(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 113906284 A
(43)申请公布日 2022.01.07

(21)申请号 202080040450.7
(22)申请日 2020.05.29
(30)优先权数据
19382444.8 2019.05.31 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.30
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/064984 2020.05.29
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/239981 EN 2020.12.03
(71)申请人 西托诺斯有限公司
地址 西班牙萨拉曼卡
(72)发明人 荷西马里奥·特内拉莫尔加多
阿尔瓦罗·罗德里格斯德拉加拉
(74)专利代理机构 北京鸿元知识产权代理有限公司 11327
代理人 李琳 陈英俊
(51)Int.Cl.
G01N 15/14(2006.01)
G01J 3/32(2006.01)
G01J 3/12(2006.01)
G01J 3/28(2006.01)
G01N 15/10(2006.01)

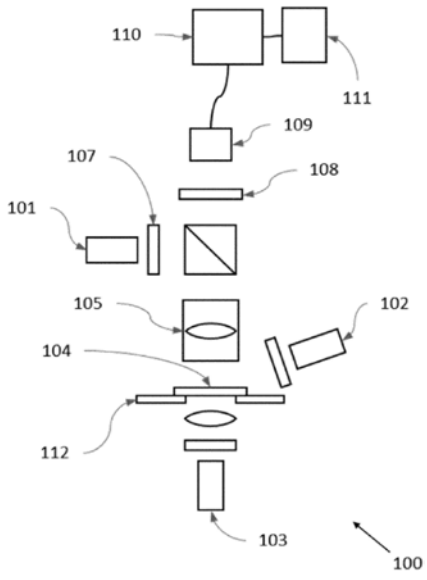
权利要求书3页 说明书13页 附图7页

(54)发明名称

高光谱定量成像细胞术系统

(57)摘要

本发明涉及发光的高光谱检测，具体地，涉及使用辐射源激发的固相样本的发光检测。



CN 113906284 A

1.一种高光谱定量成像细胞术系统(100),包括:

观察区域(104),所述观察区域(104)包括被配置为保持一个或多个固相样本的样本保持部,

至少一个辐射源(101、102、103),所述至少一个辐射源(101、102、103)被配置为对所述观察区域(104)进行辐射,

收集元件(105),所述收集元件(105)被配置为收集由所述至少一个辐射源(101、102、103)进行辐射的样本发射或反射的辐射,其中,所述收集元件(105)具有等于或小于20的放大因数值(M),并且具有等于或大于0.25的数值孔径值,

多通道滤波元件(108),所述多通道滤波元件(108)被配置为对通过所述收集元件(105)收集的所述辐射的波长进行选择性地滤波,以及

图像传感器(109),所述图像传感器(109)被配置为接收滤波后的辐射并产生作为所述样本的二维图的图像,并且所述图像传感器(109)包括辐射检测元件的二维阵列。

2.根据前述权利要求所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,所述滤波元件(108)被设置为在至少两个位置之间可移动,其中,所述滤波元件(108)的每个位置对到达所述图像传感器(109)的每个辐射检测元件的辐射的波长进行选择性地滤波。

3.根据权利要求2所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,所述系统进一步包括处理器(110),所述处理器(110)被配置为:

-接收所述样本的多个波长编码二维图(301),所述多个波长编码二维图(301)与所述滤波元件(108)的多个位置相关联,其中,所述波长编码二维图是由所述图像传感器(109)基于其针对所述滤波元件(108)的位置接收的辐射而产生的图像;

-通过结合所述样本的所述波长编码二维图(301)的与特定波长(λ)相对应的部分,产生(205)所述样本的多个单色二维图(304);

-构建包含所述多个单色二维图(304)的光谱立方体(306);

-识别所述光谱立方体(306)上的样本结构(206)并获得其光谱特征(207);

-将获得的所述光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较(208),并且/或者分解所述光谱特征,并获得(209)每个已识别的所述样本结构中的每种标志物的丰度的估值,所述标志物是所述样本上天然发射辐射或由于添加到所述样本中的分子标记的存在而发射辐射的任意组分。

4.根据权利要求2所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,所述系统进一步包括处理器(110),所述处理器(110)被配置为:

-接收所述样本的多个波长编码二维图(301),所述多个波长编码二维图(301)与所述滤波元件(108)的多个位置相关联,其中,所述波长编码二维图是由所述图像传感器(109)基于其针对所述滤波元件(108)的位置接收的辐射而产生的图像;

-通过采用多元插值过程产生(205)所述样本的与特定波长(λ)相对应的多个单色二维图(304),以基于来自所述波长编码二维图的记录针对每个像素获得以所述特定波长(λ)接收的辐射的估值;

-构建包含所述多个单色二维图(304)的光谱立方体(306);

-识别所述光谱立方体(306)上的样本结构(206)并获得其光谱特征(207);

-将获得的所述光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较(208),并且/或者

分解所述光谱特征，并获得(209)每个已识别的所述样本结构中的每种标志物的丰度的估值，所述标志物是所述样本上天然发射辐射或由于添加到所述样本中的分子标记的存在而发射辐射的任意组分。

5.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，根据透射式配置，所述观察区域(104)插设在至少一个辐射源(103)和所述收集元件(105)之间，使得所述辐射源(103)的辐射在被所述收集元件(105)收集之前通过所述观察区域(104)。

6.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，至少一个辐射源(102)、所述观察区域(104)和所述收集元件(105)根据暗场配置设置。

7.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，至少一个辐射源(101、103)、所述观察区域(104)和所述收集元件(105)根据亮场配置设置。

8.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，根据落射式配置，至少一个辐射源(101、102)的方向朝向所述观察区域(104)，使得在所述辐射源(101、102)的辐射被所述收集元件(105)收集之前，所述观察区域(104)反射所述辐射源(101、102)的所述辐射。

9.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，所述系统(100)进一步包括存储器(111)。

10.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，所述系统(100)进一步包括插设在至少一个辐射源(101、102、103)和所述观察区域(104)之间的至少一个带通滤波器(107)。

11.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，至少一个辐射源(101、102、103)是激光器、发光二极管或灯。

12.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，所述收集元件(105)包括透镜或被配置为同时捕获来自所述观察区域的多个空间位置的辐射的透镜组合。

13.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，

其中，所述收集元件(105)的放大因数值(M)等于或小于10，优选地，等于或小于2；并且/或者

其中，所述收集元件(105)的数值孔径值等于或大于0.5。

14.根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)，其中，所述滤波元件(108)是连续线性可变滤波器或半连续线性可变滤波器，优选地，在200nm和1200nm之间，更优选地，在350nm和950nm之间。

15.一种使用根据前述权利要求中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)从固相样本获得数据的方法，包括以下步骤：

步骤a)提供所述固相样本(201)；

步骤b)使用与所述样本相互作用的辐射对所述样本(202)进行辐射，使得所述样本发射辐射；

步骤c)使用所述收集元件(105)捕获发射的所述辐射；

步骤d)使用所述多通道滤波元件(108)对发射的所述辐射进行滤波；

步骤e)依序记录(204)所述样本的与所述滤波元件(108)的依序位移(203)相匹配的多

个波长编码二维图(301)，其中，所述滤波元件(108)的每个位置对到达所述图像传感器(109)的每个辐射检测元件的辐射的波长(λ)进行选择性地滤波，并且其中，所述图像传感器(109)基于其针对所述滤波元件(108)的每个位置接收的辐射产生波长编码二维图；

步骤f)基于所述样本的所述波长编码二维图(301)产生(205)所述样本的多个单色二维图(304)；

步骤g)构建包含所述多个单色二维图(304)的光谱立方体(306)；

步骤h)识别所述光谱立方体(306)上的样本结构(206)并获得其光谱特征(207)；

步骤i)将获得的所述光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较(208)，并且/或者分解所述光谱特征，并获得(209)每个已识别的所述样本结构中的每种标志物的丰度的估值，所述标志物是指所述样本上天然发射辐射或由于添加到所述样本中的分子标记的存在而发射辐射的任意组分。

16.根据权利要求15所述的方法，其中，针对多个辐射波长(Λ)和/或多个辐射模式(α)执行所述步骤b)至所述步骤f)，其中，在所述步骤f)中，当以给定辐射波长(Λ)和给定辐射模式(α)对所述样本进行辐射时，每个单色二维图(304)对应于以特定波长(λ)发射的辐射，并且其中，通过结合所述多个单色二维图(304)执行所述步骤g)。

17.根据权利要求15或16中任意一项所述的方法，其中，通过结合所述波长编码二维图的与特定波长(300)相对应的部分来产生所述单色二维图(304)。

18.根据权利要求15或16中任意一项所述的方法，其中，通过采用多元插值过程来产生所述单色二维图，以基于来自所述波长编码二维图的记录针对每个像素获得以所述特定波长(λ)接收的辐射的估值。

19.根据权利要求18所述的方法，其中，所述多元插值过程是三元三次样条插值方法。

20.根据权利要求15至19中任意一项所述的方法，其中，在所述步骤a)中，特定类别的标记已经被添加到所述固相样本(201)中，以提供对比度并使得能够检测特定组分。

高光谱定量成像细胞术系统

技术领域

[0001] 本发明涉及发光的高光谱检测，具体地，涉及使用辐射源激发的固相样本的发光检测。

背景技术

[0002] 生物组织的功能是其细胞组分协同作用的结果。这些细胞中的每一个呈现出其与组织环境相互作用产生的特定表型，并且这些机制的任何失调都可能导致诸如癌症的疾病。因此，能够在空间背景下分析单细胞特征对于理解组织在正常和疾病情况下如何工作以及帮助开发有效的治疗方法至关重要。

[0003] 通过传统的组织学和形态学评估，影响特定组织的疾病的结果可能并不总是明显的。组织的某些结构和组分可能在形态上相似，但由于疾病相关的失调而呈现出分子成分的重大差异。在这种情况下，需要采用多种和更具体的染色法(如免疫学方法提供的染色法)，以识别这些差异。这方面的一个示例是在研究中的组织内识别免疫细胞。它们的存在可能是由于影响组织并导致这些细胞聚集到损伤区域的疾病状况造成的，或者，另一方面，它们的存在可能是影响组织的疾病的主要原因。

[0004] 在这两种情况下，必须正确识别这些细胞的谱系和功能状态，尤其是在小淋巴细胞的情况下，即使专家的形态学评估也不足以揭示这些细胞的性质、起源和异质性。只有多参数免疫分型方法能使正确的细胞浸润的特性和异质性评估成为可能。此外，与能够获得组织成分的多参数信息一样重要的是，不同表型识别特征与组织中观察到的可能的解剖学上的变化的关联。这些变化可以通过本领域专家的直接观察来识别。

[0005] 当应用于细胞悬液时，使用流式细胞术对单细胞进行多参数分析已经被证明是揭示正常和疾病情况下细胞表型异质性的基础。现代流式细胞仪可以同时分析几十个参数，并且多光谱系统的发展和质谱细胞术的出现有望在不久的将来推动这些数量的增加。然而，这些技术无法在不干扰组织固有结构的情况下对组织样本起作用，也无法研究组织的细胞外环境的成分。另一方面，尽管是细胞形态可视化和空间定位的标准选择，显微镜仪器无法对统计上显著数量的细胞进行定量和客观的细胞组分分析，并且缺乏诸如流式细胞术的其他方法中存在的标准化能力。

[0006] 其他人试图通过以下方法解决这些问题中的一些问题：调整流式细胞仪的配置，以使用激光扫描固定在显微镜载玻片上的样本，以便激发样本上的荧光分子，并逐像素构建组织上存在的分子的表示(激光扫描细胞术)。这一构思后来被调整为使用质谱而不是荧光检测，以增加同时分析的分子数量(成像质谱细胞术)。然而，由于需要一次研究一个像素的生物组织，所以这两种方法都相当缓慢。

[0007] 因此，需要一种提供固定在固相样本支撑部中的细胞和/或组织的标志物的大小和表达的定量数据的系统。

[0008] 目前最常用的方法是使用常规显微镜执行多个单参数研究。这种方法保持了样本(通常是生物固体组织)的总体结构，但不是定量的，并且缺乏复杂研究所需的多参数维度。

[0009] 或者,可以采用多参数流式细胞术来获得生物组织的多参数信息,但以由于获得单细胞悬液所需的组织分解而导致的空间信息丢失为代价。

[0010] 通过调整流式细胞仪的配置来扫描固定在显微镜载玻片上的样本,已经开发了激光扫描细胞术(LSC)。其使用激光激发样本上的荧光分子,并逐像素构建组织上存在的分子的表示。因此,尽管是所有“颜色”同时采样的快照系统,但这是非常缓慢的方法。此外,这种技术在多路复用方面的潜力仍然非常有限,仅允许同时研究3至4个参数。

[0011] 以类似的方式,其他人已经调整了质谱细胞术,以执行对固体组织的研究(成像质谱细胞术-IMC)。与LSC不同,IMC使用金属轭合物而不是荧光或显色轭合物来揭示组织组分,并且还具有较高的多路复用潜力。然而,与LSC一样,由于样本是以单像素为基础“成像”的,所以该方法也有同样的缺点,是非常缓慢的技术。

[0012] 或者,多光谱和高光谱功能已经应用于基于显微镜的系统,以增加可以同时分析的标志物的数量。使用二维传感器采样数据,这些系统可以同时采样多个空间位置;然而,这些系统旨在提供视觉信息,而不是可重现和可量化的数据,并且这些系统被设计为主要提供少量生物材料的高分辨率信息,而不是分析大面积的组织。

发明内容

[0013] 本发明通过根据权利要求1所述的高光谱定量成像细胞术系统和根据权利要求15所述的方法提供上述问题的解决方案。在从属权利要求中,定义了本发明的优选实施例。

[0014] 本发明提供了一种系统和方法,以通过专注于具有细胞分辨率而不是亚细胞级分辨率的整体组织结构来以快速方式从固定在固相样本支撑部上的生物样本的细胞和组织获得关于标志物的大小和表达的定量数据。

[0015] 在第一发明方面中,本发明提供了一种高光谱定量成像细胞术系统,包括:

[0016] 观察区域,观察区域包括被配置为保持一个或多个固相样本的样本保持部,

[0017] 至少一个辐射源,至少一个辐射源被配置为对观察区域进行辐射,

[0018] 收集元件,收集元件被配置为收集由至少一个辐射源进行辐射的样本发射或反射的辐射,

[0019] 多通道滤波元件,多通道滤波元件被配置为对通过收集元件收集的辐射的波长进行选择性地滤波,以及

[0020] 图像传感器,图像传感器被配置为接收滤波后的辐射并产生作为样本的二维图的图像,并且图像传感器包括辐射检测元件的二维阵列。

[0021] 固相样本通常设置在固相样本支撑部上。在一个实施例中,样本保持部被配置为保持至少一个固相样本支撑部,每个支撑部适于容纳固定样本(优选地,生物样本)。支撑部可以具有不同的材料(优选地,结晶和对光透明的材料(例如,玻璃或塑料)),并且具有不同的形状和尺寸(优选地,矩形形状(例如,显微镜载玻片))。

[0022] 术语“组分”将用于表示细胞或组织中天然存在的任意分子。术语“标记”和“分子标记”将用于表示添加到样本中以表明样本中天然存在的特定组分的存在的任意物质。术语“标志物”将用于定义样本上天然发射辐射或由于添加到样本中的分子标记的存在而发射辐射的任意组分;标志物用于定义细胞或组织的本质。术语“光谱特征”用于表示结构或像素的由于存在于该结构或像素中的标志物的独特结合而产生的独特发射光谱。术语“列

表模式文件”用于表示数据文件结构，在数据文件结构中，存储关于不同感兴趣要素(如生物结构)的信息，并且这些要素中的每一个由多行列表上的一行表示。

[0023] 至少一个辐射源被设置为对观察区域进行辐射。因此，当观察区域中存在样本时，辐射与样本的组分相互作用，并且如果存在与样本结合使用的分子标记，则与分子标记相互作用。通过这种相互作用，样本会因诸如散射、荧光、磷光、化学发光或选择性吸收/透射的任意过程而发射辐射。使用收集元件收集样本发射的辐射，辐射通过多通道滤波元件并且到达图像传感器。多通道滤波元件应当理解为光谱特性沿滤波器变化的滤波器，从而提供入射辐射的位置相关滤波。

[0024] 图像传感器包括辐射检测元件的二维阵列。辐射检测元件接收辐射并提供与在每个辐射检测元件处接收的辐射相关的输出。因此，产生作为样本的二维图的图像。在一个实施例中，图像传感器是电荷耦合器件(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)或电子倍增器电荷耦合器件(EMCCD)。

[0025] 优选地，多通道滤波元件设置在收集元件和图像传感器之间，并与它们间隔开。在特定实施例中，系统进一步包括至少一个透镜，至少一个透镜被配置为将通过收集元件捕获或收集的图像投影到平面上；多通道滤波元件位于图像投影的平面处，使得图像投影在滤波元件上；系统包括至少一个附加透镜，附加透镜被配置为捕获通过多通道滤波元件滤波的中间图像并将其投影到图像传感器。换句话说，滤波元件位于第一透镜投影形成在收集元件和图像传感器之间的中间图像的精确平面上(或与之略微偏移)。因此，可以使用两个透镜或类似地，使用两组透镜来形成并收集中间图像。

[0026] 在一个实施例中，至少一个辐射源被配置为发射波长在紫外线(UV)、可见光(VIS)或近红外(NIR)范围内的辐射，优选地，在200nm至1200nm的范围内，更优选地，在350nm至950nm的范围内。系统可以包括一个或多个辐射源。在一个实施例中，系统包括多个辐射源，每个辐射源被配置为以不同的波长间隔发射辐射，例如，包含在525nm至625nm的范围内的波长。

[0027] 在一个实施例中，滤波元件被设置为在至少两个位置之间可移动，其中，滤波元件的每个位置对到达图像传感器的每个辐射检测元件的辐射的波长进行选择性地滤波。在优选实施例中，滤波元件被设置为可移动到多个位置。优选地，滤波元件的移动平行于收集元件的视场(FOV)的空间维度之一。

[0028] 在一个实施例中，滤波元件是连续线性可变滤波器或半连续线性可变滤波器。优选地，滤波元件被配置为对200nm和1200nm之间，更优选地，350nm和950nm之间的辐射波长进行滤波。

[0029] 在一个实施例中，观察区域插设在至少一个辐射源和收集元件之间，使得辐射源的辐射在被收集元件收集之前通过观察区域，即，根据透射式(trans-illumination)配置。

[0030] 在一个实施例中，至少一个辐射源设置在观察区域与收集元件的同一侧，使得观察区域在辐射源的辐射被收集元件收集之前反射辐射，即，根据落射式(epi-illumination)配置。

[0031] 在一个实施例中，至少一个辐射源和收集元件被设置为使得来自辐射源的辐射束相对于收集元件的光轴以非零角度定向，即，根据暗场配置。

[0032] 在一个实施例中，至少一个辐射源和收集元件(105)被设置为使得来自辐射源的

辐射束沿收集元件的光轴定向，即，根据亮场配置。

[0033] 在优选实施例中，系统包括多个辐射源，每个辐射源提供给定波长(Λ)的辐射，并且根据选自亮场落射式、暗场落射式、亮场透射式和暗场透射式中的不同辐射模式(α)设置。

[0034] 在一个实施例中，系统包括处理器。在特定实施例中，处理器是计算机(例如，个人计算机)的一部分。

[0035] 在一个实施例中，处理器被配置为执行以下步骤：

[0036] -接收样本的多个波长编码二维图，多个波长编码二维图与滤波元件的多个位置相关联，其中，波长编码二维图是由图像传感器基于其针对滤波元件位置接收的辐射而产生的图像；

[0037] -通过结合样本的波长编码二维图的与特定波长相对应的部分，产生样本的多个单色二维图；

[0038] -构建包含多个单色二维图的光谱立方体；

[0039] -识别光谱立方体上的样本结构并获得其光谱特征；

[0040] -将获得的光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较，并且/或者分解光谱特征并获得每个已识别样本结构中的每种标志物的丰度的估值，标志物是样本上天然发射辐射或由于添加到样本中的分子标记的存在而发射辐射的任意组分，因此标志物用于定义细胞或组织的本质。

[0041] 在替代实施例中，系统包括处理器，处理器被配置为：

[0042] -接收样本的多个波长编码二维图，多个波长编码二维图与滤波元件的多个位置相关联，其中，波长编码二维图是由图像传感器基于其针对滤波元件位置接收的辐射而产生的图像；

[0043] -通过针对单色二维图的每个像素经由多元插值过程从全部波长编码二维图估计特定波长(λ)处的测量信号，产生样本的与特定波长(λ)相对应的多个单色二维图；

[0044] -构建包含多个单色二维图的光谱立方体；

[0045] -识别光谱立方体上的样本结构并获得其光谱特征；

[0046] -将获得的光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较，并且/或者分解光谱特征并获得每个已识别样本结构中的每种标志物的丰度的估值，标志物是样本上天然发射辐射或由于添加到样本中的分子标记的存在而发射辐射的任意组分，因此标志物用于定义细胞或组织的本质。

[0047] 在一个实施例中，处理器被配置为获得样本结构的大小和/或形状。

[0048] 在一个实施例中，处理器被配置为针对多个辐射波长(Λ)和/或多个辐射模式(α)执行任意前述步骤，其中每个单色二维图对应于在以给定辐射波长(Λ)和给定辐射模式(α)对样本进行辐射时以特定波长(λ)发射的辐射，其中通过结合多个单色二维图来执行构建光谱立方体的步骤。

[0049] 在一个实施例中，处理器被配置为控制样本的与滤波元件的依序位移相匹配的多个波长编码二维图的依序记录。在另一个实施例中，系统包括第二处理器，第二处理器被配置为控制样本的与滤波元件的依序位移相匹配的多个波长编码二维图的依序记录。优选地，滤波元件是连续线性可变滤波器或半连续线性可变滤波器，更优选地，是连续线性可变

滤波器。

[0050] 在一个实施例中，系统包括用于数据存储的存储器。在特定实施例中，用于数据存储的存储器是诸如硬盘驱动器、EEPROM存储器或光盘的非易失性计算机存储器。

[0051] 在一个实施例中，至少一个辐射源是激光器、发光二极管或灯。辐射源可以配置为提供单色或宽波段辐射。

[0052] 在一个实施例中，系统包括插设在至少一个辐射源和观察区域之间的带通滤波器。有利地，带通滤波器使得能够选择由宽波段辐射源发射的特定辐射波长。

[0053] 在一个实施例中，收集元件包括透镜或被配置为同时捕获来自观察区域的多个空间位置的辐射的透镜组合。

[0054] 在一个实施例中，收集元件的放大因数值小于20，优选地，小于10，更优选地，小于2。

[0055] 在一个实施例中，收集元件的数值孔径值大于0.25，优选地，等于或大于0.5。

[0056] 在第二发明方面中，本发明提供了一种使用根据第一发明方面的任意实施例的高光谱定量成像细胞术系统从固相样本获得数据的方法，该方法包括以下步骤：

[0057] a)提供样本；

[0058] b)使用与样本相互作用的辐射对样本进行辐射，使得样本发射辐射；

[0059] c)使用收集元件捕获发射的辐射；

[0060] d)使用多通道滤波元件对发射的辐射进行滤波；

[0061] e)依序记录样本的与滤波元件的依序位移相匹配的多个波长编码二维图，其中，滤波元件的每个位置对到达图像传感器的每个辐射检测元件的辐射的波长进行选择性地滤波，并且其中，图像传感器基于其针对滤波元件的每个位置接收的辐射产生波长编码二维图；

[0062] f)通过结合样本的波长编码二维图的与特定波长相对应的部分，产生样本的多个单色二维图；

[0063] g)构建包含多个单色二维图的光谱立方体；

[0064] h)识别光谱立方体上的样本结构并获得其光谱特征；

[0065] i)将获得的光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较，并且/或者分解光谱特征并获得样本的每个已识别样本结构中的每种标志物的丰度的估值。

[0066] 根据本发明的方法，使用一个或多个辐射源发射的辐射对位于观察区域中的样本进行辐射。样本的组分可以选择性地吸收特定波长的辐射，并且通常以不同的波长发射辐射。通常，样本的内部组分可能缺乏足够的对比度，无法直接研究，在这种情况下，可以向样本添加特定类别的标记，以提供对比度并使得能够检测特定组分。这些组分可以是DNA、蛋白质、脂质、碳水化合物等，多种标记可以用于同时研究多种组分。一些标记可以选择性地吸收特定波长的辐射，并且在使用宽波段辐射源辐射时发射与所吸收辐射互补的波长的辐射(显色标记)。其他标记在使用特定波长的高能辐射进行辐射时可以发射波长光谱高于所吸收辐射的辐射(荧光标记)。荧光或显色标记可以是对特定分子具有天然亲和力的荧光染料或色原，或者可以是亲和力分子(例如，抗体、DNA报道分子或文献中已知的其他亲和力分子)和报道分子(例如，色原或荧光染料)的组合。

[0067] 样本发射的辐射由收集元件收集。在被收集元件收集之后并且在到达图像传感器

之前，发射的辐射被引导通过多通道滤波元件。取代滤波元件，依序记录样本的多个波长编码二维图，其中滤波元件的每个位置对到达图像传感器的每个辐射检测元件(或辐射元件组)的辐射的波长进行选择性地滤波。因此，对于滤波元件的每个位置，图像传感器基于其接收的辐射产生波长编码二维图。在一个实施例中，滤波元件平行于收集元件视场的空间维度之一移动，滤波元件通过整个视场的完全位移所需的步骤数定义所拍摄的波长编码二维图的数量。

[0068] 通过多个波长编码二维图构建样本的多个单色二维图。在一个实施例中，通过结合波长编码二维图的与特定波长相对应的部分来构建样本的单色二维图。因此，获得样本的多个单色二维图，其中这些单色二维图中的每一个具有在以给定辐射源对样本进行辐射时以给定波长发射的辐射的信息。获得的这组不同的单色二维图构成光谱立方体。

[0069] 使用图像传感器获得的图像由多个像素形成，每个像素对应于辐射检测元件的输出。对于每个像素，该方法提供不连续发射光谱，其中与特定波长相对应的光谱点存在于与该波长相关联的单色二维图中。

[0070] 每个不连续发射光谱通常由几个重叠的纯发射光谱形成，其中每个纯发射光谱对应于特定标志物。纯发射光谱的重叠或混合的程度取决于样本中标志物的空间分布。

[0071] 在获得光谱立方体之后，基于获得的光谱和空间信息识别样本中存在的样本结构，并针对每个识别的结构获得特定光谱特征。因此，获得了“列表模式”文件，在“列表模式”文件中，针对识别的每个结构存储了关于光谱特征和空间定位的信息。

[0072] 最后，将每个结构的光谱特征与一组已知光谱特征进行比较，并且/或者分解(未混合)每个结构的光谱特征，并获得针对该结构的每种标志物的丰度的估值。

[0073] 也就是说，在本实施例中，通过结合波长编码二维图的与特定波长相对应的部分来产生单色二维图。在该方法的步骤f)的替代实施例中，通过采用多元插值过程来产生单色二维图，以基于来自波长编码二维图的记录针对每个像素获得以特定波长(λ)接收的辐射的估值。

[0074] 多元插值计算可以通过诸如多项式插值、最近邻插值、克里格法、反距离加权、自然邻点插值、径向基函数插值、三线性插值、三元三次插值(tricubic interpolation)、样条插值等的文献中已知的各种方法执行。

[0075] 在优选实施例中，多元插值过程是三元三次样条插值方法。

[0076] 在特定实施例中，步骤h)使用空间分割(也指空间聚类)识别光谱立方体中的结构，并通过以下方式获得其特定光谱特征：

[0077] 确定与样本结构相对应的像素的数量，

[0078] 识别被视为表示背景的区域，

[0079] 确定背景中的区域，以及

[0080] 确定光谱的每个波长的背景校正信号为：

[0081] $$S'_{st} = \sum_{i=1}^{N_{st}} S_{st_i} - N_{st} \frac{\sum_{j=1}^{N_{bck}} S_{bck_j}}{N_{bck}}$$

[0082] 其中，N_{st}和N_{bck}分别是所选样本结构和背景中的像素的数量；S_{st_i}是在样本结构的

像素i处测量的信号；S_{bckj}是在背景的像素j处测量的信号；S'_{st}是样本结构的背景校正信号。

[0083] 有利地，背景校正使得能够揭示信号强度的细微变化。

[0084] 在一个实施例中，步骤h)包括获得样本结构的大小和/或形状。

[0085] 在特定实施例中，步骤h)使用空间分割(也指空间聚类)识别光谱立方体中的结构，并通过以下方式获得其大小：

[0086] 确定与样本结构相对应的像素的数量，以及

[0087] 确定结构的大小为：

[0088] $$S=\sum_{i=1}^{N_{st}}\frac{P}{M}$$

[0089] 其中，N_{st}是所选样本结构中的像素的数量；P是像素的大小，M是系统的总光学放大率。

[0090] 步骤i)的目的是获取关于光谱立方体中识别的结构的生物本质的信息。这可以通过将每个结构的光谱特征与一组已知生物结构的光谱特征进行比较来实现。此外/或者，可以分解结构的光谱特征，并获得所研究的每种标志物的相对贡献；多种标志物的相对贡献可以有助于基于本领域专家的知识或基于专家预先构建的比例的参考数据库来识别该结构的本质。

[0091] 在步骤i)中，使用文献中已知的任意光谱分解方法执行样本的每种标志物对光谱立方体的每个结构的相对贡献的确定。在优选实施例中，假设发射物混合体的线性混合模型，并且可以采用不同的方法(如普通最小二乘法(OLS)、加权最小二乘法(WLS)、广义线性模型(GLM)、非负最小二乘法(NNLS)等)解决LMM问题。作为分解过程的结果，针对样本的每种标志物获得了多个图像。这些单色图像将在本文中表示为“标志物图像”，并表示样本中每种标志物的丰度。

[0092] 在一个实施例中，针对多个辐射波长(Λ)和/或多个辐射模式(α)执行步骤b)至f)。在本实施例中，在步骤f)中，当使用给定辐射模式(α)以给定辐射波长(Λ)对样本进行辐射时，每个单色二维图对应于以特定波长(λ)发射的辐射，并且通过结合多个单色二维图来执行步骤g)。可以使用一个具有可调谐波长和/或可选择位置的辐射源或者多个辐射源来提供多个辐射波长和/或辐射模式。

[0093] 此外，在特定实施例中，根据特定波长(λ)和给定辐射波长(Λ)对多个单色二维图进行排序，构建光谱立方体。

[0094] 在一个实施例中，固相样本是诸如来自人体、动物、真菌或植物的样本的生物样本。

[0095] 在一个实施例中，固相样本是人体组织的活组织检查。

[0096] 在一个实施例中，该方法包括使用至少一种分子标记对样本染色的步骤。

[0097] 在一个实施例中，在染色步骤期间，至少一种分子标记是显色的或荧光的。

[0098] 在一个实施例中，在染色步骤期间，至少一种标记是亲和力分子和报道分子的组合，亲和力分子对样本的至少一种组分具有天然亲和力，报道分子是色原或荧光染料。

[0099] 在一个实施例中，与报道分子结合的亲和力分子中的至少一种是抗体。

[0100] 在一个实施例中，在染色步骤期间，至少一种标记是单一的分子，其对样本的至少一种组分具有天然亲和力，并且同时是色原或荧光染料。

[0101] 本说明书(包括权利要求、描述和附图)中描述的所有特征和/或描述的方法的所有步骤可以以任意组合进行结合，但互斥特征和/或步骤的组合除外。

附图说明

[0102] 参考附图，鉴于本发明的详细描述，将清楚地理解本发明的这些和其他特征及优点，本发明的详细描述通过本发明的优选实施例变得显然，本发明的优选实施例仅作为示例给出，并且不限于此。

[0103] 图1-A至图1-E示意性地示出了根据本发明的高光谱定量成像细胞术系统的五个实施例。

[0104] 图2示出了根据本发明的实施例的方法的流程图。

[0105] 图3示意性地示出了获取样本的波长编码空间图的过程。

具体实施方式

[0106] 图1-A至图1-E示意性地示出了根据本发明的高光谱定量成像细胞术系统100。

[0107] 系统100包括观察区域104，观察区域104包括样本保持部112，样本保持部112被配置为保持一个或多个固相样本。在一个实施例中，样本保持部被配置为保持至少一个固相样本支撑部，每个支撑部适于容纳固定样本，优选地，生物样本。这些固相样本支撑部可以具有不同的材料(优选地，结晶和对光透明的材料(例如，玻璃或塑料))，并且可以具有不同的形状和尺寸(例如，矩形形状(例如，显微镜载玻片))。

[0108] 生物样本可以来自人体、动物、真菌或植物，并且可以单独使用或与分子标记结合使用。

[0109] 优选地，分子标记用于揭示生物样本的组分。分子标记的报道部分可以在被辐射时发光或选择性地吸收辐射。分子标记可以由于其物理结构或在与生物样本结合时显示出特征辐射光谱。

[0110] 系统100包括一个或多个辐射源101、102、103，以辐射和激发位于观察区域104中的样本的标志物。通过这种相互作用，样本会因诸如散射、荧光、磷光、化学发光或选择性吸收/透射的任意过程而发射辐射。

[0111] 在一个实施例中，待放置在观察区域104中的生物样本是生物组织，即，在生物体内执行类似功能的互连细胞及其细胞外基质的集合。生物组织的组分可以天然地吸收特定波长的光，并通常以不同的波长发射辐射。如果生物组织的组分缺乏足够的对比度，无法直接研究，则可以向样本中添加特定类别的标记，以提供对比度并使得能够检测特定组分。这些组分可以是DNA、蛋白质、脂质、碳水化合物等，多种标记可以用于同时研究多种组分。

[0112] 响应于辐射，样本的组分和/或与样本结合使用的分子标记发射辐射光谱，其中辐射光谱通过收集元件105捕获。收集的辐射被引导到多通道滤波元件108并被再次引导到图像传感器109。

[0113] 图1-A所示的实施例包括三个辐射源101、102、103，它们发射可见光谱中的光。然

而，可以使用不同数量的辐射源。此外，可以使用适用于激发目标样本材料的任意已知辐射源。例如，辐射源101、102、103可以是激光器、发光二极管(LED)和/或灯。激光器或LED可以被配置为发射多个激发波长或单个波长。如果辐射源101产生不止一个波长的辐射，则带通滤波器107可以位于辐射源101前面，以便在辐射到达观察区域104中的样本之前过滤掉任何不需要的波长。

[0114] 在图1-A的实施例中，各个辐射源101、102、103一次辐射整个观察区域104(即，宽场辐射)。

[0115] 在图1-B所示的实施例中，只有一个辐射源101，辐射源101使用光束106对观察区域104进行辐射，光束106来自与收集元件105所处的一侧相同的一侧，并被引导为沿着收集元件105的光轴(亮场落射式)。在图1-C所示的另一个实施例中，辐射源102使用光束106对观察区域104进行辐射，光束106来自与收集元件105所处的一侧相同的一侧，并被引导为与收集元件105的光轴成非零角度(暗场落射式)。在图1-D所示的另一个实施例中，辐射源103使用光束106对观察区域104进行辐射，光束106来自观察区域的与收集元件105所处的一侧相反的一侧，并被引导为沿着收集元件105的光轴(亮场透射式)。在图1-E所示的另一个实施例中，辐射源103使用光束106对观察区域104进行辐射，光束106来自观察区域的与收集元件105所处的一侧相反的一侧，并被引导为与收集元件105的光轴成非零角度(暗场透射式)。

[0116] 因此，在图1-B和图1-C的实施例中，辐射源101、102与收集元件105设置在观察区域104的同一侧，使得观察区域104中的样本在辐射源101、102的辐射被收集元件105收集之前反射辐射。在图1-D和图1-E的实施例中，观察区域104插设在辐射源103和收集元件105之间，使得来自辐射源103的辐射在被收集元件105收集之前通过观察区域104中的样本。

[0117] 在如图1-A所示的优选实施例中，图1-B至图1-E所示的两个以上的上述成像几何结构可以共存于系统中，并且可以依次用于获得互补数据。

[0118] 由辐射样本发射的辐射通过收集元件105收集。在优选实施例中，收集元件被配置为同时捕获来自观察区域104的多个空间位置的辐射。在一个实施例中，收集元件是透镜或透镜组合。

[0119] 在优选实施例中，收集元件具有低放大因数(M)，以实现大视场(FOV)并获得关于更大二维面积的观察区域104的信息，从而获得样本的信息。优选地，放大因数值(M)小于20，更优选地，小于10，最优选地，小于2。可以选择与系统的具有放大因数的任意其他元件结合的收集元件105的总放大因数，以保证图像传感器109对FOV的正确采样频率。可以选择FOV的采样频率以区分生物组织样本中的单独的细胞，但不区分小的亚细胞细节。图像传感器109包括辐射检测元件的二维阵列。系统的最终放大因数可以取决于图像传感器的特性，例如，辐射检测元件的尺寸。

[0120] 在被收集元件105收集之后并且在到达图像传感器109之前，辐射被引导通过多通道滤波元件108。多通道滤波元件108对到达图像传感器109的每个辐射检测元件或一组辐射检测元件的辐射进行选择性地滤波。在一个实施例中，多通道滤波元件108是连续或半连续可变带通滤波器。

[0121] 在本实施例中，多通道滤波元件被设置为在一个或两个空间维度(x,y)中可移置，从而使得图像传感器109能够产生多个二维输出，每个输出表示样本的不同波长编码(λ＝λ

(y))二维(x,y)图。由图像传感器109产生的样本的每个波长编码二维图可以被发送到处理器110和/或存储在存储器111中以供进一步处理。

[0122] 图像传感器109是二维阵列传感器,其中阵列中的每个辐射检测元件接收来自样本中不同二维空间位置的辐射,产生作为所研究样本的空间(x,y)图的图像。图像传感器109可以是二维光电探测器阵列传感器,例如,电荷耦合器件(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)、电子倍增CCD(EMCCD)或用于获得二维空间数据的任意其他类似系统。二维图像传感器可以被触发以在特定时间量内累积地采样数据。

[0123] 图2示出了根据本发明的实施例的方法的流程图。样本(其可以已经被标记染色)被放置在观察区域104中(201)。第一辐射源101、102、103被激活(202),滤波元件108位于其初始位置(203),图像传感器109记录表示生物样本的第一波长编码二维图的第一图像(204)。然后滤波元件108移动到第二位置(203),并获得第二波长编码二维图。继续该过程,直到到达滤波元件108的最后位置。如果使用多个辐射模式(α)或辐射波长(Λ),则第二辐射源101、102、103被激活(202),滤波元件108移动到其初始位置(203),并拍摄与新波长编码二维图相对应的新图像。继续该过程,直到到达滤波元件108的最后位置,并针对全部辐射源重复该过程。

[0124] 处理器110拍摄生物样本的多个波长编码二维图301,并通过结合波长编码二维图301的与特定波长相对应的部分来构建样本的多个单色二维图304(205)。当使用给定辐射模式(α)以给定辐射波长(Λ)辐射样本时,这些单色二维图中的每一个具有关于以给定波长(Λ)发射的辐射的空间相关(x,y)信息。这些多个单色二维图304的组合构成五维(x,y,λ,Λ,α)数据集305,其可以简化为具有两个空间维度(x,y)和一个光谱维度(α,Λ,λ)的光谱立方体306。

[0125] 尽管在该示例性实施例中,单色二维图是通过结合波长编码二维图的与特定波长相对应的部分来产生的,但在替代实施例中,通过采用多元插值过程来产生单色二维图,以基于来自波长编码二维图的记录针对每个像素获得以该特定波长(λ)接收的辐射的估值。

[0126] 处理器110拍摄通过生物样本产生的光谱立方体306,并执行数据位置的空间分割(206),以便识别有意义的生物样本结构(例如,细胞)并获得这些结构中的每一个的光谱特征(207)。然后,处理器110将每个结构的光谱特征与存储在存储器111中的已知结构的光谱的数据库进行比较(208)。替代步骤208或与步骤208同时地,处理器110通过确定每种标志物对光谱立方体中识别的每个结构的光谱特征的相对贡献,执行对这些已识别样本结构中的每一个中的每种标志物(即,光谱分解)的丰度的估值(209)。所获得的关于已识别结构的本质和/或关于每种标志物的丰度的信息可以通过本领域专家与关于样本的其他相关信息相关联(210)。

[0127] 执行光谱分解所需的一个普遍接受的用于发射物混合体的模型是线性混合模型(LMM),该模型假设发射物的丰度的线性组合。多个单色二维图针对每个像素提供不连续发射光谱,其中与特定波长相对应的光谱点存在于与该波长相对应的单色二维图中。

[0128] 根据LMM,假设不连续发射光谱是单独的标志物的光谱的线性组合。来自N个像素或结构的M种激发标志物的发射物在L个激发波长(Λ)处被拍摄,并产生L个单独的信号(通道)。因此,每个像素或结构由L个通道的向量表示,该向量包含每个通道的M种标志物的贡献之和。LMM可以以矩阵形式写为:

[0129] Y＝AH

[0130] 其中,Y是检测强度的L×N矩阵,A是包含L个光谱通道中的每一个中的M种标志物中的每一种的预期发射物的混合的L×M矩阵,H是每个结构的真实标志物浓度的M×N矩阵。

[0131] 测量中的不确定度也可以通过将噪声纳入模型来考虑。通常采用两种噪声模型:第一种模型为加性高斯噪声(白噪声)模型,其中,上述等式被修改为:

[0132] Y＝AH+R

[0133] 其中,R是由具有零均值的独立同分布高斯变量形成的矩阵。第二种模型使用泊松过程来构建光子发射的模型。

[0134] 诸如普通最小二乘法(OLS)、加权最小二乘法(WLS)、广义线性模型(GLM)、非负最小二乘法(NNLS)等的不同方法可以用于解决LMM问题并获得具有每种标志物的丰度的空间图,其可以被发送到处理器和/或存储在存储器中以供进一步处理。

[0135] 图3表示获得生物样本(A)的波长编码二维图及其转换为生物样本(B&C)的单色二维图的步骤的实施例,单色二维图在结合时构成样本(D)的光谱立方体。该过程使用针对给定辐射波长(Λ)和给定辐射模式(α)在滤波元件108的不同位置拍摄的全部连续图像,然后,在(x,y,λ)维度空间下进行。如果使用了多个辐射波长(Λ)和/或多个辐射模式(α),则对每组图像独立地进行处理,其中每组图像对应于给定辐射波长(Λ)和给定辐射模式(α)。

[0136] 通过在若干连续的离散步骤中平行于收集元件的FOV的空间维度之一(y)移动滤波元件108,获得每个波长编码二维图301(A)。滤波元件通过整个FOV 303的完全位移所需的步骤数定义所拍摄图像的数量,从而定义波长编码二维图的数量。

[0137] 每个波长编码二维图301沿“y”空间维度划分(切片)为“n个”波段(B)。波段数“n”对应于滤波器通过整个FOV的一个波段的完全位移所需的步骤数。每个波段与来自与相同波长相对应的其他波长编码二维图301的波段结合,以再现生物样本的单色二维图304,每个单色二维图304对应于特定波长。整组单色二维图304构成光谱立方体306。在图3中,与相同波长相对应的波段由相同的图案表示。

[0138] 在替代实施例中,通过采用多元插值过程通过波长编码二维图产生单色二维图,以基于来自波长编码二维图的记录针对每个像素获得以特定波长(λ)接收的辐射的估值。

[0139] 根据本发明,本文提供以下条款:

[0140] 条款1、一种高光谱定量成像细胞术系统(100),包括:

[0141] 观察区域(104),观察区域(104)包括被配置为保持一个或多个固相样本的样本保持部,

[0142] 至少一个辐射源(101、102、103),至少一个辐射源(101、102、103)被配置为对观察区域(104)进行辐射,

[0143] 收集元件(105),收集元件(105)被配置为收集由至少一个辐射源(101、102、103)进行辐射的样本发射或反射的辐射,

[0144] 多通道滤波元件(108),多通道滤波元件(108)被配置为对通过收集元件(105)收集的辐射的波长进行选择性地滤波,以及

[0145] 图像传感器(109),图像传感器(109)被配置为接收滤波后的辐射并产生作为样本的二维图的图像,并且图像传感器(109)包括辐射检测元件的二维阵列。

[0146] 条款2、根据前述条款所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,滤波元件

(108)被设置为在至少两个位置之间可移动,其中,滤波元件(108)的每个位置对到达图像传感器(109)的每个辐射检测元件的辐射的波长进行选择性地滤波。

[0147] 条款3、根据条款2所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,系统进一步包括处理器(110),处理器(110)被配置为:

[0148] -接收样本的多个波长编码二维图(301),多个波长编码二维图(301)与滤波元件(108)的多个位置相关联,其中,波长编码二维图是由图像传感器(109)基于其针对滤波元件(108)的位置接收的辐射而产生的图像;

[0149] -通过结合样本的波长编码二维图(301)的与特定波长(λ)相对应的部分,产生(205)样本的多个单色二维图(304);

[0150] -构建包含多个单色二维图(304)的光谱立方体(306);

[0151] -识别光谱立方体(306)上的样本结构(206)并获得其光谱特征(207);

[0152] -将获得的光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较(208),并且/或者分解光谱特征,并获得(209)每个已识别样本结构中的每种标志物的丰度的估值。

[0153] 条款4、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,根据透射式配置,观察区域(104)插设在至少一个辐射源(103)和收集元件(105)之间,使得辐射源(103)的辐射在被收集元件(105)收集之前通过观察区域(104)。

[0154] 条款5、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,至少一个辐射源(102)、观察区域(104)和收集元件(105)根据暗场配置设置。

[0155] 条款6、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,至少一个辐射源(101、103)、观察区域(104)和收集元件(105)根据亮场配置设置。

[0156] 条款7、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,根据落射式配置,至少一个辐射源(101、102)的方向朝向观察区域(104),使得在辐射源(101、102)的辐射被收集元件(105)收集之前,观察区域(104)反射辐射源(101、102)的辐射。

[0157] 条款8、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,系统(100)进一步包括存储器(111)。

[0158] 条款9、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,系统(100)进一步包括插设在至少一个辐射源(101、102、103)和观察区域(104)之间的至少一个带通滤波器(107)。

[0159] 条款10、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,至少一个辐射源(101、102、103)是激光器、发光二极管或灯。

[0160] 条款11、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其中,收集元件(105)包括透镜或被配置为同时捕获来自观察区域的多个空间位置的辐射的透镜组合。

[0161] 条款12、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),

[0162] 其中,收集元件(105)的放大因数值(M)小于20,优选地,小于10,最优选地,小于2;并且/或者

[0163] 其中,收集元件(105)的数值孔径值大于0.25,优选地,等于或大于0.5。

[0164] 条款13、根据前述条款中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100),其

中，滤波元件(108)是200nm和1200nm之间，优选地，350nm和950nm之间的连续线性可变滤波器或半连续线性可变滤波器。

[0165] 条款14、一种使用根据前述权项中任意一项所述的高光谱定量成像细胞术系统(100)从固相样本获得数据的方法，包括以下步骤：

[0166] a)提供样本(201)；

[0167] b)使用与样本相互作用的辐射对样本(202)进行辐射，使得样本发射辐射；

[0168] c)使用收集元件(105)捕获发射的辐射；

[0169] d)使用多通道滤波元件(108)对发射的辐射进行滤波；

[0170] e)依序记录(204)样本的与滤波元件(108)的依序位移(203)相匹配的多个波长编码二维图(301)，其中，滤波元件(108)的每个位置对到达图像传感器(109)的每个辐射检测元件的辐射的波长(λ)进行选择性地滤波，并且其中，图像传感器(109)基于其针对滤波元件(108)的每个位置接收的辐射产生波长编码二维图；

[0171] f)通过结合样本的波长编码二维图(301)的与发射的辐射的特定波长(λ)相对应的部分，产生(205)样本的多个单色二维图(304)；

[0172] g)构建包含多个单色二维图(304)的光谱立方体(306)；

[0173] h)识别光谱立方体(306)上的样本结构(206)并获得其光谱特征(207)；

[0174] i)将获得的光谱特征与已知结构的光谱特征的数据库进行比较(208)，并且/或者分解光谱特征，并获得(209)每个已识别样本结构中的每种标志物的丰度的估值。

[0175] 条款15、根据条款14所述的方法，其中，针对多个辐射波长(Λ)和/或多个辐射模式(α)执行步骤b)至步骤f)，其中，在步骤f)中，当以给定辐射波长(Λ)和给定辐射模式(α)对样本进行辐射时，每个单色二维图(304)对应于以特定波长(λ)发射的辐射，并且其中，通过结合多个单色二维图(304)执行步骤g)。

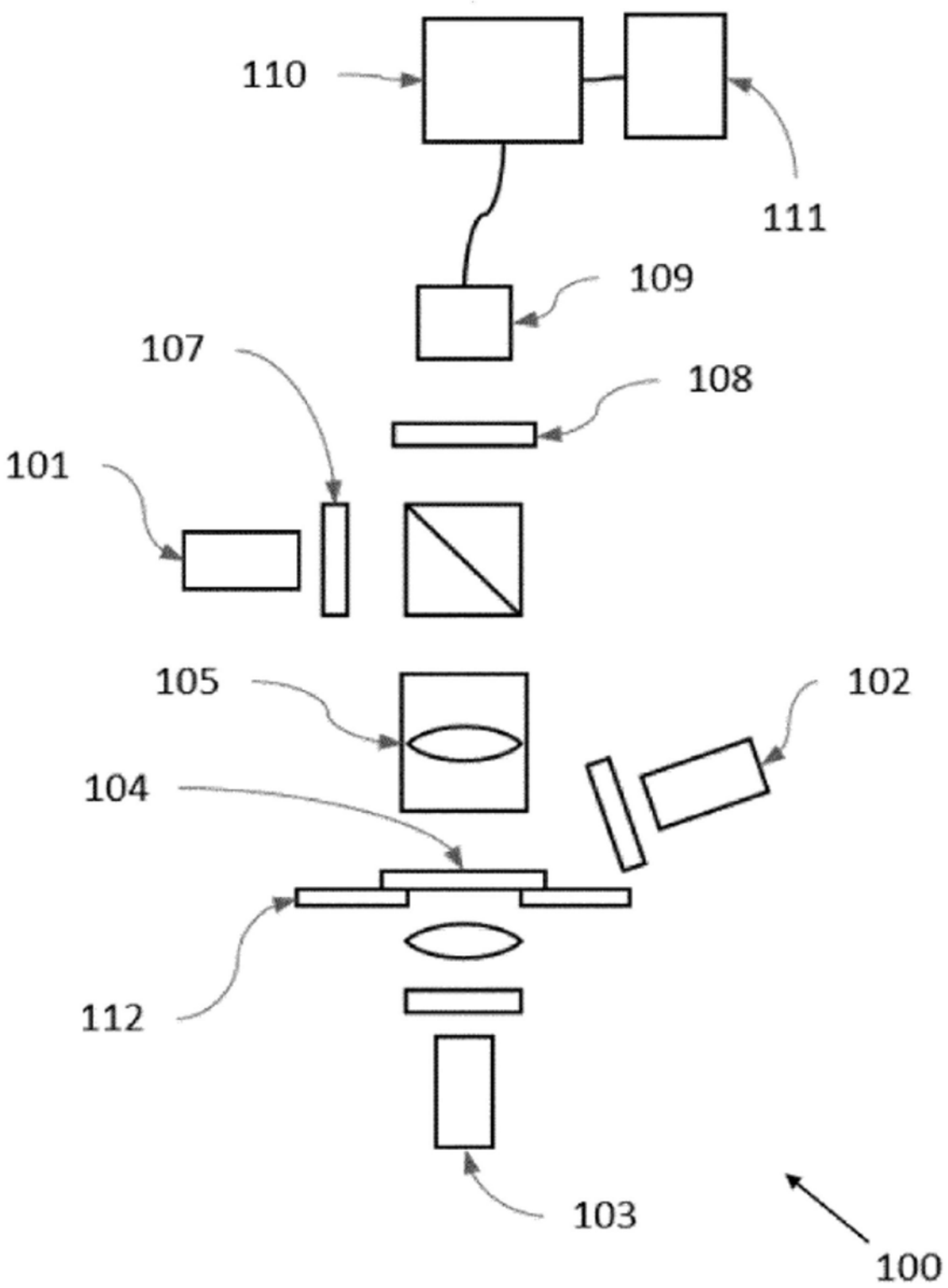


图1A

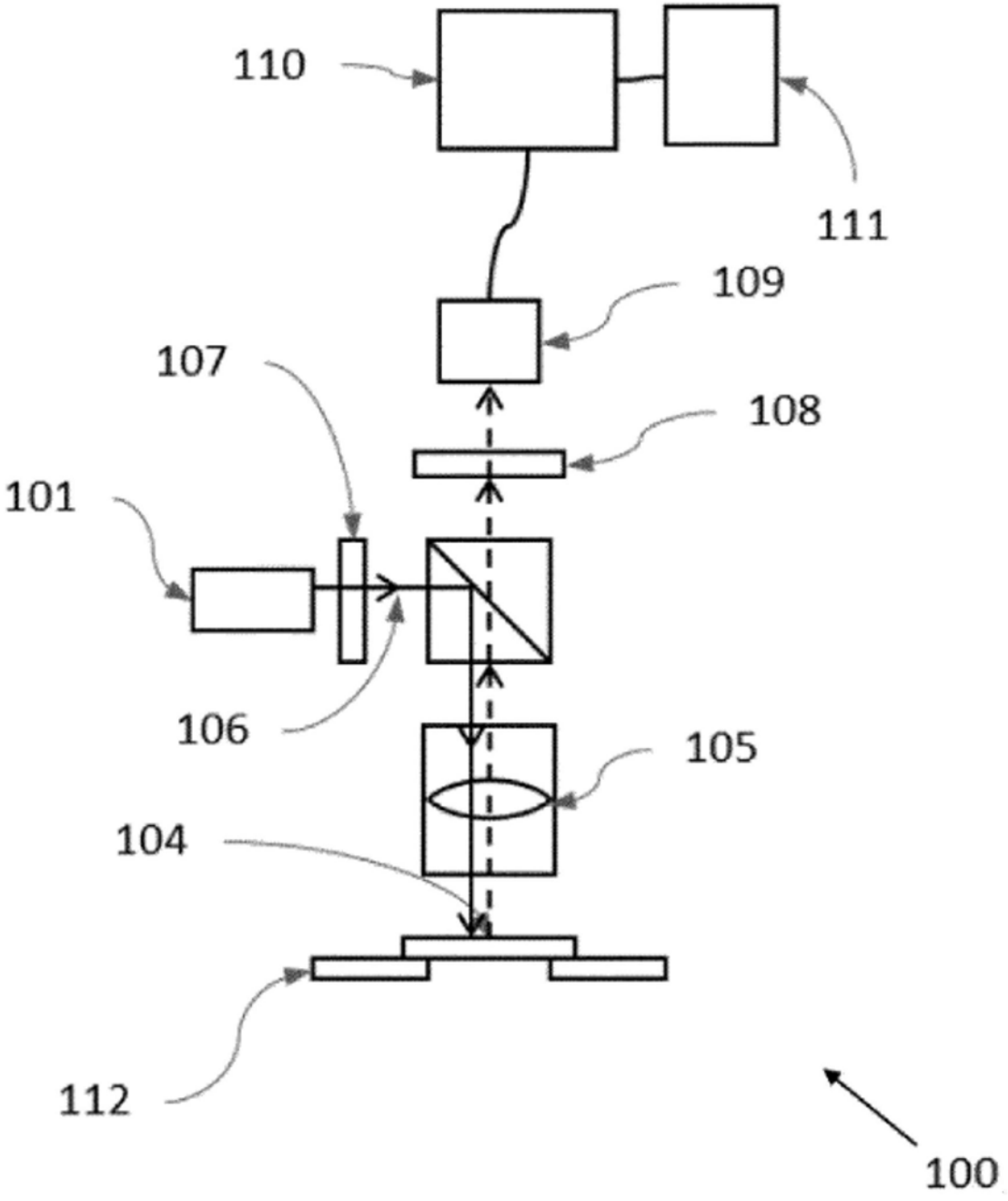


图1B

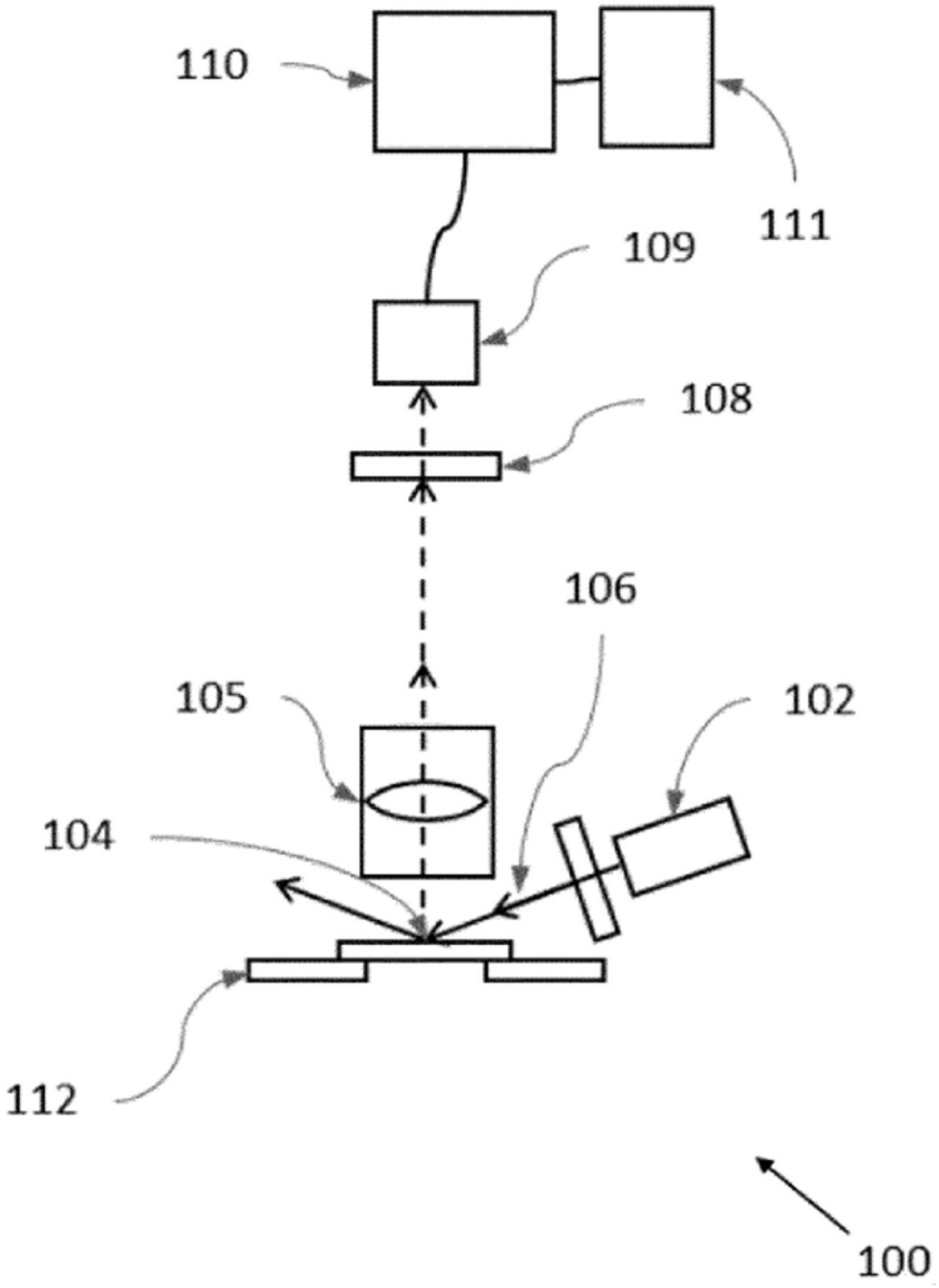


图1C

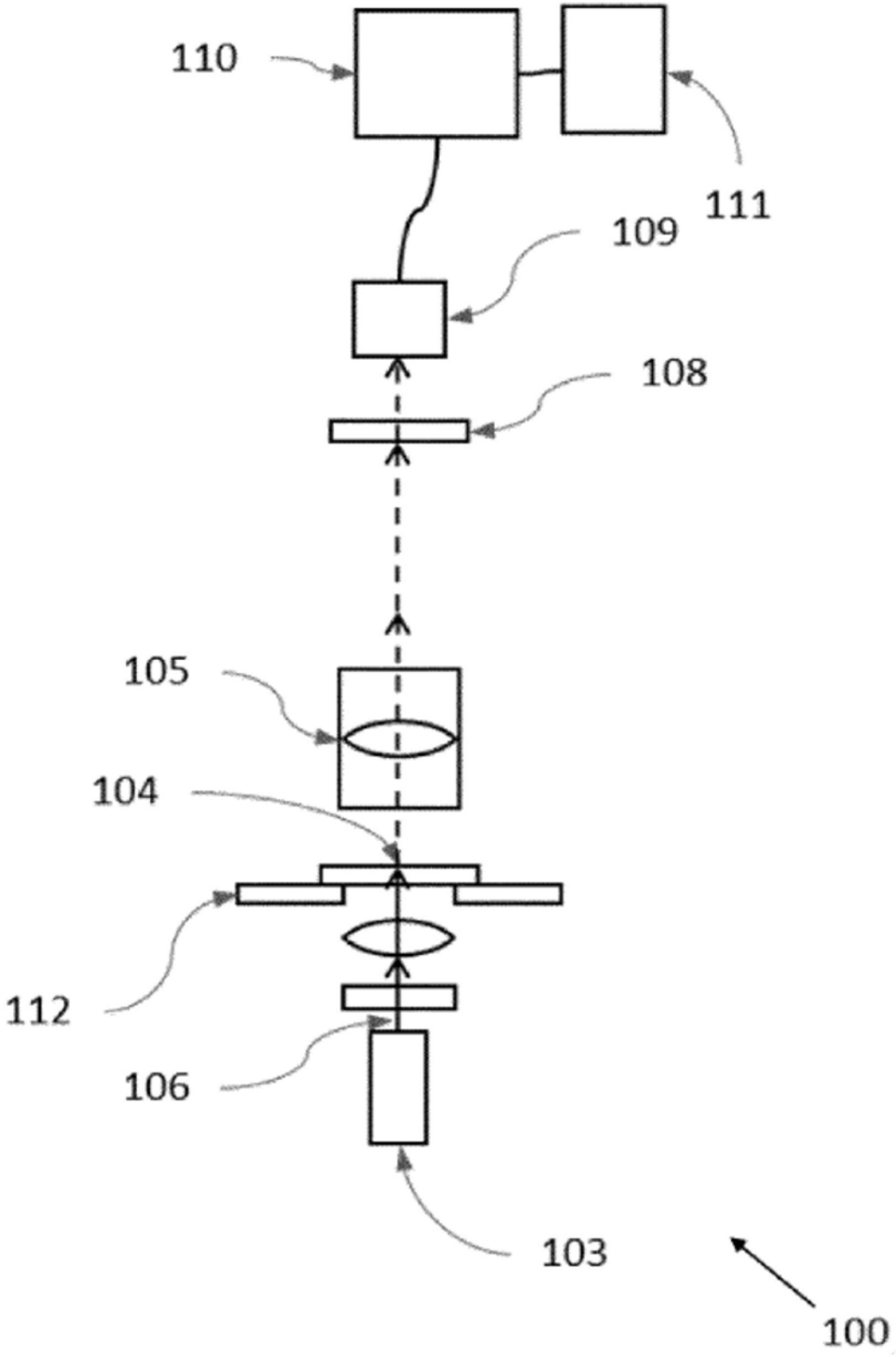


图1D

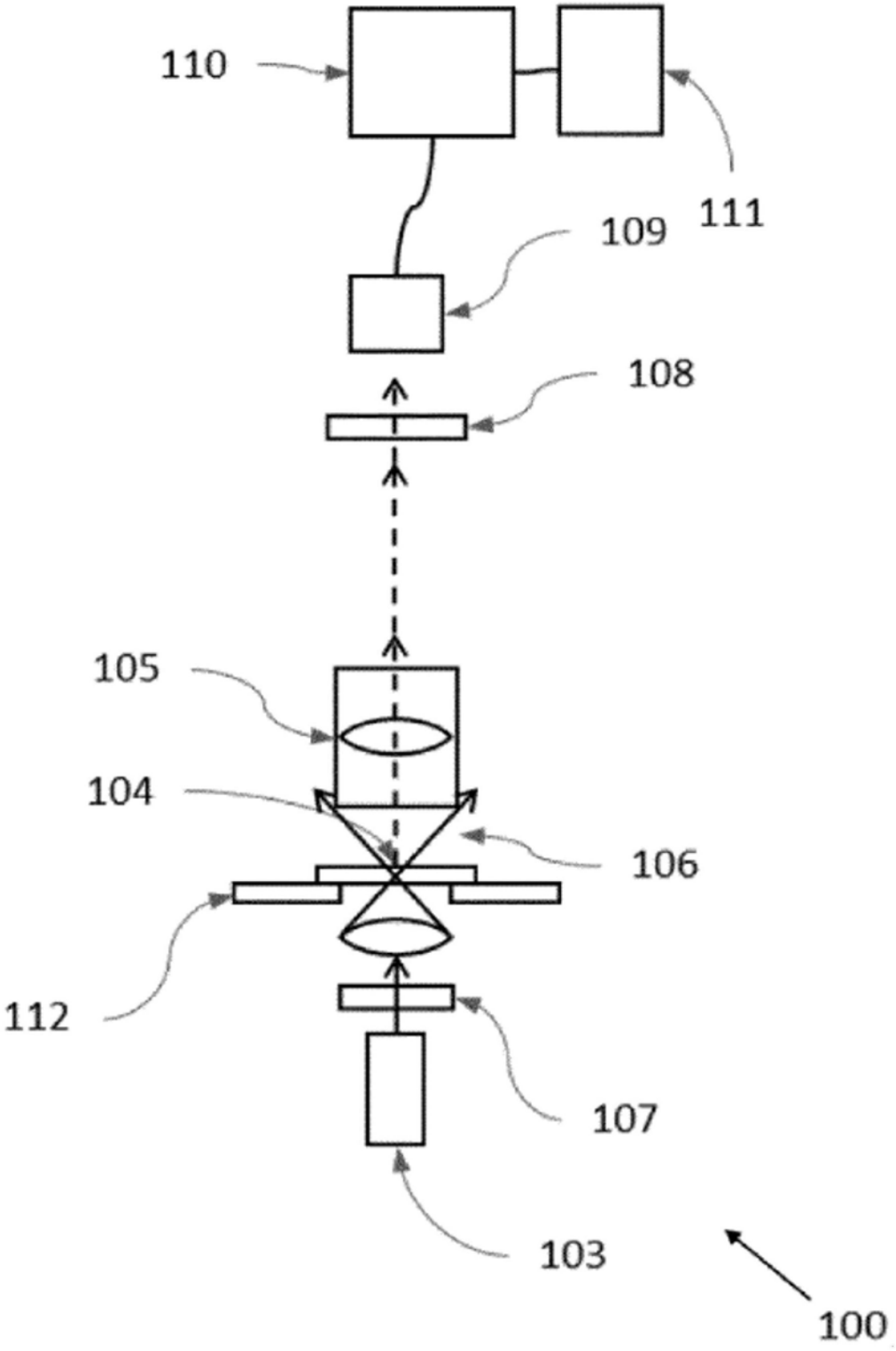


图1E

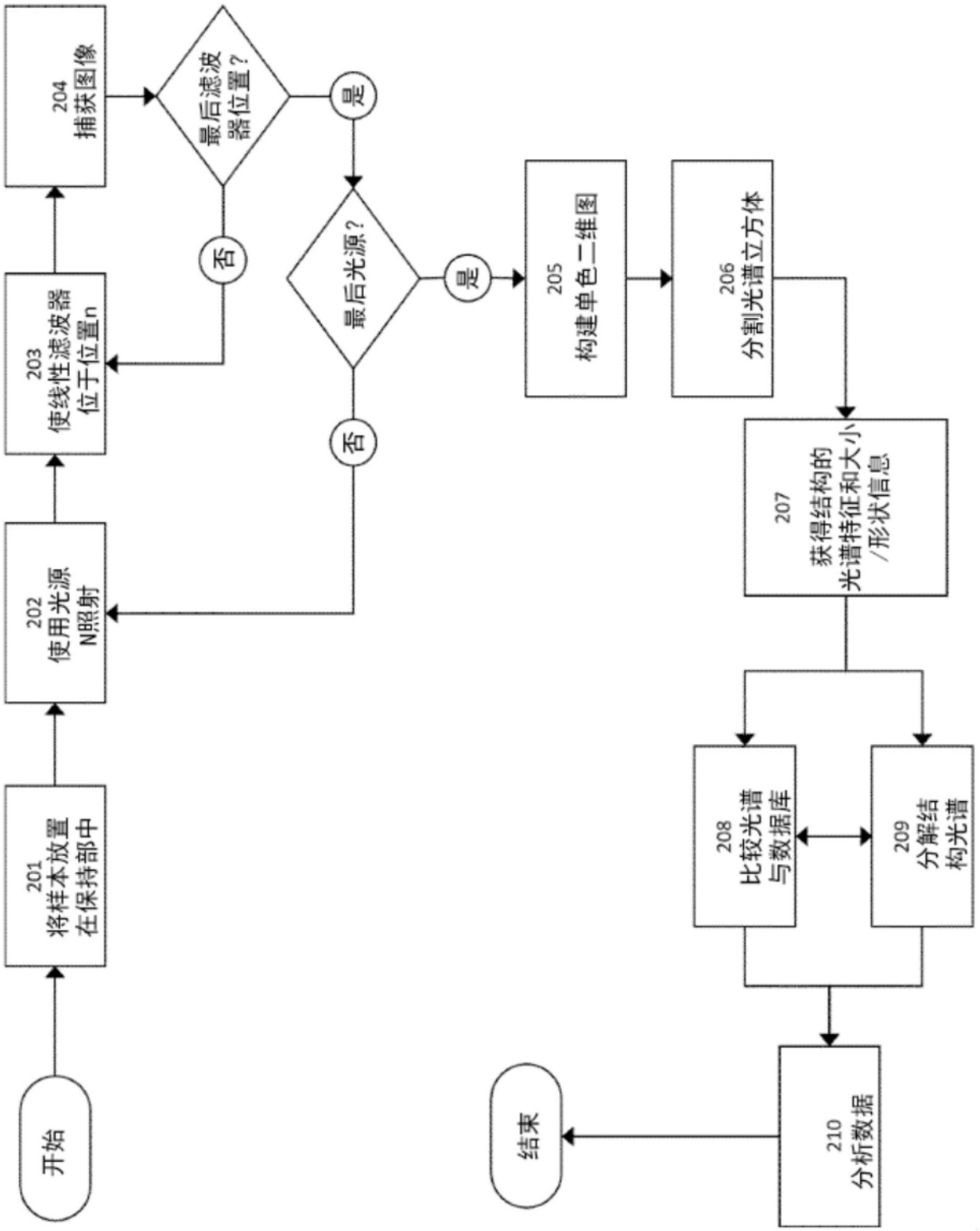

开始
201
将样本放置
在保持部中
202
使用光源
N照射
203
使线性滤波器
位于位置n
204
捕获图像
最后滤波
器位置?
否
是
最后光源?
否
是
205
构建单色二维图
206
分割光谱立方体
207
获得结构的
光谱特征和大小
/形状信息
208
比较光谱
与数据库
209
分解结
构光谱
210
分析数据
结束

图2

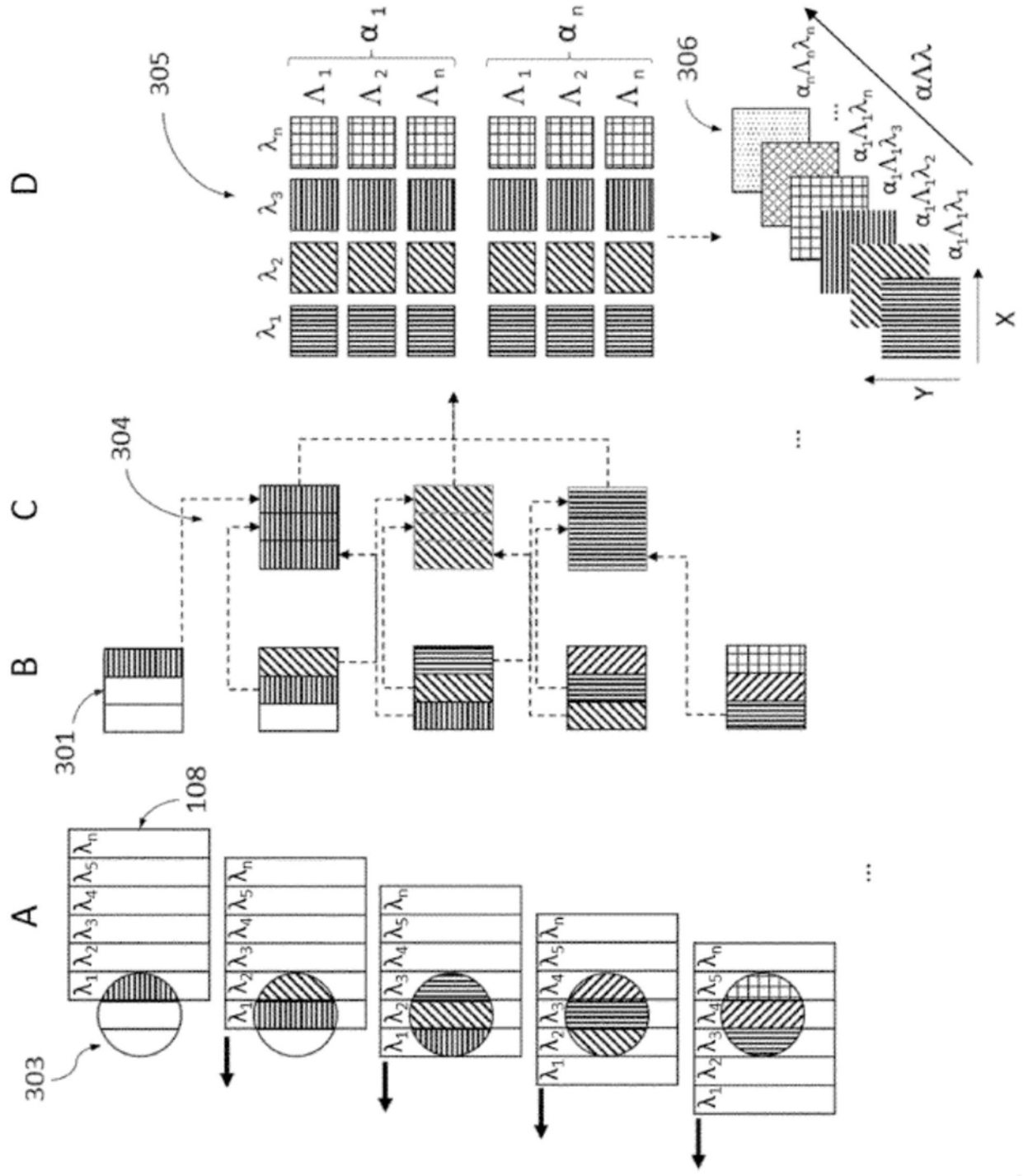


图3