀释在震动器上于冰上孵育一小时。一级抗体处理后,将细胞用5%BSA洗涤两次,并在PerCP/Cy5.5抗小鼠IgG1抗体中以1:100稀释在震动器上于冰上孵育1小时。最后,将染色的细胞用5%BSA洗涤两次,并重悬于MilliQ水中的1:3稀释的稳定固定缓冲液中。在每次成像实验之前,将细胞在PBS中稀释至500个细胞/ μL 的浓度。

[0128] 白细胞的分离和染色。在一些示例性实现中,新鲜的人类全血从圣地亚哥血液银行的EDTA管中收获。首先用RBC裂解缓冲液(00-4300-54,Invitrogen)裂解全血中的红细胞,并在裂解过程后由软离心机收获白细胞群体。然后洗涤收获的白细胞,并将收获的白细胞在1X PBS中重悬至 1×10^6 个细胞/mL的浓度。将重悬的白细胞用CFSE进行染色。染色过程后,将细胞用4%多聚甲醛固定,在1X PBS中洗涤并重悬细胞。在每次成像实验之前,将细胞悬浮液在PBS中稀释至500个细胞/ μL 的浓度。

[0129] 如示例性数据所展示的,公开的3D-IFC系统能够提供对高吞吐量3D图像捕获和分析的前所未有的访问。3D-IFC系统550的示例性实现的特点是,细胞流速为 $0.2\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$ 、3个轴上的空间分辨率为 $1\mu\text{m}$ 、在所有轴上的视场为 $20\mu\text{m}$,以及每秒吞吐量为500个细胞。一些实施方式具有通过改变空间滤波器和使用更高流速来直接地提高空间分辨率、视场和3D图像捕获率的灵活性。其信息丰富的3D暗场(侧向散射)图像检测再加上2D透射图像相耦合,为无标记测定提供了可能性。

[0130] 所公开的系统、方法和装置的示例性应用包括,但不限于,T细胞非对称分裂为效应细胞和记忆细胞、B细胞的分泌途径、表型药物发现、蛋白质或受体易位、追踪细胞器的形成或运输,染色体结构畸变(其中,3D方向和极性很重要),以及其他应用。在一些实现中,所公开的系统、方法和装置可与基于图像的分类功能集成。

[0131] 示例

[0132] 在根据本技术的一些实施方式中(示例A1),三维成像流式细胞术系统包括:粒子流动系统;与粒子流动系统连接的扫描片光照明系统;与粒子流动系统连接的光学检测系统;与光学检测系统和/或扫描片光照明系统通信的数据处理系统。粒子流动系统包括:具有清晰光路的流体通道,该流体通道携带包含粒子的流体样本;流动聚焦系统,用于在流体通道中向细流提供受限的样品流体。扫描片光照明系统包括:光源,用于照亮在流体通道中流动的粒子;用于将照明光束重定向到不同角度的装置,该装置是可编程的,以高速产生周期性角度变化;以及柱面透镜和/或其他光学组件,以产生结构化的片光照明,以允许一次

光学扫描粒子的被照亮的部分,例如,粒子的薄部分或细线。该光学检测系统包括:一个或多个光电检测器和位于一个或多个光电检测器的图像平面处的空间滤波器,以选择性地允许来自粒子的特定位置的光穿过并被一个或多个光电检测器检测。数据处理系统配置为处理检测到的数据并产生粒子的三维构造图像。

[0133] 示例A2包括示例A1或A3-A7中任一项的系统,其中,光学检测系统可操作为收集和检测荧光和/或散射光。

[0134] 示例A3包括示例A1-A2或A4-A7中的任一项的系统,其中,光学检测系统配置为以流体通道具有光学透明路径的任何角度放置。

[0135] 示例A4包括示例A1-A3或A5-A7中的任一项的系统,其中,光学检测系统可操作为基于以下项的组合来检测3D对象在时间上的1D光学数据点:(a)粒子的流动移动;(b)扫描片光照明;以及(c)空间映射滤波器,以按顺序定时的方式检测粒子的每个位置的光强度(例如,包括荧光和散射),以使得由一个或多个光电探测器记录的时域信号具有从空间到时间的一对一的关系。

[0136] 示例A5包括示例A1-A4或A6-A7中的任一项的系统,其中,数据处理系统包括与光学检测系统通信的数据流单元。

[0137] 示例A6包括示例A1-A5或A7中的任一项的系统,其中,数据处理系统包括图像重构算法,该图像重构算法包括照明规范和检测协议,并相应地控制扫描片光照明系统和光学检测系统。

[0138] 示例A7包括示例A1-A6中的任一项的系统,其中,数据处理系统包括图像处理单元来处理图像数据,以确定与粒子相关联的性质。

[0139] 在根据本技术的一些实施方式中(示例B1),用于在流式细胞术系统中进行三维成像的光学成像系统包括:光源,用于照亮在流道中流动的粒子;在流道范围上方配置的一个或多个透镜;声光偏转器,配置在光学光电检测器和光源的光路上,以提供z方向上的高速扫描;以及单元光电检测器,以检测通过每个通道中的空间滤波器的荧光,其中,光源配置为在信号得以在垂直方向上被检测到的同时照亮在单个平面中的流道中流动的粒子。

[0140] 示例B2包括示例B1的光学成像系统,其中,该系统配置为获取光信号数据,以基于扫描片光、粒子的流动移动以及空间滤波器的组合,从时域检测器输出重构图像,以使得光电探测器可以一次检测粒子中的单独的点,从而允许时空转换。

[0141] 示例B3包括示例B1的光学成像系统,其中,光源包括激光器。

[0142] 在根据本技术的一些实施方案中(示例B4),三维成像流式细胞术系统包括:构造成包括基板的粒子流动装置,在基板上形成的通道,可用于使包括活细胞的粒子沿流道的流动方向流动;成像系统,与粒子流动装置连接,并可操作以在流过通道的期间获得与粒子相关联的三维图像数据;以及与成像系统进行通信的数据处理和控制单元,该数据处理和控制单元包括处理器,该处理器配置为处理由成像系统获得的图像数据,以从处理后的图像数据中确定与细胞相关联的一个或多个特性,其中,成像系统配置为片光荧光显微镜配置,其可在垂直方向上检测到信号的同时在单个平面中照亮样本。

[0143] 示例B5包括示例B4的三维成像流式细胞术系统,其中,成像系统包括示例B1-B3中的任一项的光学成像系统。

[0144] 示例B6包括示例B4的三维成像流式细胞术系统,其中,成像系统包括一个或多个

光源,以在粒子流动装置的范围提供输入光;以及光学光电探测器,以捕获来自自由输入光照亮的粒子的图像数据。

[0145] 示例B7包括示例B6的三维成像流式细胞术系统,其中,光学光电探测器包括光学耦合到空间滤波器、发射滤波器以及光电倍增管的显微镜的物镜。

[0146] 示例B8包括示例B7的三维成像流式细胞术系统,其中,光学光电探测器还包括:一个或多个导光元件,以在第一范围引导输入光,以将由细胞发射或散射的光引导至光学光电探测器的光学元件,或两者。

[0147] 示例B9包括示例B8的三维成像流式细胞术系统,其中,导光元件包括二向色镜。

[0148] 示例B10包括示例B8的三维成像流式细胞术系统,其中,光学光电探测器包括两个或更多光电倍增管,以基于两个或更多个由细胞发射或散射的光的波段或类型来产生两个或更多个相应的信号。

[0149] 在根据本技术的一些实施方式中(示例C1),三维(3D)成像流式细胞术系统包括:粒子流动装置,该装置包括基板和在基板上形成的通道,以允许流体中的粒子沿通道的流动方向流动;光学照明系统,以产生二维(2D)的片光,该片光扫描流体中粒子的多个部分,一次扫描一个部分,同时粒子沿通道中的流动方向流动,光学照明系统,包括产生光束的光源,该光源光学耦合到片光生成单元,以将光束修改为指向通道的2D片光,其中,片光生成单元包括:光重定向装置,以将光束重定向至不同角度;以及放置在光重定向装置之后的带有通道的光路中的柱面透镜;光学检测系统,与粒子流动装置连接,并且可操作以在流过通道期间获得与粒子相关联的三维的光信号数据,其中,该光学检测系统包括:一个或多个光电探测器和位于一个或多个光电探测器的图像平面上的空间滤波器,该空间滤波器包括多个孔,以选择性地允许粒子的扫描部分上的2D片光的一部分穿过并被一个或多个光电探测器检测;以及与光学检测系统和光学照明系统进行通信的数据处理单元,数据处理单元包括处理器,处理器配置为处理由光学检测系统获得的光信号数据并产生图像数据,从图像数据中可建造粒子的3D图像。

[0150] 示例C2包括示例C1或C3-C15中的任一项的系统,其中,2D片光在垂直于流动方向的第二方向上指向通道,以使得2D片光的第一扫描形成包括流动方向和第二方向的第一平面;其中,光学检测系统的图像平面沿垂直于流动方向和第二方向的第三方向布置,以使得2D光线的第二扫描形成与第一平面平行的且沿第三方向随着与第一平面的距离而变化的第二平面。

[0151] 示例C3包括示例C2的系统,其中,光学照明系统配置为在粒子沿流动方向流动的同时,在第一时间点扫描粒子的第一平面中的第一部分并在第二时间点扫描粒子的第二平面中的第二部分,从而产生在空间上映射到粒子的时序信号。

[0152] 示例C4包括示例C2的系统,其中,空间滤波器的孔沿第二方向定位,以使得每个孔配置为过滤对应于粒子的体素的2D片光。

[0153] 示例C5包括示例C1-C4或C6-C15中的任一项的系统,其中,数据处理单元可操作地逐体素产生粒子的3D图像。

[0154] 示例C6包括示例C1-C5或C7-C15中的任一项的系统,其中,粒子的图像数据包括在三个轴上的至少为 $1\mu\text{m}$ 的空间分辨率,以及在三个轴上的 $20\mu\text{m}$ 的视场。

[0155] 示例C7包括示例C1-C6或C8-C15中的任一项的系统,其中,通道中粒子的流速至少

为 0.2ms^{-1} ,并且其中,该系统可操作以每秒500个粒子的吞吐量产生粒子的图像数据。

[0156] 示例C8包括示例C1-C7或C9-C15中的任一项的系统,其中,空间滤波器的多个孔以图案布置,其中,该图案的每个孔沿流动方向均匀地间隔开,并且相对于图案的另一个孔沿着垂直于流动方向的第二方向变化其位置。

[0157] 示例C9包括示例C1-C8或C10-C15中的任一项的系统,其中,光重定向装置包括声光偏转器(AOD)。

[0158] 示例C10包括示例C1-C9或C11-C15中的任一项的系统,其中,片光生成单元可通过数据处理单元进行编程,用于以至少200kHz的速度生成周期性角度变化。

[0159] 示例C11包括示例C1-C10或C12-C15中的任一项的系统,其中,一个或多个光电探测器包括光电倍增管。

[0160] 示例C12包括示例C1-C11或C13-C15中的任一项的系统,其中,光学检测系统包括光学耦合到空间滤波器的物镜,以及光学耦合在空间滤波器和光电探测器之间的发射滤波器。

[0161] 示例C13包括示例C12的系统,其中,光学检测系统还包括一个或多个导光元件,以将光从空间滤波器引向多个光电检测器。

[0162] 示例C14包括示例C13的系统,其中,光学检测系统包括两个或更多个光电倍增管,以基于由细胞发射或散射的两个或更多个光带或两个或更多个类型的光来产生两个或更多个对应的信号。

[0163] 实施方式C15包括示例C1-C14中的任一项的系统,其中,粒子包括活细胞。

[0164] 在根据本技术的一些实施方式中(示例C16),用于移动粒子的三维(3D)成像的方法包括:使粒子沿着第一方向移动通过通道;在粒子移动通过通道时,通过将单独的二维(2D)片光导向通道的相应范围,逐部分扫描粒子的多个部分;粒子的扫描部分上对2D片光的部分进行空间滤波,以允许检测通过空间滤波器的某些光学点信号;在映射到检测时间点的三维中检测与单个体素相对应的空间滤波光点信号;以及处理光点信号以产生粒子的图像数据。

[0165] 示例C17包括示例C16或C18-C24中的任一项的方法,包括将由光源产生的光束修改为单独的2D片光。

[0166] 示例C18包括示例C17的方法,其中,扫描粒子的多个部分包括通过柱面透镜将光束重定向到不同角度,该柱面透镜将重定向的光束修改为2D片光。

[0167] 示例C19包括示例C16-C18或C20-C24中的任一项的方法,其中,第一单独的2D片光在垂直于第一方向的第二方向上指向通道,以使得2D片光的第一扫描形成包括第一方向和第二方向的第一平面;以及其中用于检测的图像平面沿着垂直于第一方向和第二方向的第三方向布置,以使得第二单独的2D片光的第二扫描形成与第一平面平行的第二平面,并且沿第三方向随着与第一平面的距离而改变。

[0168] 示例C20包括示例C16-C19或C21-C24中的任一项的方法,包括基于从产生的图像数据逐像素构造产生粒子的3D图像。

[0169] 示例C21包括示例C16-C20或C22-C24中的任一项的方法,其中,粒子的图像数据包括在三个轴上至少 $1\mu\text{m}$ 的空间分辨率,以及在三个轴上的 $20\mu\text{m}$ 的视场。

[0170] 示例C22包括示例C16-C21或C22-C24中的任一项的方法,其中,以每秒500个粒子

的吞吐量产生粒子的图像数据。

[0171] 示例C23包括示例C16-C22或C24中的任一项的方法,其中,粒子包括活细胞。

[0172] 示例C24包括在示例C1-C15中的任一项的系统上实现的示例C16-C23中的任一项的方法。

[0173] 在根据本技术的一些实施方式中(示例D1),用于对移动粒子进行三维(3D)成像的系统包括粒子移动装置,该装置包括:基板,以允许粒子在第一方向上沿着行进路径移动;光学照明系统,用于在粒子行进路径的范围中产生光的非对称照明区域,该光学照明系统在粒子移动的同时扫描多个时间点的粒子的多个部分,该非对称照明区域包括一个比其他照明维度更薄的照明维度,以形成类似于照明平面的形状,光学照明系统包括:产生光束的光源,该光源光学耦合至光重定向装置,以通过重定向光束而将光束修改到不同的角度,以使光的非对称照明区域指向粒子移动的行进路径;光学检测系统,与粒子移动装置光学连接,并且可操作以在粒子沿行进路径移动期间获得光信号数据,其中,光信号数据与粒子的不同部分相关联,粒子的不同部分与粒子的体积相对应,其中,光学检测系统包括:一个或多个光电探测器以及位于粒子移动装置与一个或多个光电探测器之间的空间滤波器,该空间滤波器包括多个孔,以选择性地允许粒子的扫描部分上的光的非对称照明区域的一部分穿过空间滤波器并被一个或多个光电探测器检测到;以及与光学检测系统进行通信的数据处理单元,该数据处理单元包括处理器,该处理器配置为处理由光学检测系统获得的光信号数据并产生包括指示粒子的3D特征的信息的数据。

[0174] 示例D2包括示例D1或D3-D20中的任一项的系统,其中,光的非对称照明区域在垂直于第一方向的第二方向上指向行进路径的范围,以使得光的非对称照明区域的第一扫描形成包括第一方向和第二方向的第一平面;其中,光学检测系统的图像平面沿垂直于第一方向和第二方向的第三方向布置,以使得光的非对称照明区域的第二扫描形成与第一平面平行的且沿着第三方向随着与第一平面的距离而变化的第二平面。

[0175] 示例D3包括示例D2或D4的系统,其中,光学照明系统配置为在粒子沿第一方向移动的同时,在第一时间点扫描粒子的在第一平面中的第一部分,并在第二时间点扫描粒子的在第二平面中的第二部分,从而产生在空间上映射到粒子的时序信号。

[0176] 示例D4包括示例D2或D3的系统,其中,空间滤波器的孔沿第二方向定位,以使得每个孔配置为过滤与粒子的体素相对应的光的非对称照明区域。

[0177] 示例D5包括示例D1-D4或D6-D20中的任一项的系统,其中,数据处理单元可操作地逐体素产生粒子的3D图像。

[0178] 示例D6包括示例D5的系统,其中,粒子的3D图像数据包括在三个轴上至少 $1\mu\text{m}$ 的空间分辨率,以及在三个轴上大约 $20\mu\text{m}$ 的视场。

[0179] 示例D7包括示例D1-D6或D8-D20中的任一项的系统,其中,粒子移动装置包括粒子流动池,该粒子流动池包括在基板上形成的通道,以允许包含粒子的流体流过作为行进路径的通道。

[0180] 示例D8包括示例D7的系统,其中,通道中粒子的流速至少为 $0.2\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$,并且其中,该系统可操作以每秒500个粒子的吞吐量产生粒子的数据。

[0181] 示例D9包括示例D1-D8或D10-D20中的任一项的系统,其中,将粒子固定到基板,并且其中,粒子移动装置包括定位系统,以相对于光学照明系统移动基板和光学检测系统,以

使得粒子沿着行进路径移动并被带入扫描光的非对称照明区域的范围。

[0182] 示例D10包括示例D1-D9或D11-D20中的任一项的系统,其中,空间滤波器的多个孔以图案布置,其中,该图案的每个孔沿第一方向间隔开并且相对于图案的另一个孔沿垂直于第一方向的第二方向的变化其位置。

[0183] 示例D11包括示例D1-D10或D12-D20中的任一项的系统,其中,光重定向装置包括声光偏转器(AOD)。

[0184] 示例D12包括示例D11的系统,其中,AOD可由数据处理单元编程,用于以至少100kHz的速度产生周期性角度变化。

[0185] 示例D13包括示例D1-D12或D14-D20中的任一项的系统,其中,光重定向装置包括:扫描镜的多路复用阵列和/或扫描光栅的多路复用阵列。

[0186] 示例D14包括示例D1-D13或D15-D20中的任一项的系统,其中,光重定向装置与一个或多个无源光学组件光学耦合,选自柱面透镜、透镜、棱镜和空间滤波器,以在行进路径上对重定向的光进行塑形。

[0187] 示例D15包括示例D1-D14或D16-D20中的任一项的系统,其中,一个或多个光电检测器包括光电倍增管。

[0188] 示例D16包括示例D1-D15或D17-D20中的任一项的系统,其中,光学检测系统还包括与光重定向装置光学耦合的物镜。

[0189] 示例D17包括示例D1-D16或D18-D20中的任一项的系统,其中,光学检测系统包括光学耦合至空间滤波器的物镜。

[0190] 示例D18包括示例D1-D17或D19-D20中的任一项的系统,其中,光学检测系统还包括:一个或多个导光元件,以将光从空间滤波器引向多个光电检测器。

[0191] 示例D19包括示例D18的系统,其中,光学检测系统还包括:两个或更多个光电检测器,以基于由细胞发射或散射的两个或更多个光带或两个或更多个类型的光来产生两个或更多个对应的信号。

[0192] 示例D20包括示例D1-D19中的任一项的系统,其中,粒子包括活细胞。

[0193] 在根据本技术的一些实施方式中(示例D21),用于对移动粒子进行三维(3D)成像的方法包括:沿第一方向移动粒子;在粒子移动时,通过将单独的光的非对称照明区域指向相应范围,逐部分扫描粒子的多个部分;在移动中的粒子的扫描部分上的光的非对称照明区域的部分进行空间滤波,以允许通过空间滤波器的与粒子体积相对应的某些光信号被检测到;以及检测经过空间滤波的光信号,以获得映射到检测时间点的三维中的单独的像素。

[0194] 示例D22包括示例D21或D23-D32中的任一项的方法,包括将由光源产生的光束修改为光的单独的非对称照明区域。

[0195] 示例D23包括示例D21-D22或D24-D32中的任一项的方法,其中,扫描粒子的多个部分包括:将光束重定向到不同的角度,以及将重定向的光束塑形为光的非对称照明区域。

[0196] 示例D24包括示例D21-D23或D25-D32中的任一项的方法,其中,光的第一单独的非对称照明区域在垂直于第一方向的第二方向上指向粒子的行进路径,以使得对光的第一单独非对称照明区域的第一扫描形成包括第一方向和第二方向的第一平面;其中,用于检测的图像平面沿着垂直于第一方向和第二方向的第三方向布置,以使得光的第二单独非对称照明区域的第二扫描形成与第一平面平行的并且沿着第三方向随着与第一平面的距离而

变化的第二平面。

[0197] 示例D25包括示例D21-D24或D26-D32中的任一项的方法,还包括处理光信号以产生包括指示粒子的3D特征的信息的数据。

[0198] 示例D26包括示例D21-D25或D27-D32中的任一项的方法,包括基于从产生的数据进行逐体素构造而产生粒子的3D图像。

[0199] 示例D27包括示例D21-D26或D28-D32中的任一项的方法,其中,粒子的数据包括在三个轴上至少 $1\mu\text{m}$ 的空间分辨率,以及在三个轴上 $20\mu\text{m}$ 的视场。

[0200] 示例D28包括示例D21-D27或D29-D32中的任一项的方法,其中,以每秒500个粒子的吞吐量产生粒子的数据。

[0201] 示例D29包括示例D21-D28或D30-D32中的任一项的方法,其中,通过包括在基板上形成的通道的粒子流动池移动粒子,以使包含粒子的流体沿第一方向流过该通道。

[0202] 示例D30包括示例D21-D29或D31-D32中的任一项的方法,其中,粒子被固定至基板,并且该基板通过定位系统移动,以使得粒子沿第一方向在基板上移动。

[0203] 示例D31包括示例D21-D30或D32中的任一项的方法,其中,粒子包括活细胞。

[0204] 示例D32包括在示例D1-D20中的任一项的系统上实现的示例D21-D31中的任一项的方法。

[0205] 本专利文件和所附附录中所描述的主题内容和功能操作的实现可在各种系统、数字电子电路或计算机软件、固件或硬件中实现,包括本说明书所公开的结构及其结构等价物,或其中一种或多种的组合。本说明书中描述的主题内容的实现可实现为一个或多个计算机程序产品,即,在有形和非暂时性计算机可读介质上编码的计算机程序指令的一个或多个模块,用于由数据处理设备执行或控制数据处理设备的操作。计算机可读介质可以是机器可读存储装置、机器可读存储基板、存储装置、影响机器可读传播信号的物质组成,或它们中的一个或多个的组合。术语“数据处理单元”或“数据处理设备”涵盖用于处理数据的所有设备、装置和机器,例如包括可编程处理器、计算机或多处理器或计算机。除了硬件之外,该设备还可包括为所讨论的计算机程序创建执行环境的代码,例如,构成处理器固件、协议栈、数据库管理系统、操作系统或其中一项或多项的组的代码。

[0206] 计算机程序(也称为程序、软件、软件应用程序、脚本或代码)可用任何形式的编程语言(包括编译或解释语言)编写,并且可以以任何形式(包括作为独立程序或作为适用于在计算环境中使用的模块、组件、子例程或其他单元)进行部署。计算机程序不一定与文件系统中的文件相对应。程序可存储在保留其他程序或数据的文件的一部分(例如,存储在标记语言文档中的一个或多个脚本)中,专用于所讨论程序的单个文件中或多个协调文件(例如,存储一个或多个模块、子程序或部分代码的文件)。可部署计算机程序,以在一台计算机或位于一个地点上或分布在多个地点上并通过通信网络互连的多台计算机上执行。

[0207] 可通过一个或多个可编程处理器执行本说明书中描述的处理和逻辑流程,一个或多个可编程处理器执行一个或多个计算机程序,以通过对输入数据进行操作并生成输出来执行功能。处理和逻辑流程也可由专用逻辑电路执行,并且设备也可以实现为专用逻辑电路,例如,FPGA(现场可编程门阵列)或ASIC(专用集成电路)。

[0208] 例如,适合于执行计算机程序的处理器包括通用微处理器和专用微处理器,以及任何种类的数字计算机的任何一个或多个处理器。通常,处理器将从只读存储器或随机存

取存储器或两者接收指令和数据。计算机的基本元件是用于执行指令的处理器和用于存储指令和数据的一个或多个存储装置。通常,计算机还将包括或可操作地耦合一个或多个大容量存储装置(例如,有磁性的磁光盘或光盘),以从一个或多个大容量存储装置接收数据或将数据传输到一个或多个大容量存储装置或既从一个或多个大容量存储装置接收数据又将数据传输到一个或多个大容量存储装置,用于存储数据。但是,计算机不必具有此类装置。适用于存储计算机程序指令和数据的计算机可读介质包括所有形式的非易失性存储器、介质和存储装置,包括半导体存储装置(例如,EPROM、EEPROM和闪存装置)。处理器和存储器可由专用逻辑电路补充或并入专用逻辑电路中。

[0209] 当指诸如量或浓度等的可测量值时,如本文所用,术语“约”意在涵盖指定量的20%、10%、5%、1%、0.5%或甚至是0.1%的变化。

[0210] 旨在将说明书与附图一起仅被视为是示例性的,其中,示例性的是指示例。如本文所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”也旨在包括复数形式,除非上下文另外明确地指出。另外,“或”的使用旨在包括“和/或”,除非上下文另外明确地指出。

[0211] 尽管该专利文件和所附附录包含许多细节,但是这些细节不应被解释为对任何发明或可能要求保护的范​​围进行限制,而应视为对特定发明的特定实施方式的可能特有的特征的描述。在单独的实施方式的上下文中,该专利文件和所附附录中描述的某些特征也可在单个实施方式中组合实现。相反,在单个实施方式的上下文中描述的各种特征也可分别在多个实施方式中实现或以任何合适的子组合来实现。而且,尽管以上特征可被描述为以某些组合起作用并且即使最初要求保护的就是这些特征,在一些情况下,可以从组合中删除所要求保护的组合中的一个或多个特征,并且所要求保护的组合可定向到子组合或子组合的变型。

[0212] 类似地,尽管在附图中以特定顺序描绘了操作,但是这不应被理解为要求以所示的特定顺序或以连续的顺序执行这样的操作或者执行所有示出的操作以得到期望的结果。此外,在该专利文件和所附附录中描述的实施方式中的各种系统组件的分离不应理解为在所有实施方式中都需要这种分离。

[0213] 仅描述了几个实施方式和示例,并且可基于该专利文件和所附附录中所描述和所示出的内容进行其他实现、优化处理和变化。

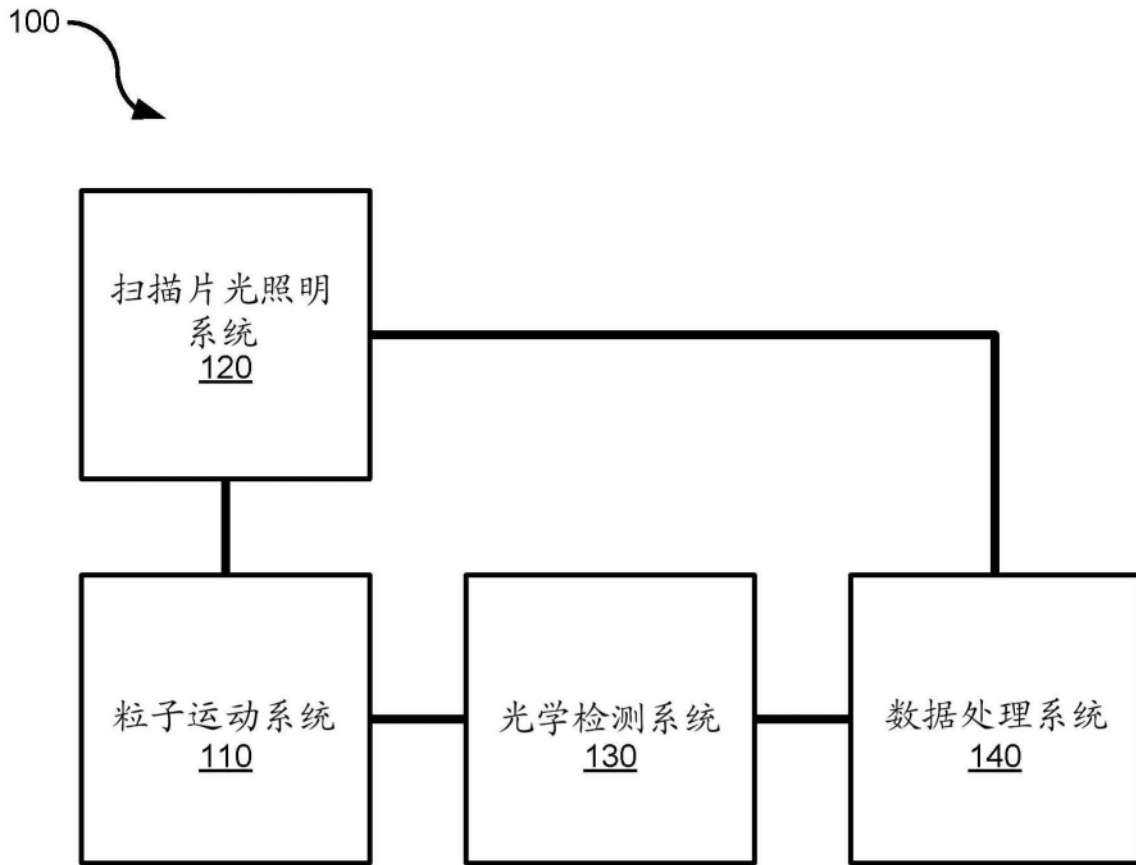


图1A

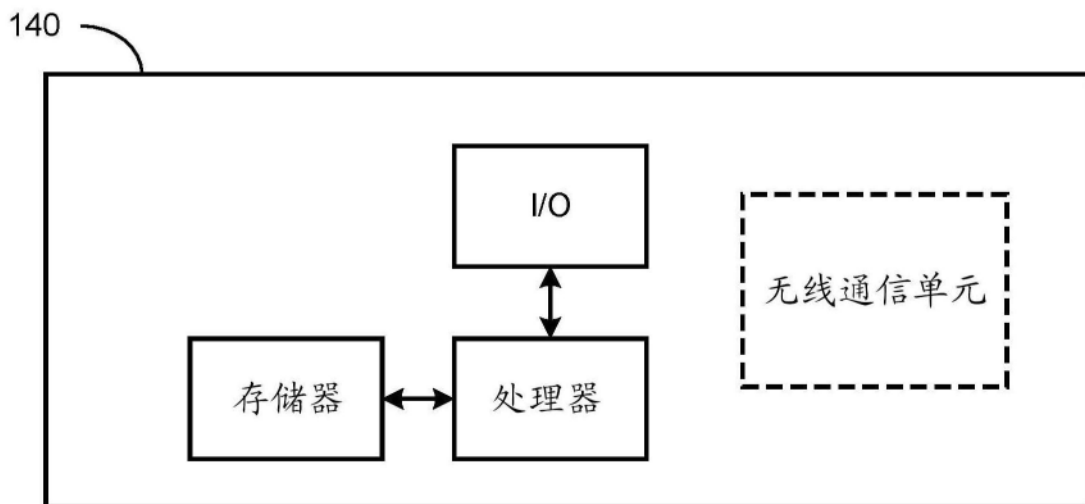


图1B

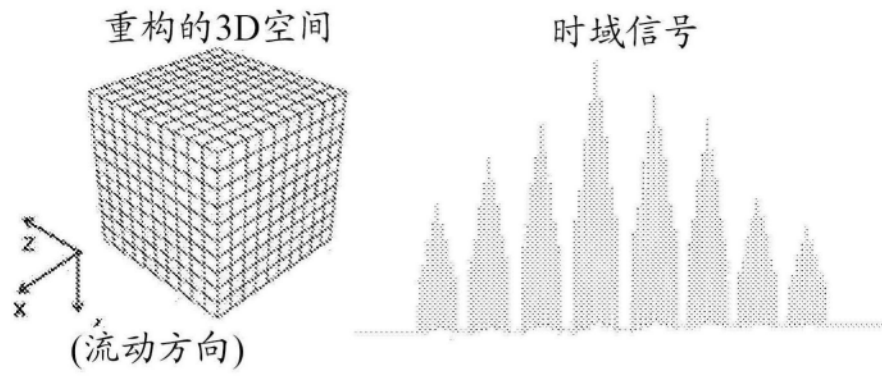


图2A

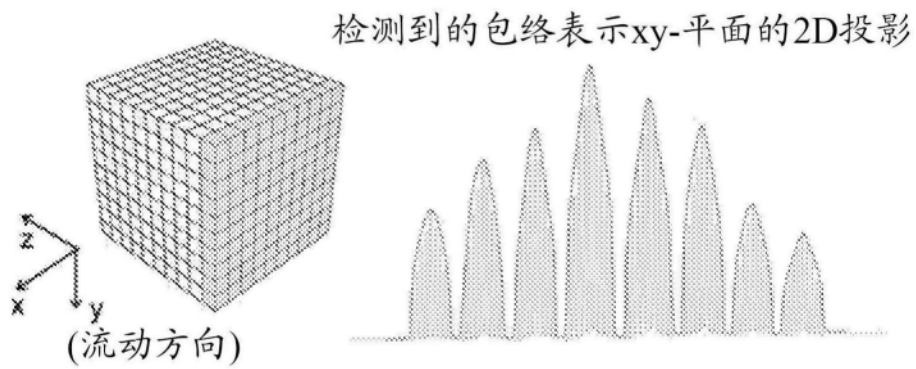


图2B

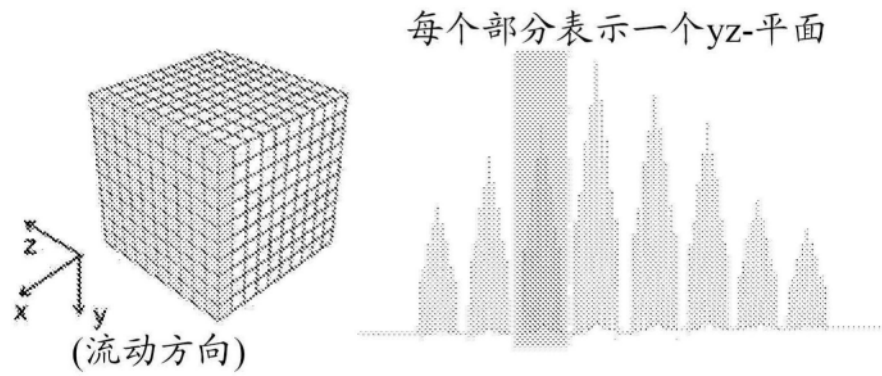


图2C

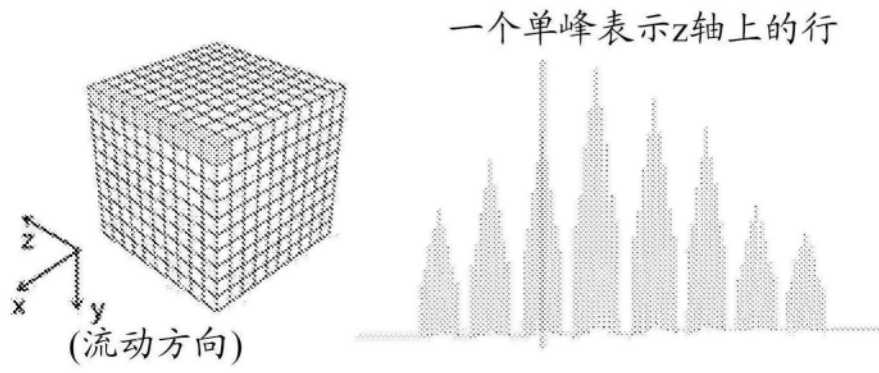


图2D

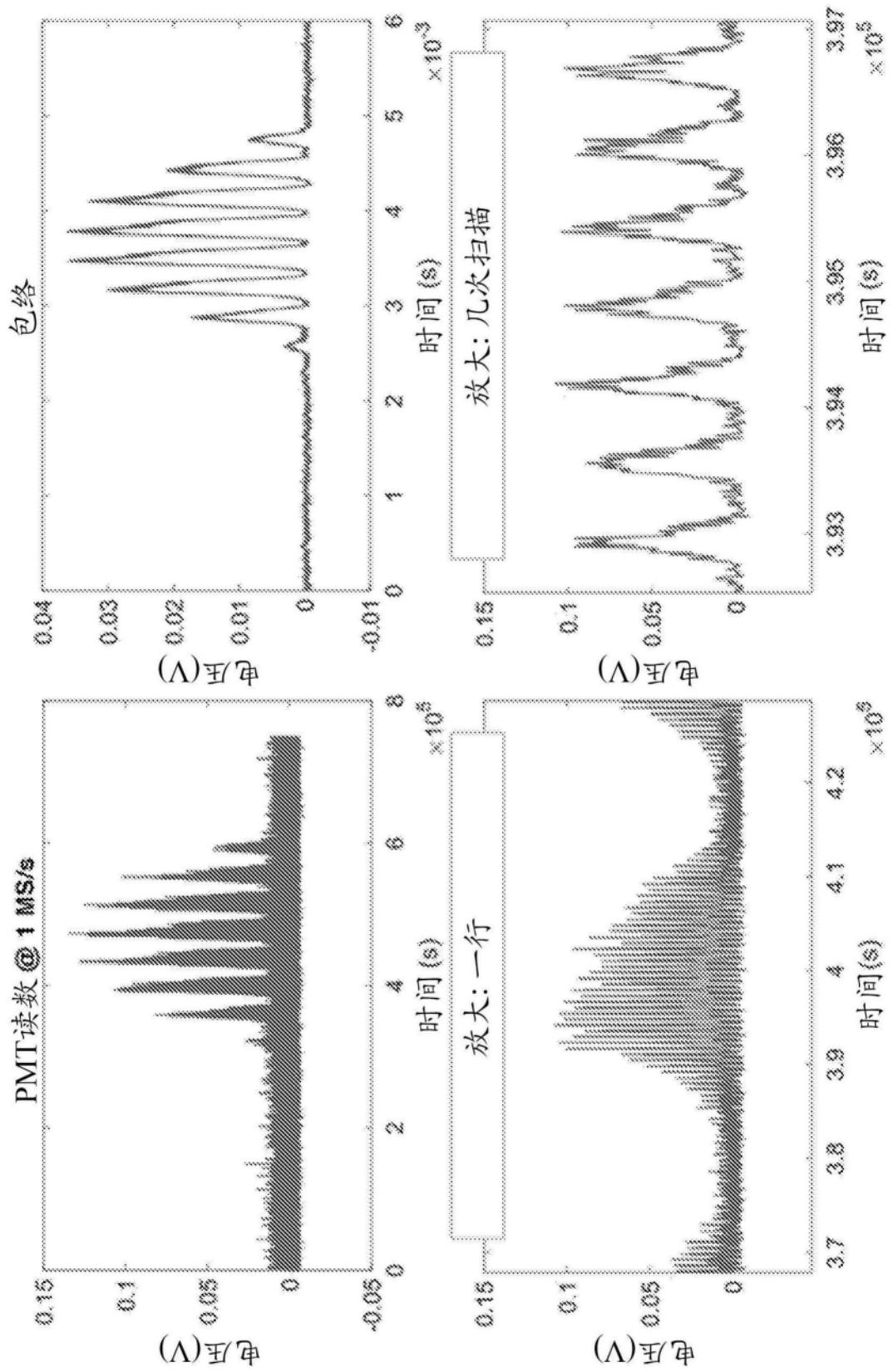


图3A

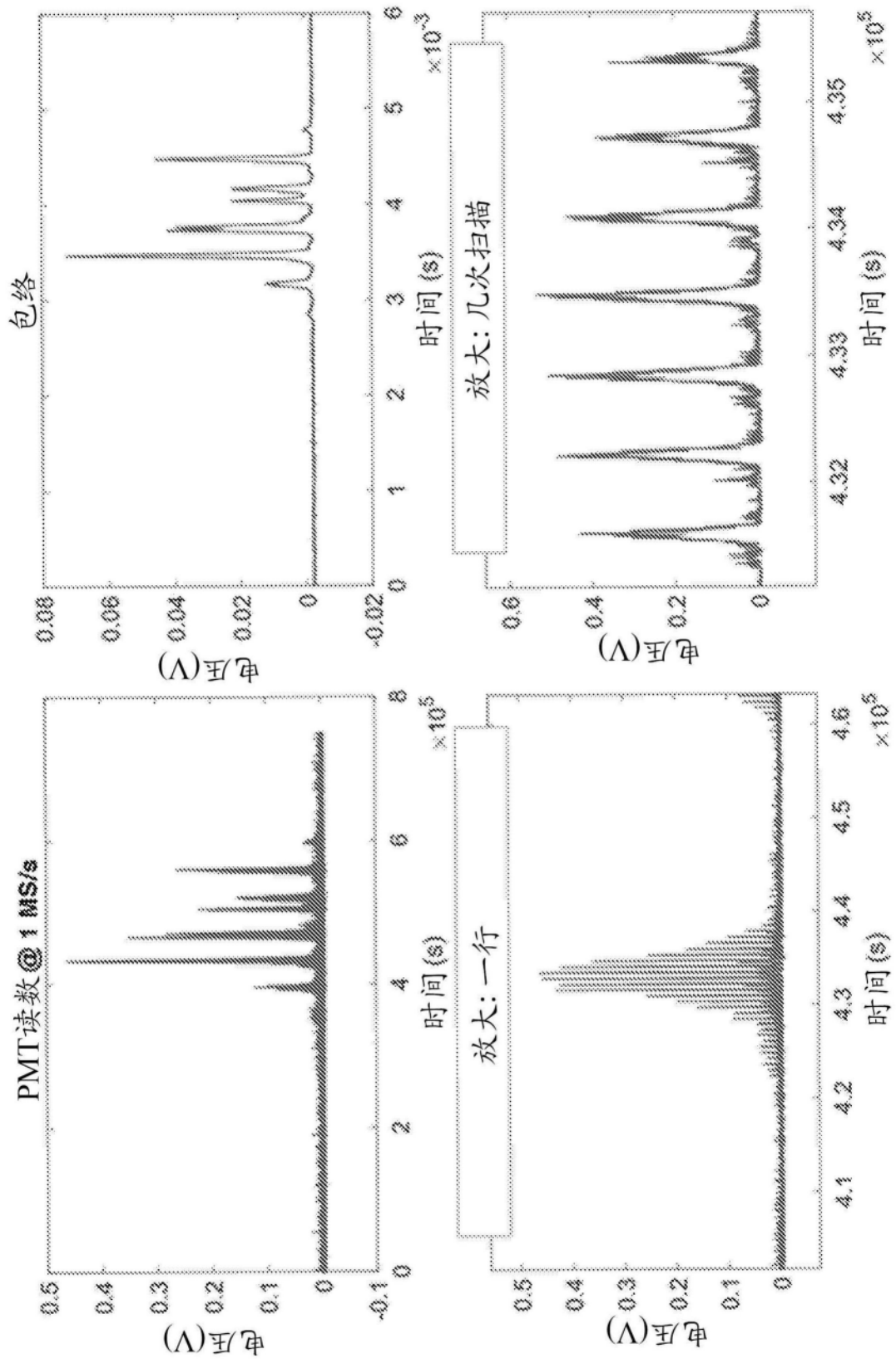


图3B

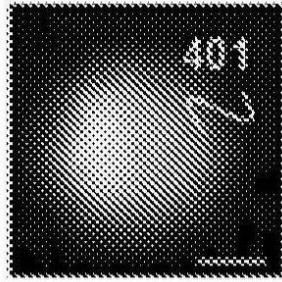


图4A

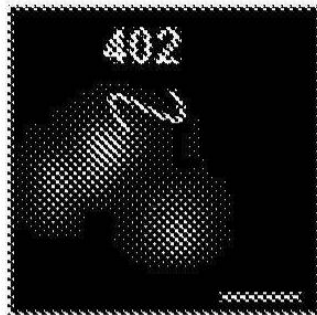


图4B

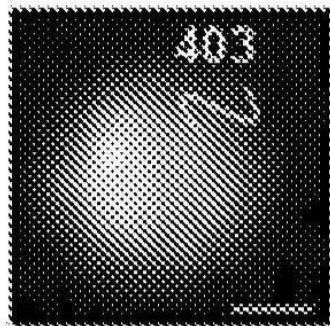


图4C

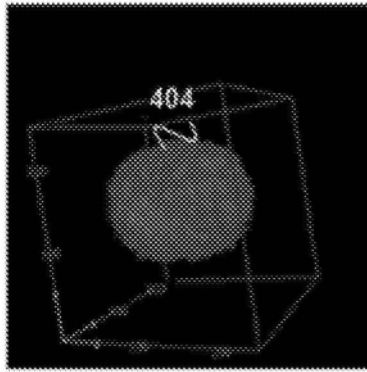


图4D

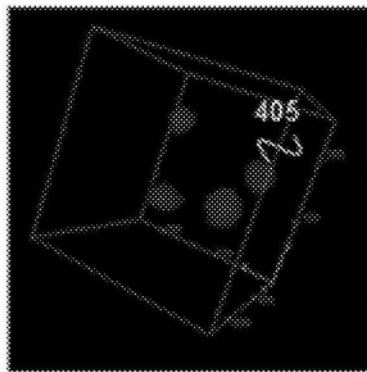


图4E

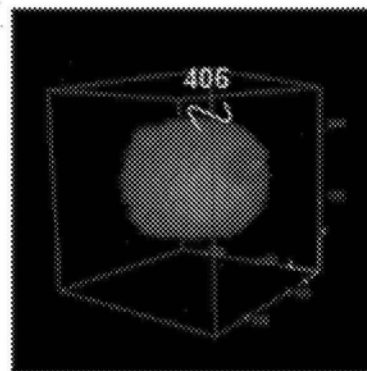


图4F

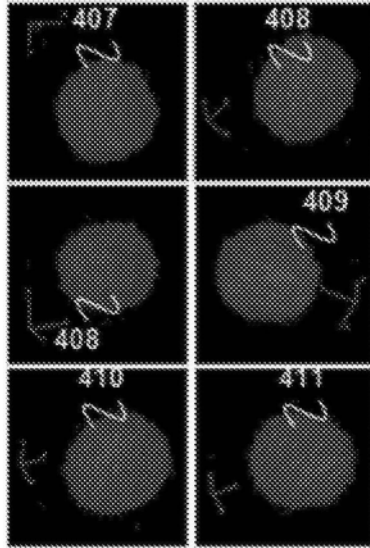


图4G

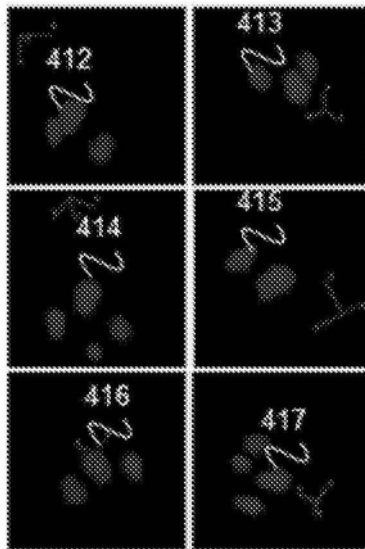


图4H

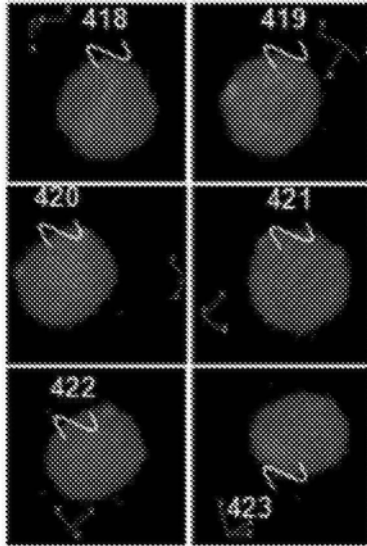


图4I

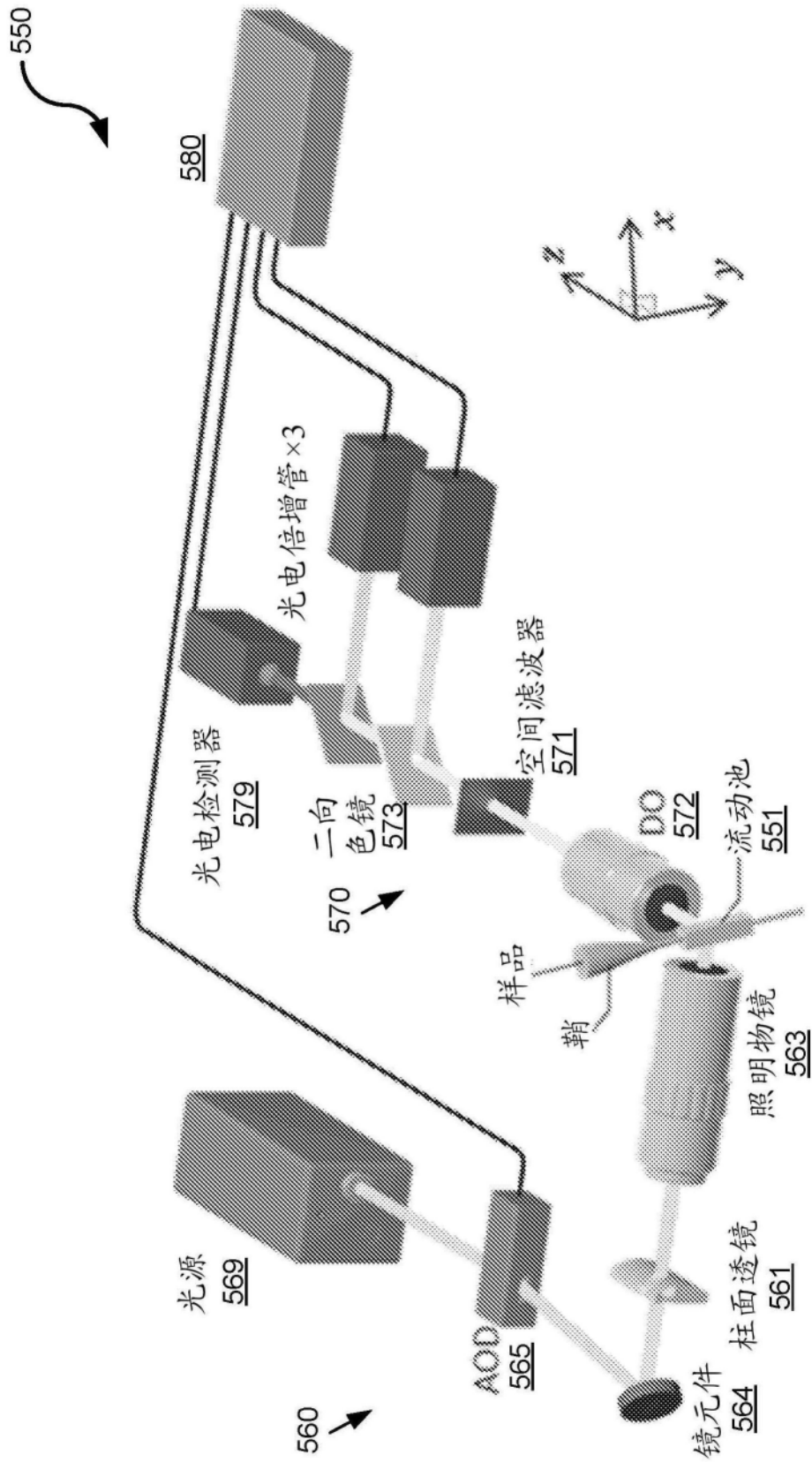


图5A

SF 空间滤波器 571

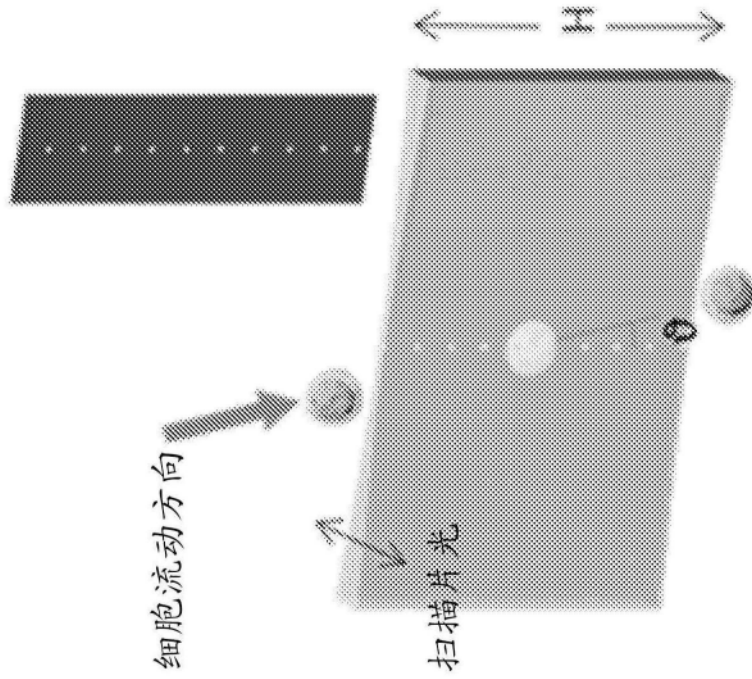


图5B

3D重构空间

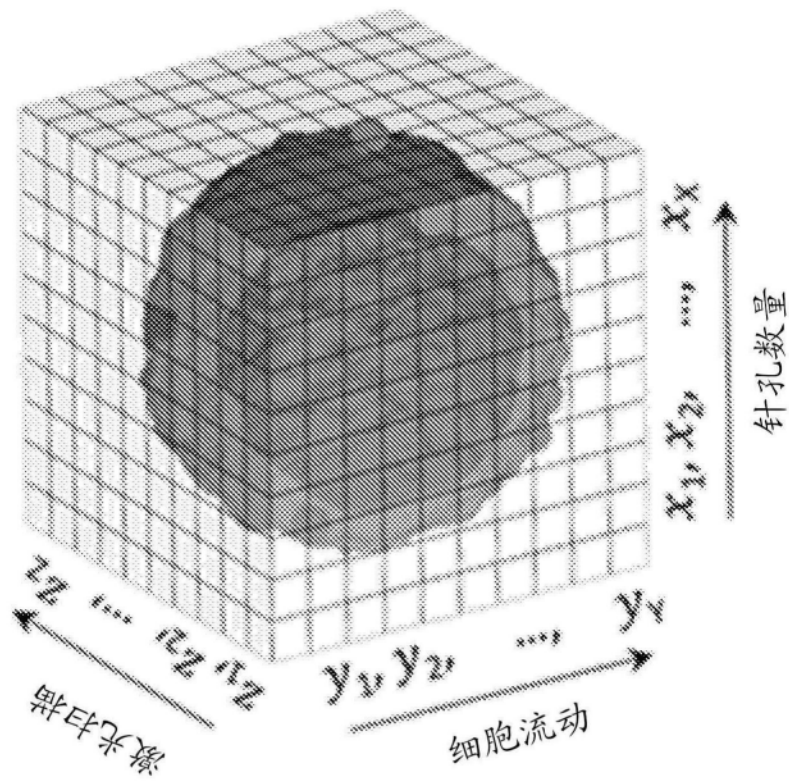


图5C

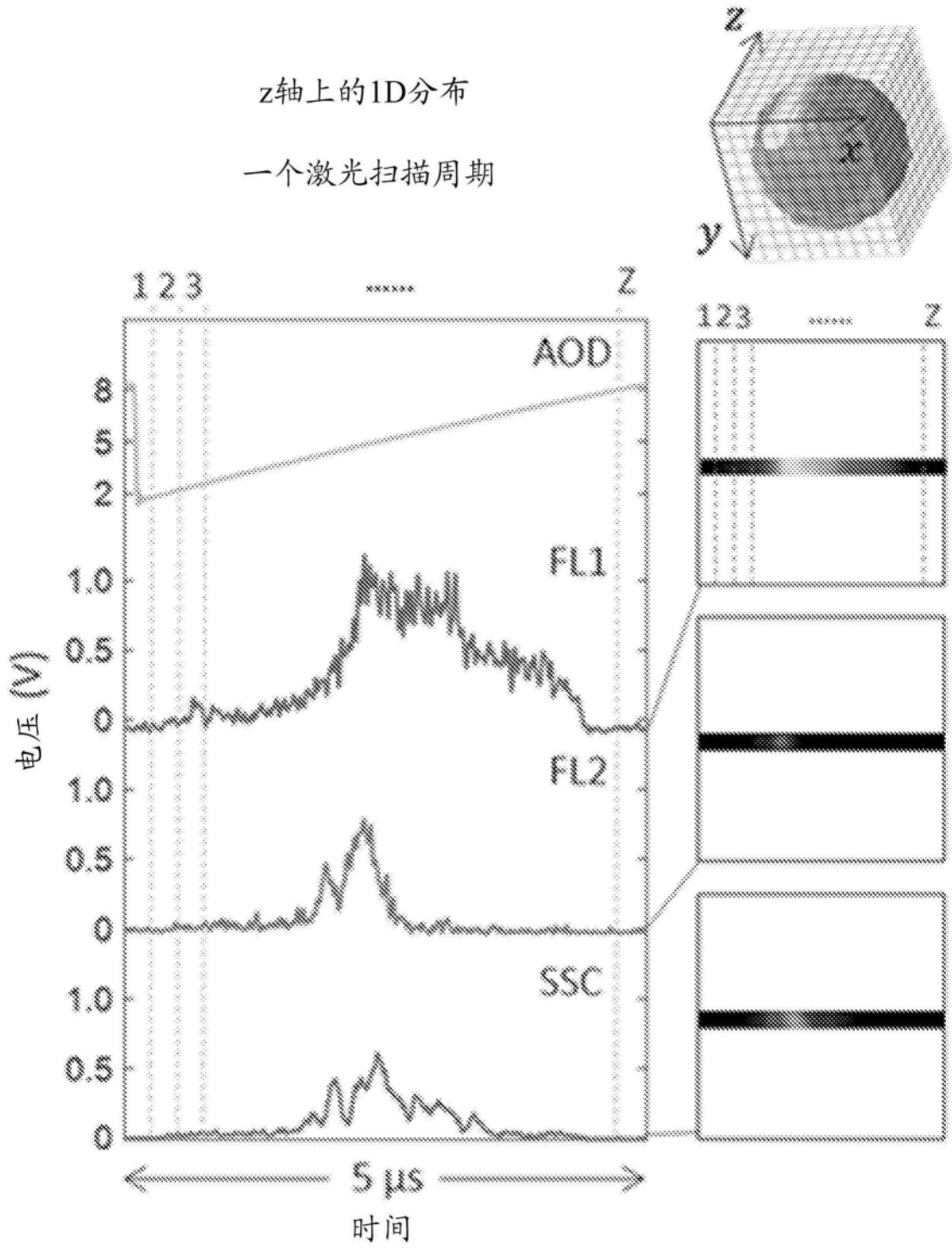


图5D

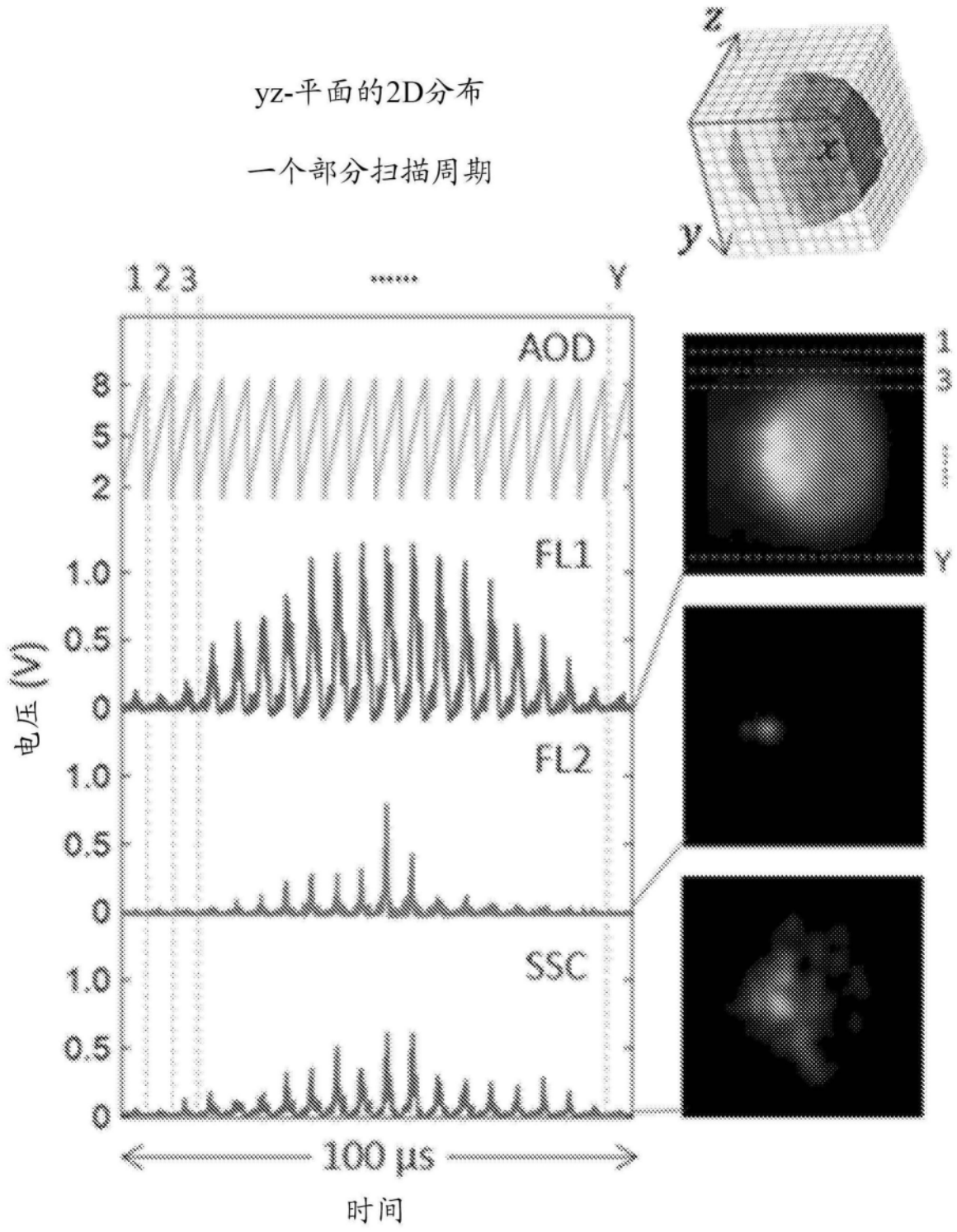


图5E

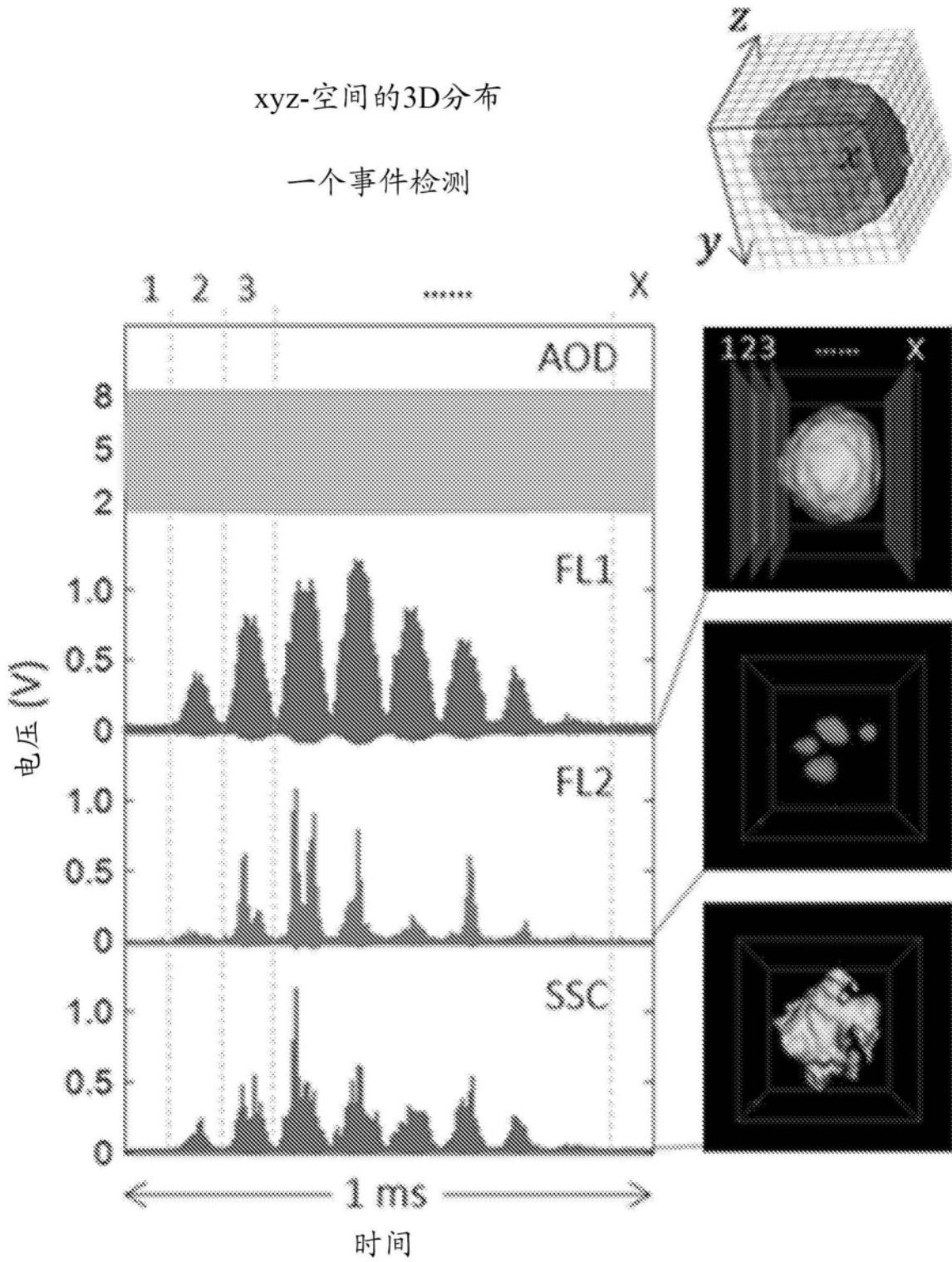


图5F

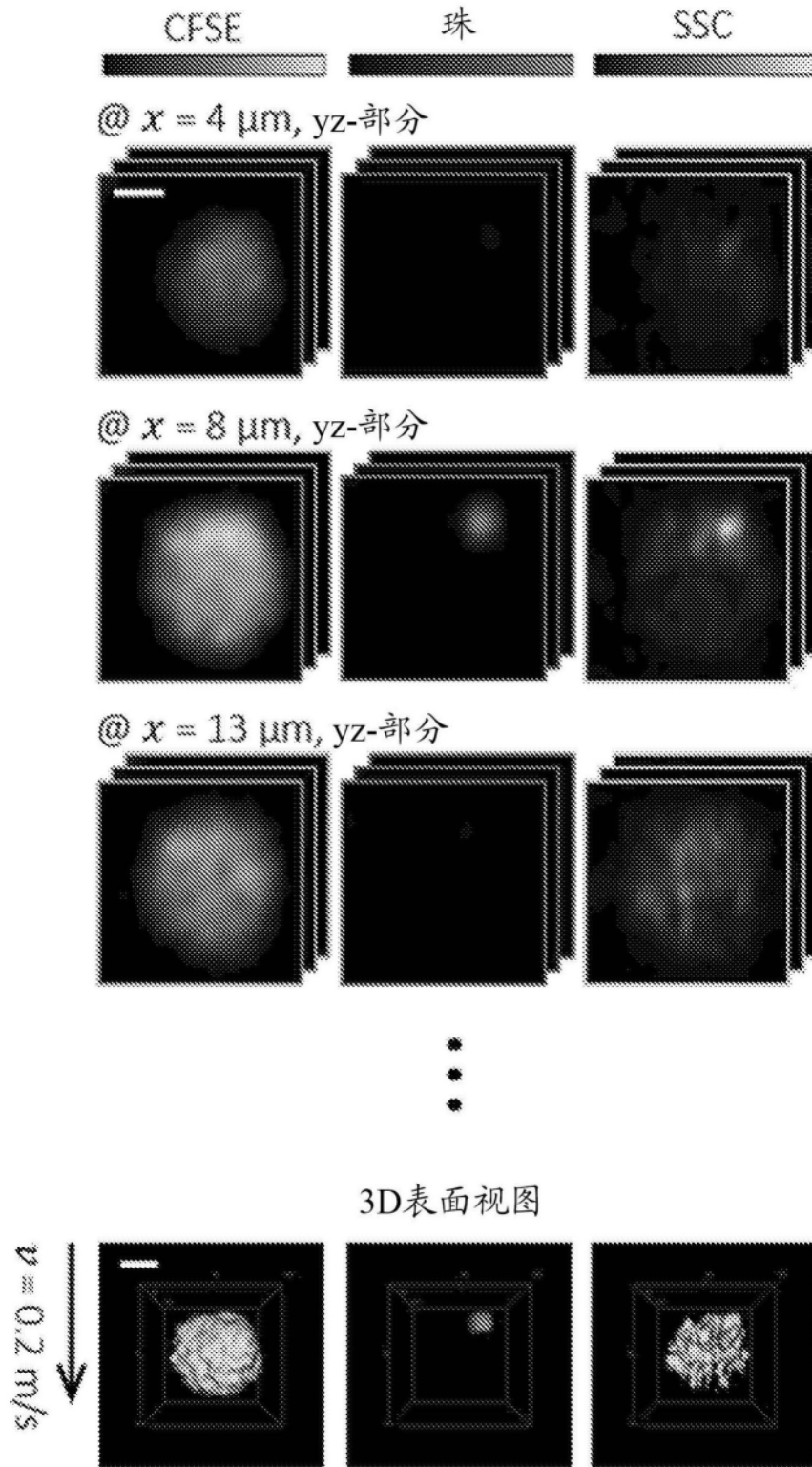


图6A

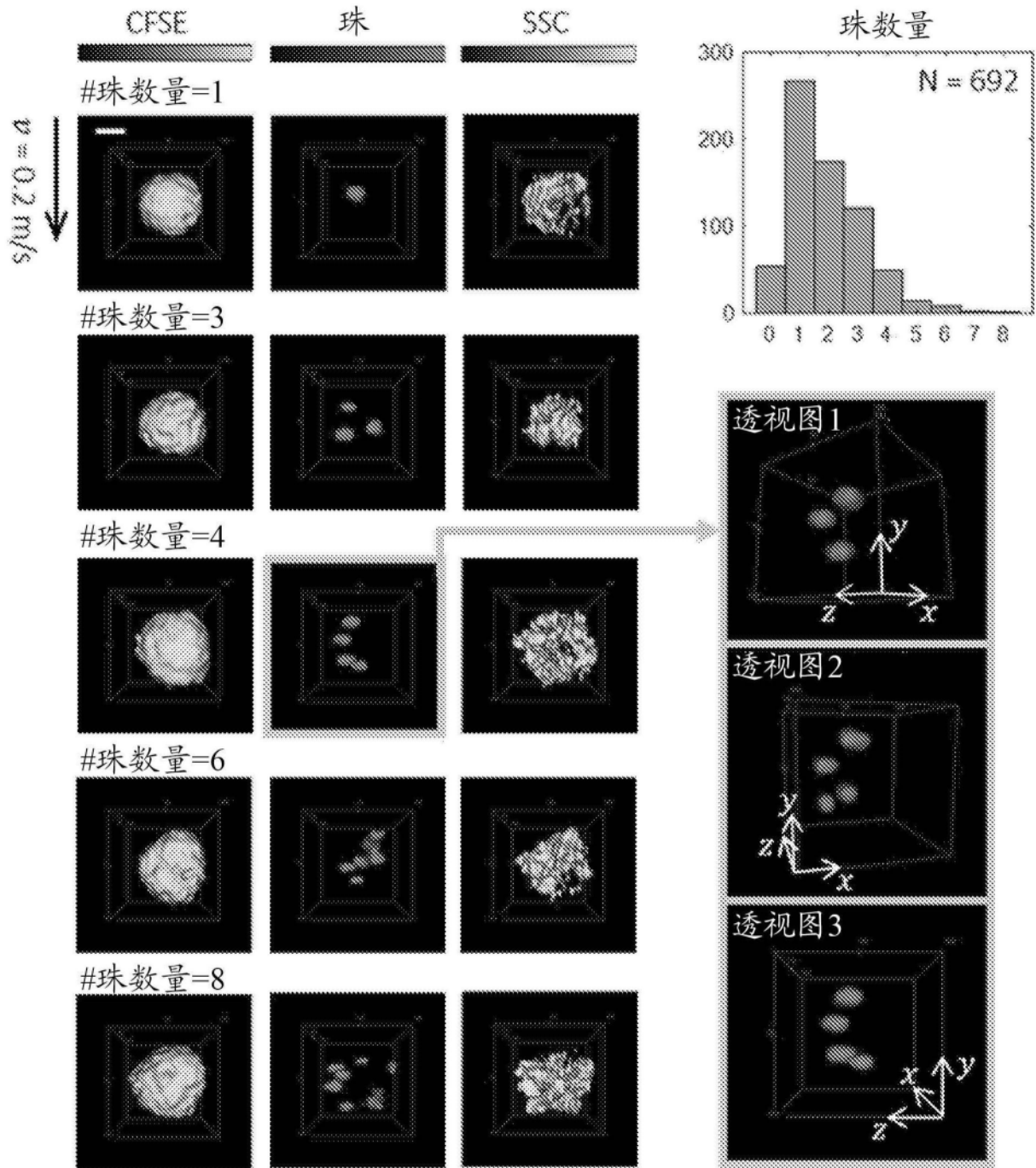


图6B

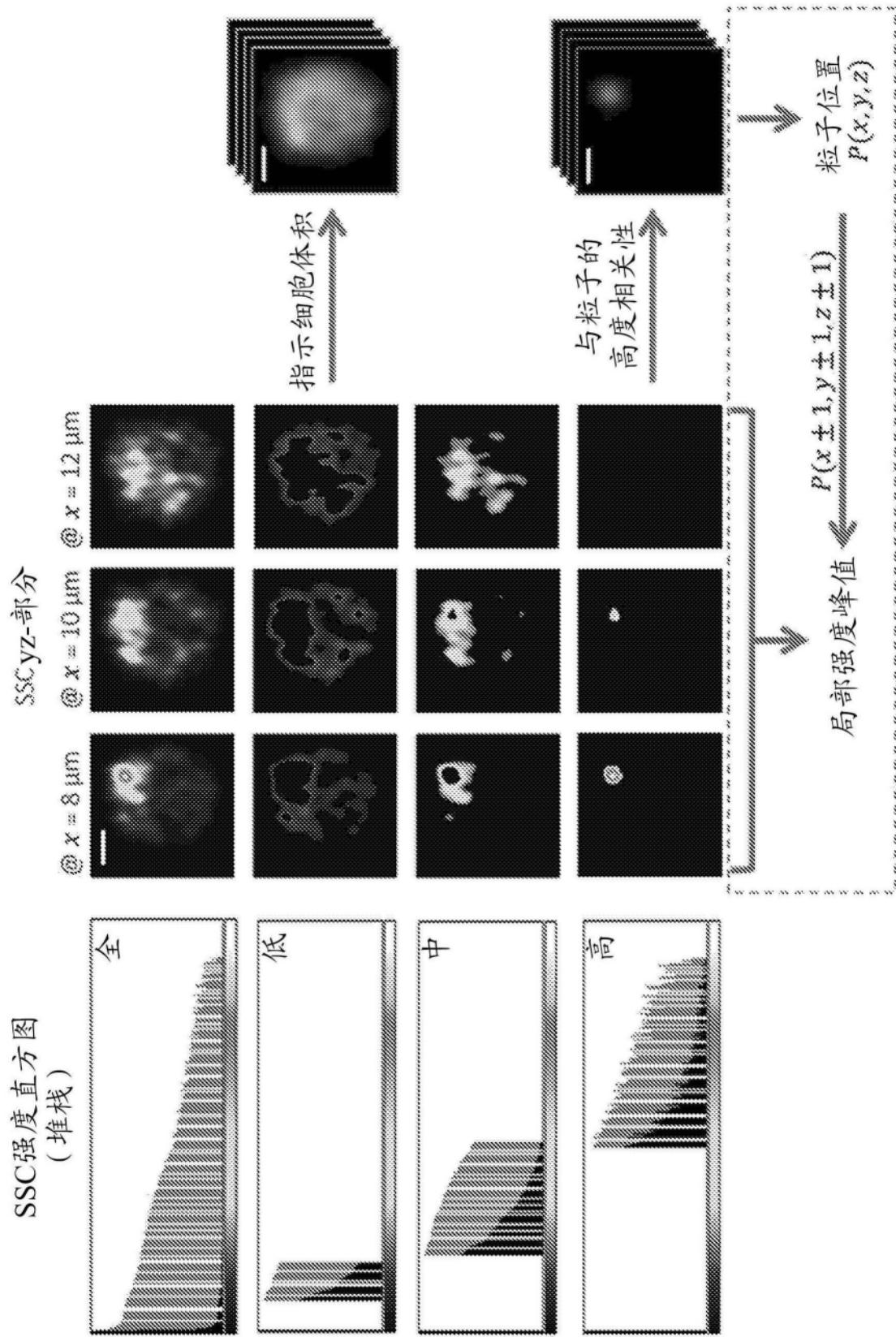


图6C

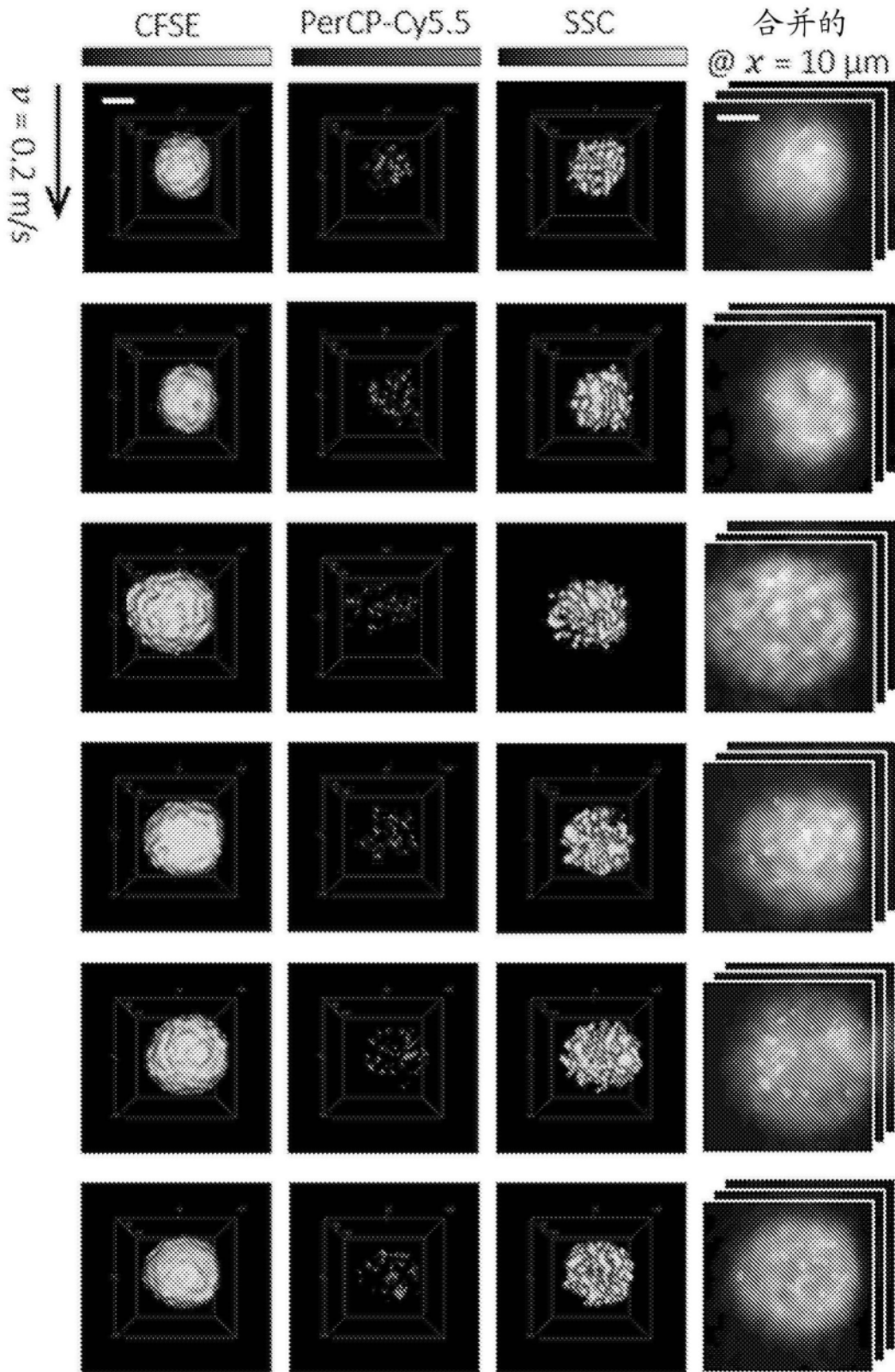


图7A

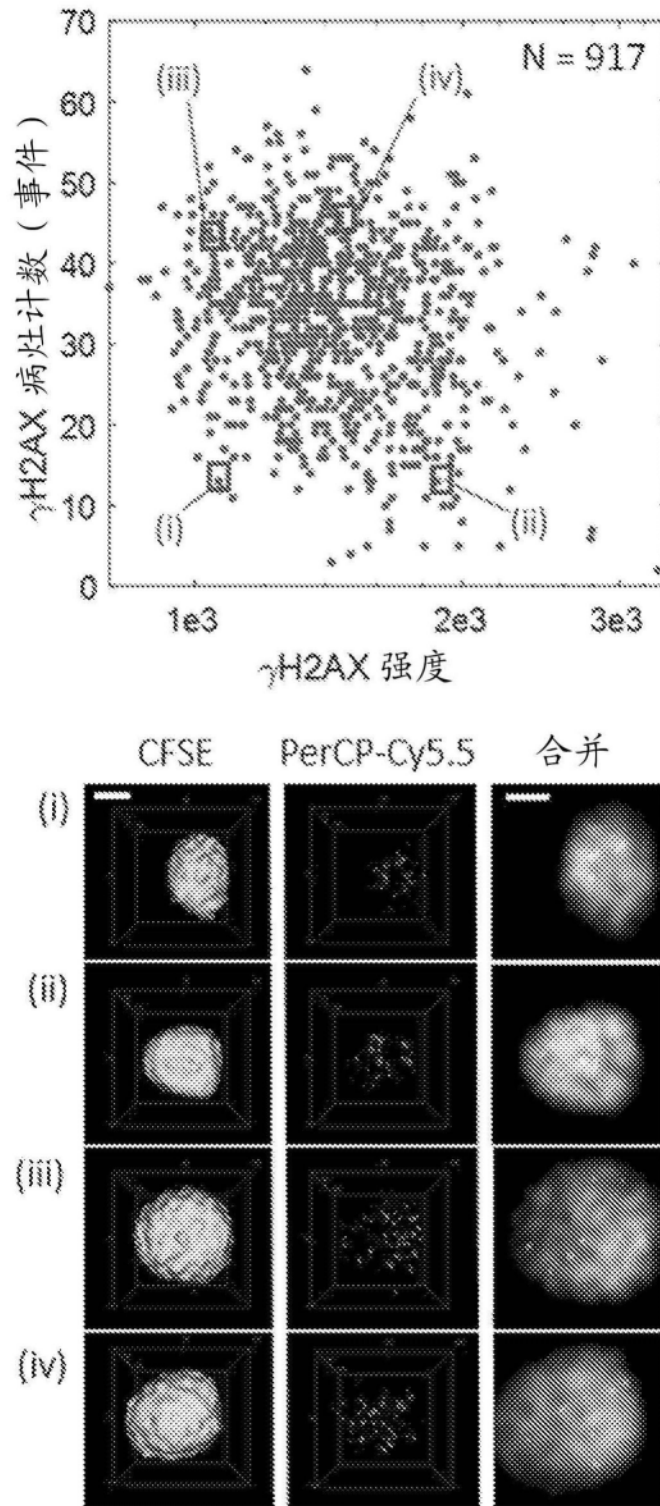


图7B

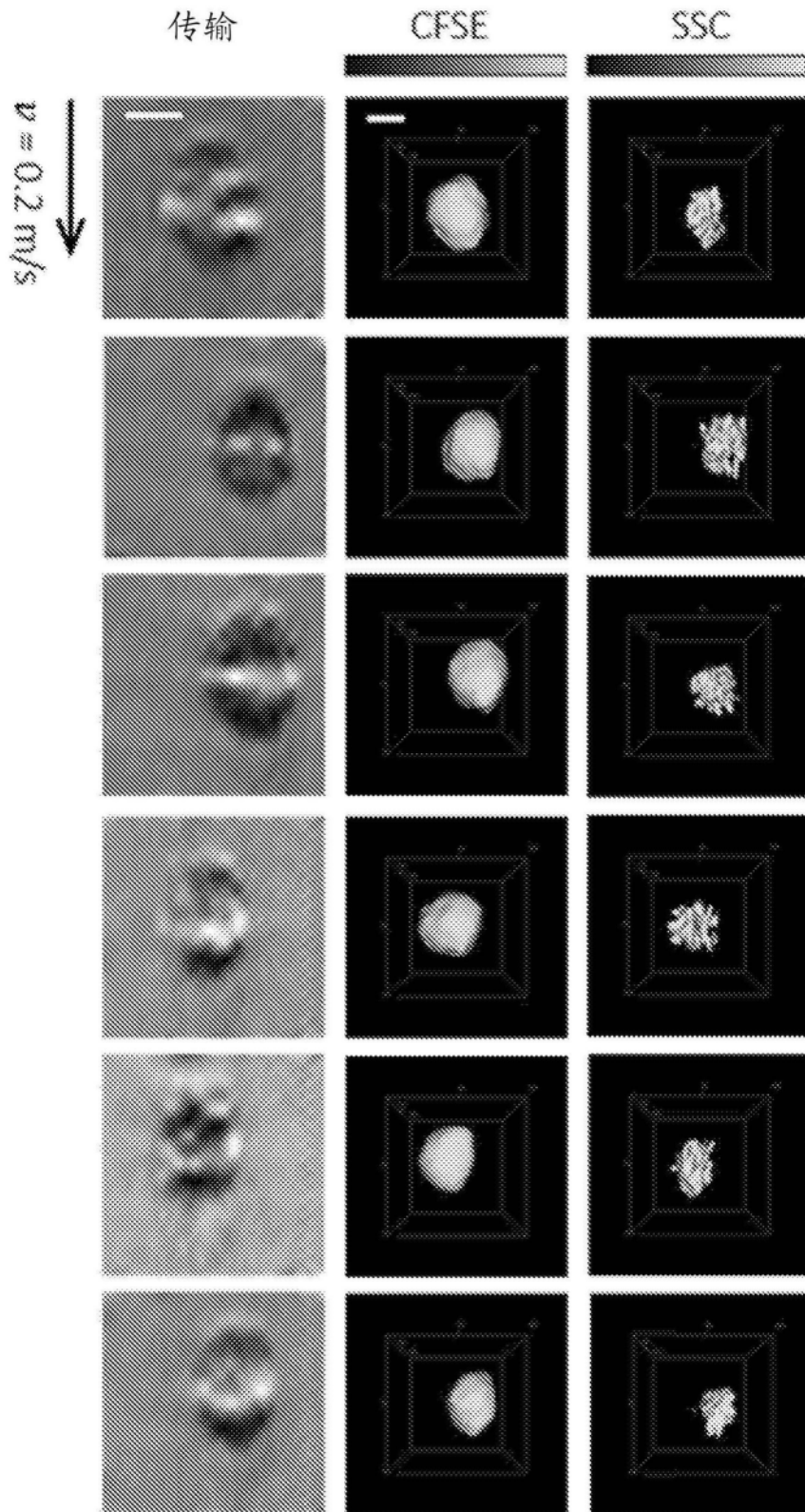


图8A

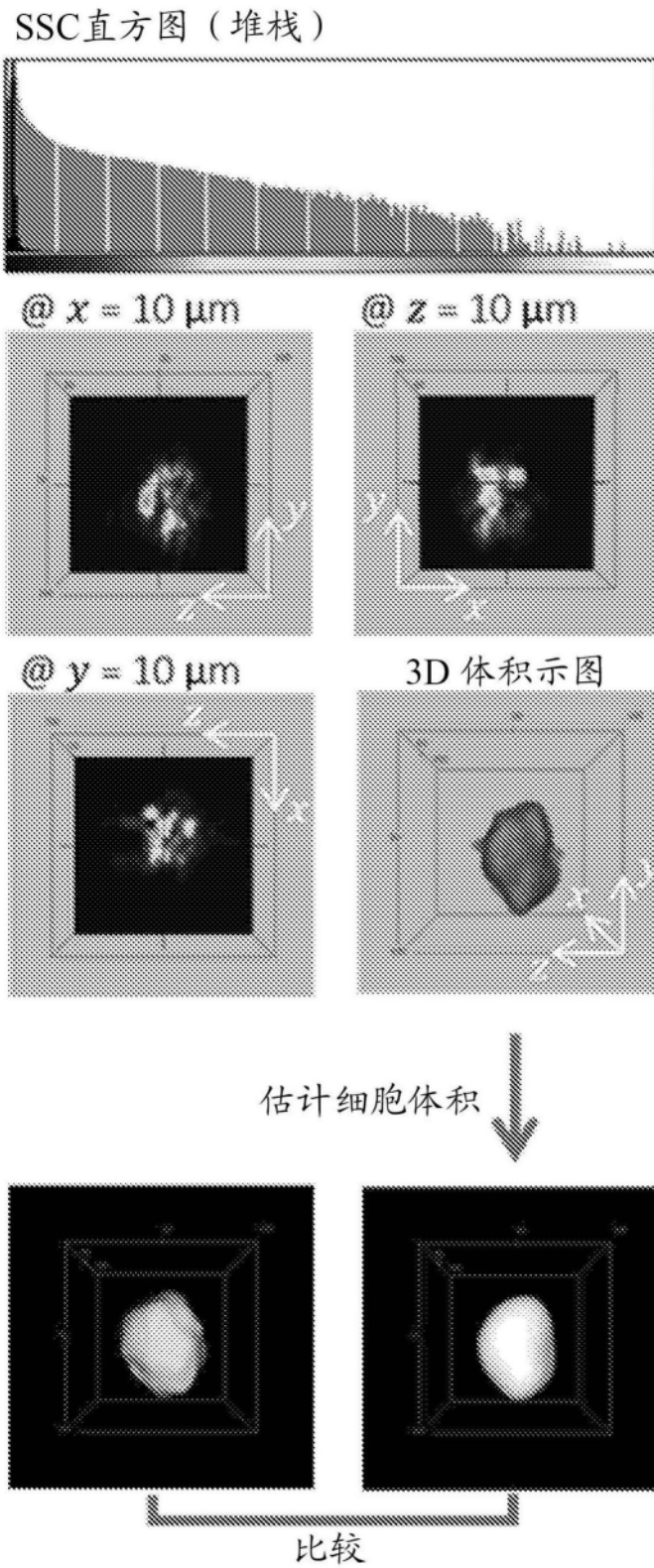


图8B

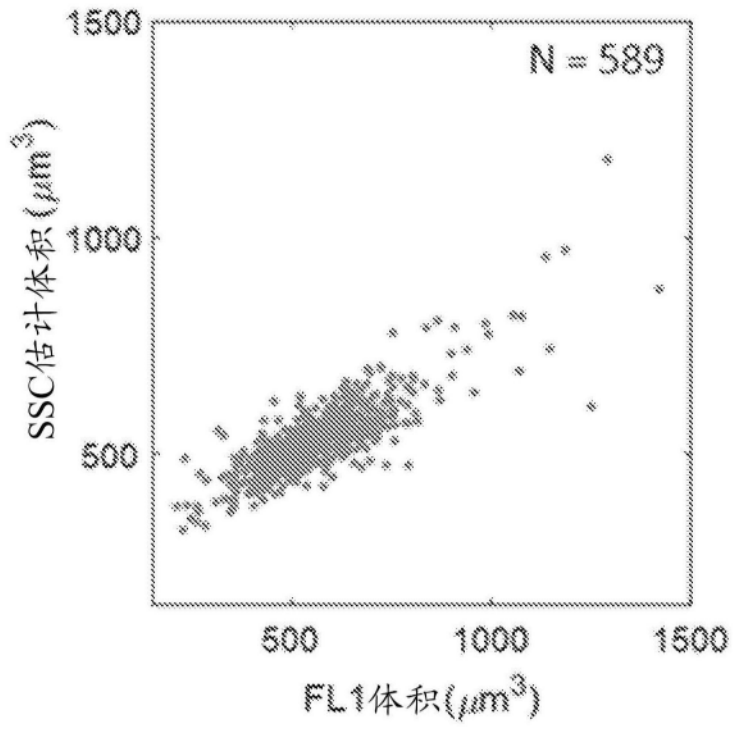


图8C

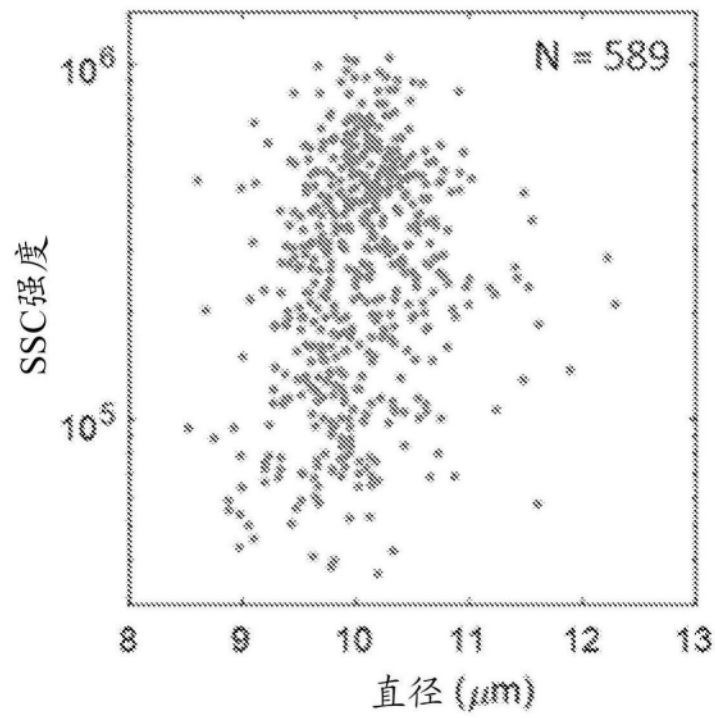


图8D

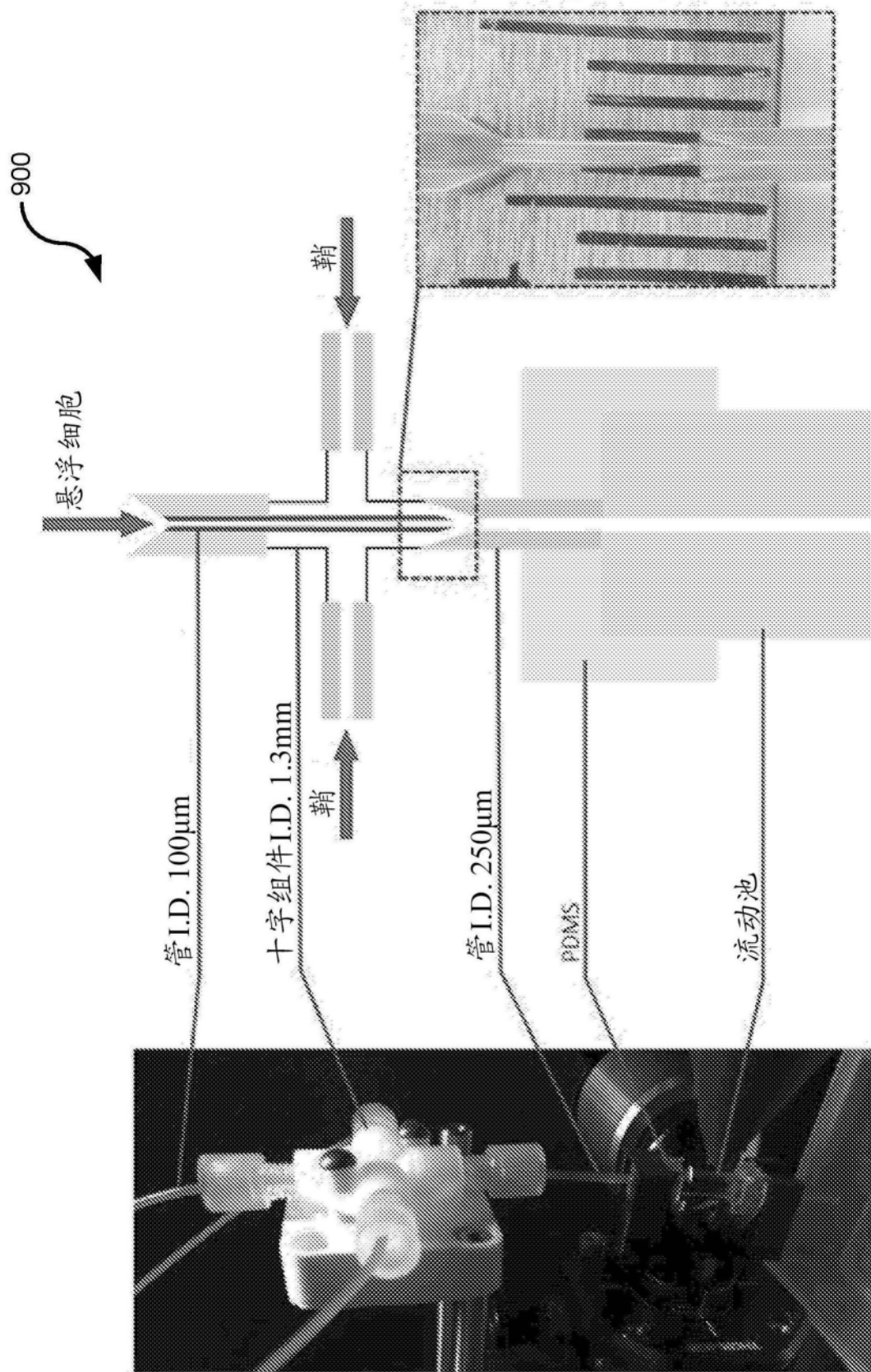


图9

用于荧光和侧向散射检测的
空间滤波器

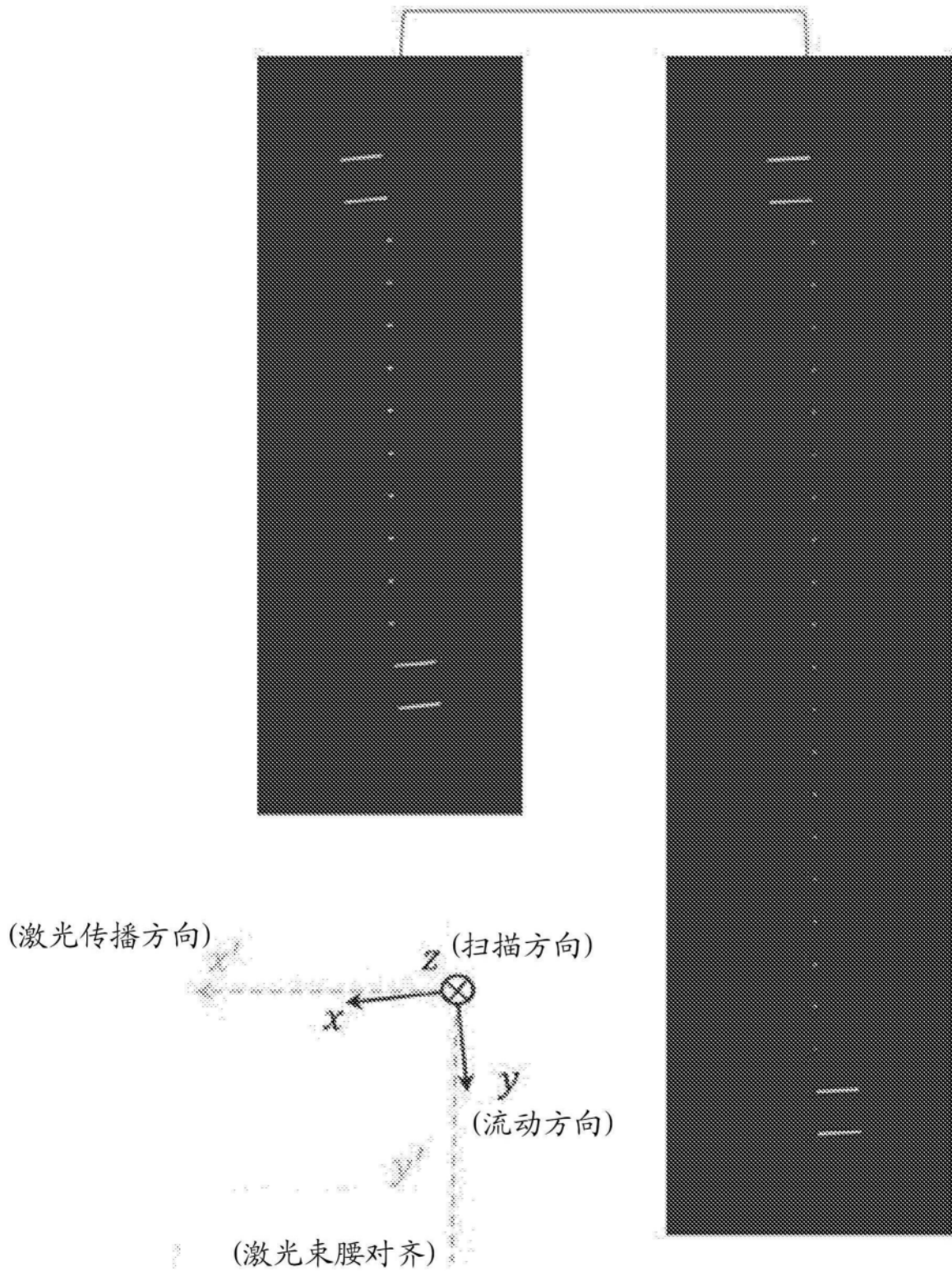


图10

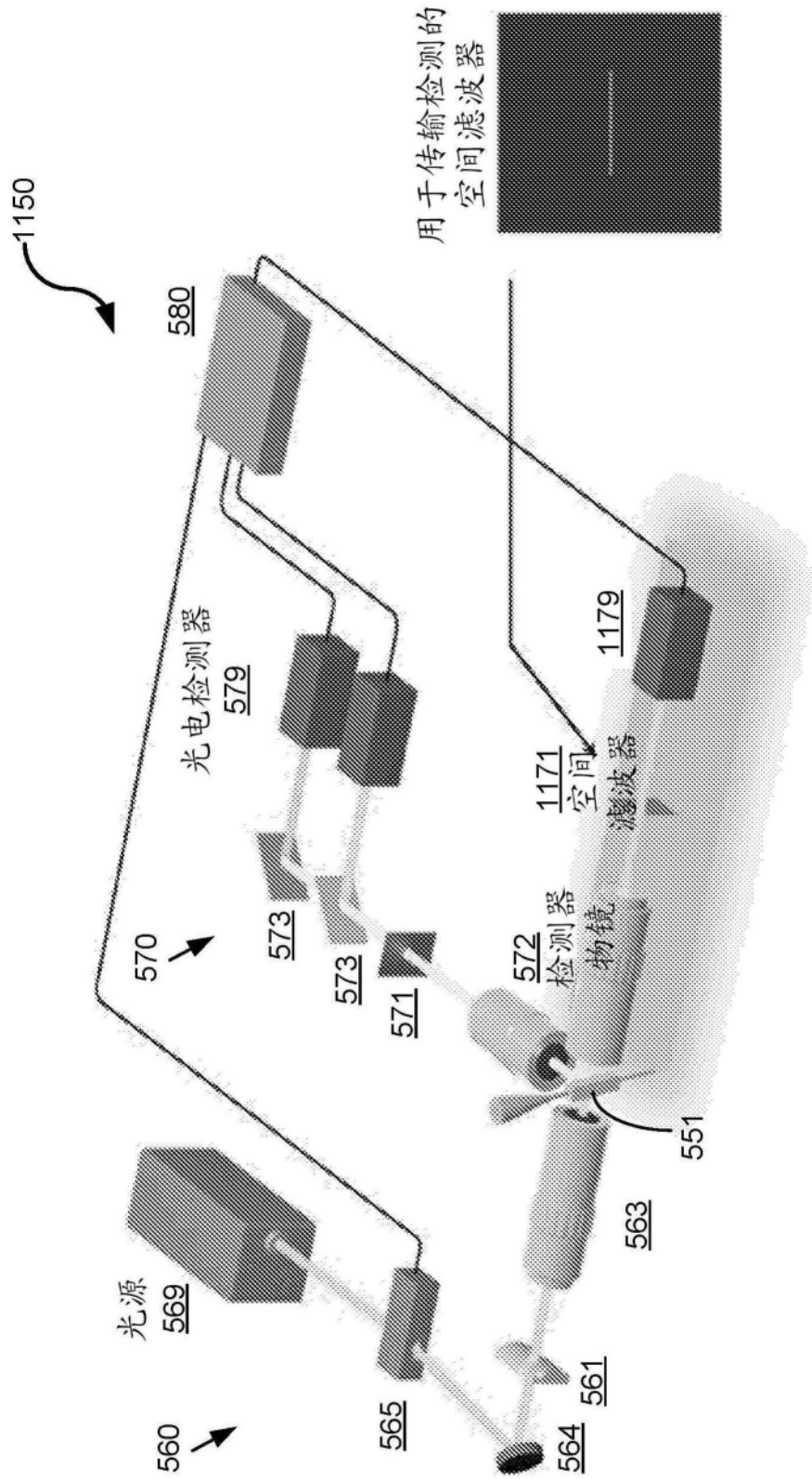


图11