



(10) 授权公告号 CN 112041655 B

(45) 授权公告日 2024.09.10

(21) 申请号 201980022357.0

(22) 申请日 2019.01.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112041655 A

(43) 申请公布日 2020.12.04

(30) 优先权数据
62/622358 2018.01.26 US
62/642730 2018.03.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.25

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/015103 2019.01.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/147909 EN 2019.08.01

(73) 专利权人 罗切斯特大学
地址 美国纽约州

(72) 发明人 S·G·德莫斯 C·黄

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001
专利代理师 初明明 彭昶

(51) Int.Cl.
G01N 1/30 (2006.01)
A61B 5/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 107003242 A, 2017.08.01

审查员 张佳宁

权利要求书4页 说明书11页 附图8页

(54) 发明名称

用于生物学表面的紫外激发显微术的方法

(57) 摘要

具有紫外表面激发的显微镜(MUSE),用于在教室中使用以增强生命科学教育和课程,或用于其它应用,包括但不限于手术室、其它医学环境、研究环境和低资源环境。MUSE的适用性基于多个关键因素,包括其使用的简单性、结合廉价硬件(包括LED照明)、以及非常基本的组织制备。紫外激发作为将所生成的荧光信号限制到组织表面下方仅几微米的无源光学切片,因此消除离焦信号。这促进在完整或切片表面处从试样的组织微观结构和组构的图像捕获,这是由于在不同的细胞隔室内变化的荧光团浓度所引起的。尽管可以仅使用组织自发荧光,但是图像质量通过简单地应用无毒荧光染料以选择性地突出细胞隔室而增强。样品制备是安全、有效的,并且对于具有基本化学或生物学实验室经历的学生是熟悉的。混合染料粉末可用于简化该方法对于教育、医学、研究、低资源和其它环境的转换。



1. 使样品染色用于通过紫外表面激发显微术系统检查的方法,所述方法包括:

(a) 选择由一组预选比例的发荧光染色剂制成的混合荧光染料溶液,所述预选比例的发荧光染色剂用于当溶解于预选体积的溶剂中时产生所述混合荧光染料溶液,所述溶液包含:

(i) 至少以下发荧光染色剂:第一浓度的第一发荧光染色剂和第二浓度的第二发荧光染色剂, (ii) 所述第一发荧光染色剂的特征在于当通过所述紫外表面激发显微术系统经受第一波长的紫外光时的第一光发射光谱,所述第二发荧光染色剂的特征在于当经受第一紫外光源波长时的第二光发射光谱,其中所述第一光发射光谱不同于所述第二光发射光谱;和

(b) 将用于紫外表面激发显微术检查的样品暴露于所述混合荧光染料溶液达预定的时间段,以使所述样品的特征染色;

其中所选的混合荧光染料溶液被配置成制备所述样品,用于在所述第一紫外光源波长下通过所述紫外表面激发显微术系统成像,使得与所述第一发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统在第一强度下成像,并且与所述第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统在第二强度下成像,其中所述第一强度和第二强度大致相同。

2. 权利要求1所述的方法,其中所选的混合荧光染料溶液被配置成制备所述样品,用于通过所述紫外表面激发显微术系统成像,所述紫外表面激发显微术系统包含多通道传感器以检测通过显微镜物镜收集的所述光发射,其中所述多通道传感器的第一通道对所述第一发荧光染色剂光发射光谱比对所述第二发荧光染色剂光发射光谱更敏感,其中所述多通道传感器的第二通道对所述第二发荧光染色剂光发射光谱比对所述第一发荧光染色剂光发射光谱更敏感。

3. 权利要求1所述的方法,其中所述溶剂是水基流体。

4. 权利要求2所述的方法,其中所述第一强度和第二强度大致相同包括与所述第一发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射的平均强度在与所述第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射的平均强度的1/3-3倍范围内。

5. 权利要求4所述的方法,其中所述第一浓度和第二浓度以及所述预定的时间段被配置成使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二强度大致相同。

6. 权利要求4所述的方法,其中所述第一浓度和第二浓度、所述预定的时间段以及所述紫外光源波长和强度被配置成使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一发荧光染色剂光发射强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二发荧光染色剂光发射强度大致相同。

7. 权利要求6所述的方法,其中所述第一浓度和第二浓度、所述预定的时间段以及所述紫外光源的波长发射光谱被配置成使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二强度大致相同。

8. 权利要求3所述的方法,其中所述预选比例的发荧光染色剂的组包含粉末形式并且被配置成使不同的细胞隔室染色。

9. 权利要求8所述的方法,其中所述预选比例的发荧光染色剂的组包含粉末形式的曙红染料和粉末形式的Hoechst染料,其中以重量计,所述曙红染料的量在所述Hoechst染料

的量的约1-10倍范围内。

10. 权利要求9所述的方法,其中所述显微术系统的所述第一紫外光源波长包含260nm至280nm范围内的紫外光。

11. 权利要求9所述的方法,其中所述显微术系统的所述第一紫外光源波长包含230nm至370nm范围内的紫外光。

12. 权利要求9所述的方法,其中所述显微术系统的所述第一紫外光源波长包含250nm至290nm范围内的紫外光。

13. 权利要求1所述的方法,其中所选的混合荧光染料溶液被配置成使所述样品染色,用于在所述紫外表面激发显微术系统的所述第一波长下通过所述显微术系统成像,使得与所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统以每个像素大于约50个计数的图像强度成像。

14. 权利要求13所述的方法,其中所选的混合荧光染料溶液被配置成使所述样品染色,用于在所述显微术系统的所述第一波长下通过所述紫外表面激发显微术系统成像,使得与所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统以相对于所述特征的相应的自发荧光强度的至少1.2倍的更高图像强度成像。

15. 权利要求14所述的方法,其中所选的混合荧光染料溶液被配置成制备所述样品,用于在所述紫外表面激发显微术系统的所述第一紫外光源波长下通过所述显微术系统成像,使得与所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射在没有显著存在图像伪影的情况下通过所述系统成像。

16. 显微术方法,其利用紫外表面激发显微术系统与混合荧光染料溶液的组合,所述混合荧光染料溶液由一组预选比例的发荧光染色剂制成,所述预选比例的发荧光染色剂用于当溶解于预选体积的溶剂中时产生所述混合荧光染料溶液,所述方法包括:

(a) 将用于显微镜分析的样品暴露于所述混合荧光染料溶液达预定的时间段,使所述样品的特征染色,所述溶液至少包含第一浓度的第一发荧光染色剂和第二浓度的第二发荧光染色剂,所述第一发荧光染色剂的特征在于当经受所述显微术系统的第一波长的紫外光时的第一光发射光谱,所述第二发荧光染色剂的特征在于当经受所述显微术系统的所述第一波长的紫外光时的第二光发射光谱,其中所述第一光发射光谱不同于所述第二光发射光谱;

(b) 定位所述样品用于通过所述显微镜成像,所述显微镜包含紫外光源和显微镜物镜;

(c) 使用所述紫外光源同时激发与所述样品的所述特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂,使得所述显微镜物镜收集来自所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂的光发射;

(d) 其中所述方法被配置成使得与所述第一发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统在第一强度下成像,并且与所述第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统在第二强度下成像,其中所述第一强度和第二强度大致相同。

17. 权利要求16所述的显微术方法,所述方法进一步包括使用多通道传感器以检测通过所述显微镜物镜收集的所述光发射,其中所述多通道传感器的第一通道对所述第一光发射光谱比对所述第二光发射光谱更敏感,其中所述多通道传感器的第二通道对所述第二光发射光谱比对所述第一光发射光谱更敏感。

18. 权利要求16所述的显微术方法,其中所述溶剂是水基流体。

19. 权利要求17所述的显微术方法,其中所述第一强度和所述第二强度大致相同包括与所述第一荧光染色剂相关联的特征的所述光发射的平均强度在与所述第二荧光染色剂相关联的特征的所述光发射的平均强度的1/3-3倍范围内。

20. 权利要求19所述的显微术方法,其中所述第一浓度和所述第二浓度以及所述预定的时间段被配置成使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二强度大致相同。

21. 权利要求19所述的显微术方法,其中所述第一浓度和所述第二浓度、所述预定的时间段以及所述紫外光源波长和强度被配置成使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二强度大致相同。

22. 权利要求21所述的显微术方法,其中所述第一浓度和所述第二浓度、所述预定的时间段以及所述紫外光源的波长发射光谱被配置成使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二强度大致相同。

23. 权利要求19所述的显微术方法,其中所述显微术系统进一步包含至少一个滤光器,所述滤光器被配置成选择性地衰减所述第一光发射光谱和所述第二光发射光谱中的至少一个的至少一部分,使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二强度大致相同。

24. 权利要求23所述的显微术方法,其中所述第一浓度和所述第二浓度、所述预定的时间段、所述紫外光源波长以及所述至少一个滤光器被配置成使得通过所述多通道传感器的第一通道记录的所述第一强度与通过所述多通道传感器的第二通道记录的第二强度大致相同。

25. 权利要求24所述的显微术方法,其中所述至少一个滤光器被配置成衰减红色、绿色或蓝色光谱范围中的至少一个,其中所述多通道传感器具有覆盖红色、绿色或蓝色光谱范围的三个通道。

26. 权利要求19所述的显微术方法,其中所述紫外表面激发显微术系统进一步包含图像处理器,其中所述图像处理器被配置成生成图像,使得所述第一荧光染色剂和第二荧光染色剂的光发射使用大致相同的第一强度和第二强度成像。

27. 权利要求18所述的显微术方法,其中所述预选比例的发荧光染色剂的组包含粉末形式并且使不同的细胞隔室染色。

28. 权利要求27所述的显微术方法,其中所述预选比例的发荧光染色剂的组包含粉末形式的曙红染料和粉末形式的Hoechst染料,其中以重量计,所述曙红染料的量在所述Hoechst染料的量的约1-10倍范围内。

29. 权利要求27所述的显微术方法,其中使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特征相关联的所述第一荧光染色剂和第二荧光染色剂包括将与所述样品的特征相关联的所述第一荧光染色剂和第二荧光染色剂暴露于230nm至370nm范围内的紫外光。

30. 权利要求27所述的显微术方法,其中使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特征相关联的所述第一荧光染色剂和第二荧光染色剂包括将与所述样品的特征相关联的所述第一荧光染色剂和第二荧光染色剂暴露于250nm至290nm范围内的紫外光。

31. 权利要求27所述的显微术方法,其中使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特

征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂包括将与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂暴露于270nm至280nm范围内的紫外光。

32. 权利要求27所述的显微术方法,其中使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂包括将与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂暴露于260nm至280nm范围内的紫外光。

33. 权利要求16所述的方法,其中所述混合荧光染料溶液由预选量的所述第一发荧光染色剂和预选量的所述第二发荧光染色剂制成,所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂在溶解于所述溶剂中之前为粉末、固体或液体形式。

34. 权利要求33所述的方法,其中在溶解于所述溶剂中之前,所述预选量的所述第一发荧光染色剂和所述预选量的所述第二发荧光染色剂包含在一个或多个片剂或一个或多个胶囊中。

35. 权利要求33所述的方法,其中在溶解于所述溶剂中之前,所述预选量的所述第一发荧光染色剂和所述预选量的所述第二发荧光染色剂包含在单个片剂或胶囊中。

36. 权利要求33所述的方法,其中在溶解于所述溶剂中之前,所述预选量的所述第一发荧光染色剂和所述预选量的所述第二发荧光染色剂为液体形式并且包含在容器中。

37. 权利要求33所述的方法,其中将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液是染色程序的一部分,所述染色程序进一步包括将所述样品暴露于醇基液体。

38. 权利要求33所述的方法,其中将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液是染色程序的一部分,所述染色程序进一步包括将所述样品暴露于促进增加所述染料溶液在组织中的摄取的物质。

39. 权利要求33所述的方法,其中将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液是染色程序的一部分,所述染色程序包括其中将所述样品暴露于多种流体达预定的时间段的多个步骤,其中所述多个步骤的所述预定的时间段的总时间小于5分钟。

40. 权利要求33所述的方法,其中将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液是染色程序的一部分,所述染色程序包括其中将所述样品暴露于多种流体达预定的时间段的多个步骤,其中所述多个步骤的所述预定的时间段的总时间小于3分钟。

41. 权利要求33所述的方法,其中所述样品包含厚度超过0.05mm的样品。

42. 权利要求33所述的方法,其中将所述样品暴露于所述荧光染料溶液包括将所述样品暴露于包含曙红染料和Hoechst染料的染料溶液,其中所述曙红染料的浓度为所述Hoechst染料的浓度的约1-10倍。

43. 权利要求33所述的方法,其中将所述样品暴露于所述荧光染料溶液包括将所述样品暴露于包含曙红染料和Hoechst染料的染料溶液,其中以重量计,所述曙红染料的浓度为所述Hoechst染料的浓度的约4倍。

44. 权利要求33所述的方法,其中将所述样品暴露于所述荧光染料溶液包括将所述样品暴露于包含约1-3mg/ml曙红和约250-750 μ g/ml Hoechst的染料溶液达30秒-2分钟。

45. 权利要求44所述的方法,其中使用所述紫外光源包括使用光密度为1-600毫瓦/平方厘米的275nm紫外光源。

用于生物学表面的紫外激发显微术的方法

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求对于“Systems and Methods for Ultraviolet Surface Excitation Microscopy”在2018年1月26日提交的美国临时专利申请序号62/622,358和对于“Systems and Methods for Ultraviolet Surface Excitation Microscopy”在2018年3月14日提交的美国临时专利申请序号62/642,730的优先权和权益,两者的全部内容通过引用并入本文。

[0003] 联邦资金

[0004] 本发明是在由能源部授予的DE-NA0001944的政府支持下进行的。政府对本发明享有一定权利。

技术领域

[0005] 紫外表面激发显微术系统和方法。

背景技术

[0006] 宽视场光学显微术是用于在生物学教育中向学生介绍活体的微观结构的形象工具。由于宽视场光学显微镜的通用性和低价格,它们被广泛地应用于全世界的学校[1]。然而,组织中的光散射使得细胞结构不可能直接成像,因为离焦信号强得多,而细胞隔室之间的图像对比度非常有限。结果,在大学生教育实验室环境中,观察生物学样品通常局限于准备好的微米厚组织样品的载玻片或来自洋葱或面颊刮削的活样品[2]。甚至需要将洋葱皮切成薄的单细胞层,以使特征性的大尺寸细胞结构(如细胞膜和细胞核)可视化,这是在教育环境中学生完成的一项重要任务。因此,学生经常发现显微术实验令人沮丧,导致对探索细胞解剖学的最初实习体验的动机低[2]。例如,与传统的4年设立相比,专注于使更高级教育可进入更广泛的社会范围的社区学院中的学生的体验表明,载玻片制备的挑战使经常离开课程的学生泄气,这可能使他们在更高级课程中失败[3]。心理学家认为,成就动机对于教育是至关重要的;对他/她的学科能力不自信的学生将对相关领域变得不太感兴趣[4]。

[0007] 使用准备好的显微镜载玻片和教科书图像教导学生吸引力较低,并且可能不会刺激他们在生命科学中的兴趣或者他们在相关领域中从事职业的能力的自信。提供光学切片和快速成像组织微观结构的能力的正在开发的成像方法[5-10]对于教室使用是复杂且昂贵的。

[0008] 其它领域也可以从更好的显微术系统和方法中受益。例如,制备用于显微镜检查的样品通常所需的时间、设备、专业人员和(通常有毒的)化学品限制了可以制备和检查样品的地点和时间。例如,在手术室中,人们通常没有时间或能力使用传统的样品制备方法制备用于显微镜检查的样品。低资源环境是另一个实例,其中由于缺乏设备、专业知识、材料、合适的设施和合适的地方来处理有毒化学品和在使用后需要仔细处理的其它材料,传统的病理学方法完全不可能。

[0009] 对于教室、医院、低资源环境、生物医学研究实验室和其它环境,需要更好的显微

术系统和方法。

发明内容

[0010] 本文我们探究用于在各种环境中使用的具有紫外表面激发的显微术(MUSE)[11]。MUSE可以产生新鲜组织的近表面层的显微照片,而不需要组织处理成超薄切片,如在常规的H&E染色中使用的。常规的H&E染色切片通常为5-10 μm 厚。使用MUSE的试样的厚度可以是任意的,通常大约几毫米。小动物(小鼠、青蛙等)的器官小,大约1厘米或更小,并且可以被分成/切割成多个切片以用MUSE对其内部成像。最近在别处已经提出一般MUSE方法的描述,集中于其在医学领域中的潜在实现。简而言之,该研究涉及新鲜的或福尔马林固定的组织,将其短暂地暴露于荧光染料(如罗丹明或DAPI),所述荧光染料定位在不同的细胞隔室中并在可见光谱范围内发射。随后将试样在盐水中清洗,并放置在宽视场显微镜中,其中组织表面通常在轻微压力下在薄的光学器件上变平,该光学器件在用于激发的光谱范围内是透明的。该激发由在紫外(UV)光谱范围(在一个实例中,在约270nm)中操作的发光二极管(LED)源提供。该激发引起荧光染料的基态电子占据较高的激发态,并最终在较低的激发态中级联,以从每种染料产生典型的可见荧光。因此,一种UV激发波长可用于两种或更多种染料,所述染料可以提供不同细胞组分(通常是细胞质和细胞核)的染色。

[0011] 成像系统可以基于标准显微镜光学器件和单色或彩色电荷耦合装置(CCD)照相机。因为取决于波长,在MUSE中使用的UV光在组织中的穿透深度可以非常浅,大约一个细胞直径[11],当使用较低放大倍数物镜时,信号可以定位在显微镜的光学器件的成像深度内,并且仍然提供大约1 μm 或更小的空间分辨率。较低放大倍数标准显微镜物镜以及长工作距离物镜也支持绕过显微镜的光学器件的组织斜角照明。用这种方法产生的人类组织的图像可以类似于常规组织病理学图像,而图像处理可以将彩色图像转换成类似的常规苏木精和曙红(H&E)图像。

[0012] MUSE在教育、手术室、低资源环境、生物医学研究实验室和其它环境中的适用性源于其简单性,因为它可依赖于廉价的硬件,并且可能需要非常有限的待成像组织制备。可使得MUSE系统和方法进一步适用于这些应用,例如,通过仅使用满足教室和其它通用安全要求的无毒化学品,以及使用可由学生或其它个人容易地执行而无需专门的样品制备训练的组织制备方法。对于教室使用,通常期望该方法可与在高中和大学生教育中通常使用的组织试样一起使用,当多个学生可以共享资源时,该方法可以以及时的方式(例如在课堂期间内)实现,并且所获得的图像和所观察到的结构特征是使用学生可用的信息(书等)可察觉和可识别的。

[0013] 在教育环境下,动物解剖仍然是生命科学教育的重要部分,因为其能够证明生物体的复杂性[12]。学生通常仅研究主要器官结构,并在没有观察组织学的情况下处理试样[1]。MUSE可利用来自当前解剖阶段的试样使器官特异性微观结构可视化。这将扩展学生学习体验,并且与冷库存制备的载玻片相比,更吸引人且更与学生的个人体验相关。鼓励学生将课程材料与个人体验联系起来的活动增加了学生的动机和学习,尤其是对成功期望低的学生[13]。此外,MUSE可提供高质量的实习体验,当学生通过探究学习时,该体验可正面地影响学生的兴趣[14]。MUSE也将通过提供来自动物试样的更多信息来帮助改进动物试样效率,并因此满足实验动物使用的3-R(替代、减少和优化)原则[15]。

[0014] 在一个实例中,显微术方法利用紫外表面激发显微术系统与混合荧光染料溶液的组合,所述混合荧光染料溶液由一组预选比例的发荧光染色剂制成,用于当溶解于预选体积的溶剂中时产生所述混合荧光染料溶液,所述方法包括:(a)将用于显微镜分析的样品暴露于所述混合荧光染料溶液达预定的时间段,使所述样品的特征染色,所述溶液至少包括第一浓度的第一发荧光染色剂和第二浓度的第二发荧光染色剂,所述第一发荧光染色剂的特征在于当经受所述显微术系统的第一波长的紫外光时的第一光发射光谱,所述第二荧光染料特征在于当经受所述显微术系统的所述第一波长的紫外光时的第二光发射光谱,所述第一发射光谱不同于所述第二发射光谱;(b)定位所述样品用于通过所述显微镜成像,所述显微镜包括紫外光源和显微镜物镜;(c)使用所述紫外光源同时激发与所述样品的所述特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂,使得所述显微镜物镜收集来自所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂的光发射;和(d)所述方法被配置成使得与所述第一发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统在第一强度下成像,并且与所述第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射通过所述系统在第二强度下成像,其中所述第一强度和第二强度大致相同。

[0015] 所述方法可以使用多通道传感器以检测通过所述显微镜物镜收集的所述光发射,所述多通道传感器的第一通道对所述第一光发射光谱比对所述第二光发射光谱更敏感,所述多通道传感器的第二通道对所述第二光发射光谱比对所述第一光发射光谱更敏感。

[0016] 所述方法可以替代地使用市售可得传感器或其它传感器,并且不限于上述多通道传感器。

[0017] 所述方法可以使用作为水基流体的溶剂。

[0018] 所述第一强度和第二强度大致相同可以指定与所述第一发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射的平均强度在与所述第二发荧光染色剂相关联的特征的所述光发射的平均强度的1/3-3倍范围内。

[0019] 所述第一染色剂浓度和第二染色剂浓度以及所述预定的时间段可以被配置成使得通过所述多通道传感器的所述第一通道记录的所述第一光发射强度与通过所述多通道传感器的所述第二通道记录的第二光发射强度大致相同。

[0020] 所述第一染色剂浓度和第二染色剂浓度、所述预定的时间段以及所述紫外光源波长和强度可以被配置成使得通过所述多通道传感器的所述第一通道记录的所述第一光发射强度与通过所述多通道传感器的所述第二通道记录的第二光发射强度大致相同。

[0021] 所述第一染色剂浓度和第二染色剂浓度、所述预定的时间段以及所述紫外光源的波长发射光谱可以被配置成使得通过所述多通道传感器的所述第一通道记录的所述第一光发射强度与通过所述多通道传感器的所述第二通道记录的第二光发射强度大致相同。

[0022] 所述显微术系统还可包括至少一个滤光器,所述滤光器被配置成选择性地过滤所述第一光发射光谱和第二光发射光谱中的至少一个的至少一部分,使得通过所述多通道传感器的所述第一通道记录的所述第一光发射强度与通过所述多通道传感器的所述第二通道记录的第二光发射强度大致相同。

[0023] 所述第一染色剂浓度和第二染色剂浓度、所述预定的时间段、所述紫外光源以及所述至少一个滤光器可以被配置成使得通过所述多通道传感器的所述第一通道记录的所述第一光发射强度与通过所述多通道传感器的所述第二通道记录的第二光发射强度大致

相同。

[0024] 所述至少一个滤光器可以被配置成衰减红色、绿色或蓝色光谱范围中的至少一个,所述多通道传感器具有覆盖红色、绿色或蓝色光谱范围的三个通道。

[0025] 所述紫外表面激发显微术系统可以包括图像处理器,所述图像处理器被配置成生成图像,使得所述第一荧光染料和第二荧光染料的光发射使用大致相同的所述第一强度和第二强度成像。

[0026] 所述预选比例的发荧光染色剂的组可以是粉末形式并且使不同的细胞隔室染色。

[0027] 所述预选比例的发荧光染色剂的组可以是粉末形式的曙红染料和粉末形式的Hoechst染料,其中以重量计,所述曙红染料的量在所述Hoechst染料的量的约1-10倍范围内。

[0028] 使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂可以指定将与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂暴露于230nm至370nm范围内的紫外光。

[0029] 使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂可以指定将与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂暴露于250nm至290nm范围内的紫外光。

[0030] 使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂可以指定将与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂暴露于270nm至280nm范围内的紫外光。

[0031] 使用所述紫外光源同时激发与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂可以指定将与所述样品的特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂暴露于260nm至280nm范围内的紫外光。

[0032] 在另一个实例中,显微术方法利用紫外表面激发显微术系统与混合荧光染料溶液的组合,所述混合荧光染料溶液由一组预选比例的发荧光染色剂制成,用于当溶解于预选体积的溶剂中时产生所述混合荧光染料溶液,所述方法包括:(a)将用于显微镜分析的样品暴露于所述混合荧光染料溶液达预定的时间段,使所述样品的特征染色,所述溶液至少包括第一浓度的第一发荧光染色剂和第二浓度的第二发荧光染色剂,所述第一发荧光染色剂的特征在于当经受所述显微术系统的第一波长的紫外光时的第一光发射光谱,所述第二发荧光染料的特征在于当经受所述显微术系统的所述第一波长的紫外光时的第二光发射光谱,所述第一发射光谱不同于所述第二发射光谱;(b)定位所述样品用于通过所述显微镜成像,所述显微镜包括紫外光源和显微镜物镜;和(c)使用所述紫外光源同时激发与所述样品的所述特征相关联的所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂,使得所述显微镜物镜收集来自所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂的光发射。

[0033] 所述混合荧光染料溶液可以由预选量的所述第一发荧光染色剂和预选量的所述第二发荧光染色剂制成,所述第一发荧光染色剂和第二发荧光染色剂在溶解于所述溶剂之前为粉末、固体或液体形式。

[0034] 在溶解于所述溶剂之前,所述预选量的所述第一发荧光染色剂和所述预选量的所述第二发荧光染色剂可以包含在一个或多个片剂或一个或多个胶囊中。

[0035] 在溶解于所述溶剂之前,所述预选量的所述第一发荧光染色剂和所述预选量的

所述第二发荧光染色剂可以包含在单个片剂或胶囊中。

[0036] 在溶解于所述溶剂中之前,所述预选量的所述第一发荧光染色剂和所述预选量的所述第二发荧光染色剂可以是液体形式并且包含在容器中。

[0037] 将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液可以是染色程序的一部分,所述染色程序包括将所述样品暴露于醇基液体。

[0038] 将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液可以是染色程序的一部分,所述染色程序进一步包括将所述样品暴露于促进增加所述染料溶液在所述组织中的摄取的物质。

[0039] 将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液可以是染色程序的一部分,所述染色程序包括其中将所述样品暴露于多种流体达预定的时间段的多个步骤,所述多个步骤的所述预定的时间段的总时间可以小于5分钟。

[0040] 将所述样品暴露于所述混合荧光染料溶液可以是染色程序的一部分,所述染色程序包括其中将所述样品暴露于多种流体达预定的时间段的多个步骤,所述多个步骤的所述预定的时间段的总时间可以小于3分钟。

[0041] 所述样品的厚度可以超过0.05mm。

[0042] 将所述样品暴露于所述荧光染料溶液可以指定将所述样品暴露于包括曙红染料和Hoechst染料的染料溶液,所述曙红染料的浓度为所述Hoechst染料的浓度的约1-10倍。

[0043] 将所述样品暴露于所述荧光染料溶液可以指定将所述样品暴露于包括曙红染料和Hoechst染料的染料溶液,所述曙红染料的浓度可以为所述Hoechst染料的浓度的约4倍。

[0044] 将所述样品暴露于所述荧光染料溶液可以指定将所述样品暴露于包括约1-3mg/ml曙红和约250-750 μ g/ml Hoechst的染料溶液达30秒-2分钟。

[0045] 所述紫外光源可以是光密度为1-600毫瓦/平方厘米的275nm紫外光源。

附图说明

[0046] 图1示意性地说明MUSE显微镜设置的一个实例。

[0047] 图2显示用MUSE自发荧光获得的图像的实例:a)新鲜的白洋葱组织,b)新鲜的青蛙肾组织,c)新鲜的青蛙心肌组织,d)青蛙肝脏组织。

[0048] 图3显示用曙红Y染色的新鲜青蛙肾组织的MUSE图像的实例:a)染色不足,b)过度染色。

[0049] 图4显示使用不同染色剂的青蛙肾组织的MUSE图像的实例:a)碘化丙锭,b)Hoechst 33342,c)曙红Y,d)Hoechst 33342加上曙红Y。

[0050] 图5显示以下实例图像:a)用Hoechst 33342和曙红Y染色下的新鲜青蛙心肌组织。使用RGB彩色图像的原始蓝、绿和红图像分量数字处理图像,以分离出b)曙红Y和c)Hoechst 33342的发射分量。d)彩色增强数字处理以改进图像质量。

[0051] 图6显示以下实例:a)用Hoechst 33342和曙红Y染色下的新鲜青蛙肝脏组织的MUSE图像。b)数字处理的图像,其中用绿色图像代替蓝色图像以增强图像质量。

[0052] 图7显示放置在明胶胶囊中用于储存的预定量的染料粉末的实例。该粉末混合物是稳定的,并且可以溶解于100ml去离子水中,为教室阶段中的所有学生产生足够的染料溶液。

[0053] 图8显示未染色的(图8(a))和在Hoechst 33342水溶液中短暂浸没后的(图8(b))

保存的猪支气管的MUSE图像的实例。

[0054] 图9显示使用4倍放大倍数显微镜物镜,保存的猪支气管组织的MUSE图像的实例。

[0055] 图10显示蛙科动物肾的拼接的宽视场图像的实例。插图1-3是拼接的图像在编号位置处的3倍放大部分。

具体实施方式

[0056] 下面的详细描述提供了MUSE系统和方法的说明性、非限制性的实例,并且不限制本专利要求保护的发明的范围。

[0057] 图1显示MUSE显微镜的一个实例。显微镜包括紫外光源,在该实例中,为UV LED,尽管在其它情况下,可以使用其它类型的UV光源(例如,多个LED、激光器(固定的或可调的)、弧光灯、等离子体灯等)。作为一个实例,光源可以是270nm UV LED(Ocean Optics),光输出为约600 μ W,使用附着于LED的球透镜,其输出聚焦到约4mm²的区域中。在该实例中,存在约10mW/cm²的估计功率密度。可以采用其它或另外的波长的光源,例如光谱范围在290和240nm之间,或在290和360nm之间,或在230和370nm之间。

[0058] 如图1所示,光以斜角被引导到样品。还如图1所示,样品可以位于透明窗口下方并与其接触,该透明窗口可用于稍微平整样品的表面用于成像。CCD照相机通过显微镜的物镜捕获样品的图像。在其它实施方案中,可以利用CMOS或其它数字或模拟照相机。在再其它实施方案中,可以使用目镜而不是照相机使图像直接可视化。

[0059] 尽管图1中未显示,但可以将一个或多个滤光器结合到显微镜中,用于选择性地衰减某些光谱范围(例如,光谱的红色、绿色或蓝色部分),其原因将在下面进一步详细讨论。也可以结合其它类型的滤光器,例如偏振滤光器。可以将一个或多个滤光器在物镜和CCD之间或在其它位置结合到系统中。

[0060] 1. 自发荧光成像

[0061] 在一个实验中,使用大约几秒的曝光时间,在图1中所示的MUSE显微镜的LED光输出足以捕获新鲜组织的自发荧光显微图像,而无需任何准备或染色。图2显示来自厚度大约5mm的组织切片的表面的示例性图像。具体地,图2(a)显示洋葱组织的薄切片的图像,其捕获了洋葱细胞及其细胞核的结构。与在白光显微术下对洋葱的薄切片成像的费力努力相反,用MUSE成像非常简单,切割5mm洋葱组织切片并放置在MUSE显微镜中需要不超过约1分钟的时间间隔。洋葱细胞的图像容易获得,显示细胞核和细胞膜为较高强度的特征。

[0062] 在图2(b)、2(c)和2(d)中显示的图像分别来自青蛙的肾、心脏和肝脏。在图2(b)中所示的图像捕获通过肾膜观察到的小管的结构。在图2(b)中的插图显示单个小管的较高放大倍数部分,显示细胞核表现为较低强度的特征。以前报道使用激光激发源的类似图像[16-17]。使用简单、便宜且安全得多的LED源证明这样的成像,对于在教育环境中该技术的转换是关键。在图2(c)和2(d)中所示的心脏和肝脏组织的图像证明MUSE自发荧光成像以交互方式和实时地使各种器官的不同微观结构可视化的能力,提供了目前在教育环境中不可获得的能力。注意到,在图2(c)中观察到的直径大约10 μ m的深色特征是血细胞。血细胞在图2(d)的图像中也是可见的,其中另外的更大的深色特征与组织的血管结构相关。

[0063] 2. 染色样品的成像

[0064] 测试了多种无毒荧光染料,包括DAPI、Hoechst 33342和碘化丙锭(用于突出细胞

核)、和曙红Y以及荧光素(用于使细胞质复染色)。在去离子水中在宽范围的浓度下测试细胞核荧光染料。还测试细胞质复染色染料。

[0065] 图8(a)显示保存的猪肺的MUSE自发荧光图像。图8(b)显示在 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ Hoechst33342中浸没15秒以增强细胞核的突出性后相似位置的MUSE图像。尽管自发荧光成像证明折叠的上皮层(箭头)和下面的平滑肌,但是细胞核染色产生另外的细节并且使得能够可视化似乎是软骨板的東西。

[0066] 将样品浸入染色剂溶液中以促进跨越表面的均匀染色。用彩色CCD照相机代替前面部分中使用的单色照相机(用于自发荧光成像),以评价单独的和组合的发荧光染色剂的成像质量。选择无毒且适用于教室环境的染色剂。在一些实施中,可能期望水溶性染色剂。此外,当同时施加到组织时,选择每种染料的发射光谱范围不同。将组织顺序地浸没到单独的染料溶液中各种暴露时间,其中涉及的参数(染料浓度和暴露时间)变化以优化图像质量。

[0067] 为了分析由荧光图像中的每种染料(染色剂)的发射产生的图像信息,每种染料的发射光谱必须不同。例如,DAPI和Hoechst 33342可以染色细胞核,并且它们都在蓝色光谱区发射。曙红Y和荧光素可以染色细胞质,并且它们在黄色和红色光谱区发射。彩色CCD检测器捕获不同的生成颜色,允许每种造影剂的定位的可视化。

[0068] 我们的工作已经揭示了重要的参数,使得能够在教育环境和其它环境(包括但不限于手术室、生物医学研究实验室和低资源环境)中使用MUSE显微术。具体地,每种染料的浓度需要在一定范围内。较低的浓度将不能有效地使组织染色用于MUSE成像。较高的浓度将导致组织过度染色,这进而导致预期结构的低质量成像或完全丧失使用MUSE使这些结构成像的能力。组织在染色剂中的暴露时间也需要在一定的时间窗口内,对染料浓度具有一定依赖性。较长的暴露将导致组织过度染色,而较短的暴露将导致染色不足,导致组织的某些部分的局部和/或部分染色,或者导致小于约一个细胞层的深度用于用MUSE成像。这种效应在图3中所示的用曙红Y染色的青蛙组织的图像中证明。具体地,图3(a)中的图像是染色不足的组织,其中带蓝色的自发荧光信号与由染色剂产生的带黄色信号一致。相反,在图3(b)中所示的图像被过度染色,导致不均匀的染色和图像伪影。

[0069] 图4证明用不同染料使青蛙肾组织染色的特征性实例。具体地,图4(a)和4(b)显示在暴露于碘化丙锭($500\mu\text{g}/\text{ml}$, 15秒)和Hoechst 33342($500\mu\text{g}/\text{ml}$, 15秒)以突出细胞核之后的图像,所述细胞核分别以红色和蓝色出现。细胞质几乎不可见,可能仅从(蓝色)自发荧光发射可见。图4(c)中的图像是在用曙红Y使细胞质染色后获得的。染色剂暴露了细胞的其余部分而不是细胞核,其仍作为较深的特征可视化。在图4(d)中的图像是在连续暴露于曙红Y($5\text{mg}/\text{ml}$ 在水中, 40秒)和Hoechst 33342($500\mu\text{g}/\text{ml}$ 在水中, 40秒)之后获得的,这使得能够用不同颜色(分别为黄色和蓝色)同时可视化细胞质和细胞核。可以容易地理解包括肾小球和肾小管以及相关细胞核的肾组织的微观结构。利用无害的、教室相容的化学品,样品制备快速(组织切割和染色的整个过程小于5分钟)并且有效。

[0070] 3. 发射强度和数字图像处理

[0071] 使用彩色数字照相机同时获得不同染色剂的荧光将所产生的荧光分成不同的光谱分量(红色、绿色和蓝色),并同时记录每个分量。用于表示每个颜色通道(红色、绿色、蓝色)的位数通常为8,其表示图像的每个颜色像素的强度的数值(范围从0到256)。在至少一

些实施中,在使用这样的彩色传感器来获得MUSE图像的情况下,通过每种染料产生的发射的强度应当大致相同。

[0072] 当考虑每个图像/颜色通道具有8位的动态范围的照相机时,“大致相同”的发射强度应当被理解为包括在平均值的1/3-3倍之间的值(4倍的范围)。例如,这可以是每像素60-256个计数,如可以使用数字图像分析平台测量的。使用在图4(d)中显示的图像作为具体实例,在蓝色图像通道中,含有蓝色细胞核的像素的强度在约100和255个计数之间。以黄色(绿色和红色的混合)出现的图像像素在绿色和红色通道中的强度平均约150个计数,其中最大值和最小值在100和256个计数之间。这提供了彩色图像,其中可以可视化细胞核的蓝色发射(由于Hoechst 33342的染色)和来自细胞质的黄色发射(曙红的发射)两者。两者之间的不平衡将使得较低强度分量的可视化非常困难,因此对于教育环境是不实际的。较高动态范围照相机可相应地利用可被视为“大致相同”的较高发射强度范围,例如通过对于动态范围的每个额外的位,将强度值范围扩展到2倍。上述讨论涉及显示的图像强度。这可以不同于由传感器强度记录的,其可以在显示给用户之前被数字化处理以增强某些分量。

[0073] 实现大致相同的图像强度的一种方式是通过控制组织中每种染色剂的浓度(与每种染料溶液的浓度和组织在一种或多种溶液中的暴露时间有关)。存在其它方法来解决这样的问题,这些方法是预期的并且在本公开的范围内,例如使用适当的滤色器来(部分地或完全地)拒绝光谱的一部分。

[0074] 数字彩色图像可以进一步分离成其组成分量(蓝色、绿色和红色)。在图5(a)中显示的的心脏组织(暴露于2mg/ml曙红+500 μ g/ml Hoechst,1分钟)的图像的实例中,主要在蓝色和绿色通道中记录来自细胞核的信号,并且在绿色和红色通道中记录来自细胞质的信号。然后可以使用多种不同的方法来分离这两个信号分量。这在图5(b)和5(c)所示的图像中得到证明,其中曙红和Hoechst的图像分量分别被分离。此外,可以重新组合图像以形成具有定制颜色指定的新图像,如图5(d)的图像中所示。

[0075] 数字图像处理可用于增强图像质量和特征的可视化。这在图6中所示的图像中得到证明。青蛙肝脏切片的原始MUSE图像在图6(a)中显示。将该图像分割为组成图像证明,在蓝色图像处的细胞核的强度是饱和的,引起整个图像的劣化。另一方面,红色图像曝光不足。数字化增加红色图像的强度并用绿色图像代替蓝色图像,在图6(b)中重建了伪彩色图像,其可被认为提供了组织微观结构的更详细和清晰的可视化。

[0076] 4.混合荧光染色剂评价

[0077] 在生命科学教育背景中,焦点是对新鲜的或保存的组织样品的细胞结构和组构的理解,而不是混合造影剂和暴露组织的化学和相关劳动(和时间努力)。类似的关注也存在于手术室和其它医学和研究环境(其中时间约束、防止使用有毒化学品的安全程序和其它约束使得传统的样品制备技术即使不是不可能的也是不切实际的)、低资源环境(其中可能简单地缺乏传统的样品制备技术所需的专门设备、材料、专门技术和合适位置)和其它设置中。因此,期望设计一种快速和简单的方法来制备造影剂溶液。该问题的一种可能的解决方案是配制混合染料,例如呈粉末形式,其可以制成小片剂形式或包含在胶囊(例如水溶性胶囊)中。然后可以将其简单地放置在含有蒸馏水或磷酸盐缓冲盐水或不同的合适介质的烧瓶中,以快速和安全地制备混合染料的溶液,用于使组织染色用于MUSE成像。当考虑混合染料的这样的组合时,组织对每种染料的暴露时间将是相同的。这需要开发在液体溶液内良

好控制的染料比率和浓度,使得所有预期的感兴趣的(通常是细胞核和细胞质)适当成像。这包括a)通常高于约50个计数(但它可以更低)的图像强度/像素,b)细胞隔室的良好染色,使得产生的发射是组织自发荧光的至少1.2倍,c)组织未过度染色,过度染色可能引起图像伪影,和d)在由每种染料产生的图像分量(其可以由RGB图像通道分开)上的相应的感兴趣的特征(通常是细胞质和细胞核)中记录的发射强度大致相同(如在第67段中定义的)。还必须认识到,实现上述标准的每种染料的相对浓度可以是(并且通常是)激发波长的函数。

[0078] 为了测试这个概念,我们利用曙红Y和Hoechst,以粉末形式混合在一起,并贮存在00号水溶性明胶胶囊(0.9mL)中。图7显示含有曙红Y和Hoechst的混合粉末的明胶胶囊的照片。通过实验,我们开发了含有200mg曙红和50mg Hoechst的混合物(粉末形式),其可用于制备100ml溶液,我们认为这足以满足实验室阶段内所有学生的需要。为了制备溶液,将胶囊打开并将粉末溶解(通过搅拌约1分钟)到100ml去离子水中。随后将组织样品浸入混合染色剂溶液中约60秒,以促进跨越组织切片表面的均匀染色。我们发现,明胶胶囊内的该粉末混合物是稳定的,并且产生与使用单独的染料溶液在图2-6中所示的图像实际上相同的图像。在一些情况下,可能希望在混合物中包括添加剂,例如用于控制溶液参数(如酸度(pH))的添加剂。这样的添加剂可以增强染色剂对组织的渗透性或提供其它期望的效果(增强或降低发射的量子效率,改变发射光谱等)。该方法使得在教室环境中使用MUSE成像简单且更便宜(因为溶液是一次性制备的,可能由指导者制备),并且还更具有时效性(组织试样的成像可以在几分钟内开始)。

[0079] 实验还表明,在新鲜的组织试样中,短暂暴露于异丙醇增强细胞核的染色。在这种情况下,从收获组织样品到获得图像的整个程序(10秒PBS冲洗,在异丙醇中20秒,10秒PBS冲洗,在染色剂溶液中60秒,10秒冲洗)耗时小于3分钟。由于程序短,学生应该能够在半个小时的实验室阶段内研究多于5种不同的组织。

[0080] 5. 成像格式考虑

[0081] 图9显示保存的胎儿猪支气管组织的MUSE图像,其提供使用4倍国际标准显微镜物镜与具有2.4 μ m像素尺寸的彩色CMOS照相机的组合在较低空间分辨率下的组织结构的引人注目的实例。

[0082] 虽然提供较大的视场通常是有益的,但是通常还期望保持高分辨率细节。通过采用数字拼接,可以取消提供大视场和维持足够的空间分辨率之间的折衷。这在图10中得到了证明,其中显示青蛙肾的横截面,其通过数字拼接(使用Adobe Photoshop)用4倍显微镜物镜获得的5个单独的图像而获得,以产生在整个图像场中提供高分辨率的大图像。放大的图像表明使用4倍物镜,细胞核组构的良好可视化。

[0083] 如上所述,作为本工作的一部分,测试了结合不同的CCD和CMOS传感器的各种照相机。这些照相机是市售可得的并且是相对便宜的,代表了当代产品。总体上,所有的照相机都充分地执行。较小的像素支持较低的由于数字图像采集而导致的光学分辨率损失。主动照相机冷却提供更高的信噪比,其也高度取决于传感器质量。

[0084] 6. 结论

[0085] 生命科学和生物技术被广泛地预期为基于知识的经济的下一浪潮。在相关领域中创建所需劳动力和培养个人人才在生命科学的前沿技术的发展中具有根本的重要性。用于

医学和生物医学应用的光学技术的发展已经稳步增长。下一代人才的创造从学校的早期开始,重点必须集中在这个地方。MUSE成像提供了一种新颖的工具,通过以最小的难度和学生所需的技能提供组织微观结构的信息丰富的图像来增强生命科学的教育。这些相同的技术也可用于医院、低资源、生物医学研究实验室和其它环境中的有益效果。样品制备是安全、有效的,不需要有毒化学品,并且可由没有专业技术或培训的人进行。当需要时,使用无毒荧光染料来选择性地突出细胞隔室,可以增强图像对比度和信息。在教育环境中,基于MUSE的实验室不仅增强生命科学课程,而且在STEM教育中,即结合物理、化学和计算机科学课程,可提供跨学科的体验。学生可以收集他们“自己”的图像,并使用教科书来识别他们观察的结构。由于实时提供图像,该方法还使得学生能够在教室中研究和识别特定感兴趣的结构。除了教育背景之外,MUSE还可用于临床、研究、医学和低资源环境,其可能需要高容量、低成本和快速的组织评估,而不需要使用有毒化学品或昂贵的设备。

[0086] 参考文献:

[0087] [1].Teaching cell division to secondary school students:An investigation of difficulties experienced by turkish teachers. (2003).Journal of Biological Education,38(1),13-15.doi:10.1080/00219266.2003.9655890。

[0088] [2].Smith,M.,&Ann C.H.Kindfield. (1999).Teaching Cell Division:Basics& Recommendations.The American Biology Teacher,61(5),366-371.doi:10.2307/4450699。

[0089] [3].Keller,C. (2017).Using formative assessment to improve microscope skills among urban community college general biology I lab students.Journal of College Science Teaching,46(3),11-18。

[0090] [4].Wigfield,A.,&Eccles,J.S. (2000).Expectancy-Value theory of achievement motivation doi:10.1006/ceps.1999.1015。

[0091] [5].Dobbs,J.,Krishnamurthy,S.,Kyrish,M.,Benveniste,A.P.,Yang,W.,& Richards-Kortum,R. (2015).Confocal fluorescence microscopy for rapid evaluation of invasive tumor cellularity of inflammatory breast carcinoma core needle biopsies.Breast cancer research and treatment,149(1),303-310。

[0092] [6].Chen,B.C.,Legant,W.R.,Wang,K.,Shao,L.,Milkie,D.E.,Davidson,M.W.,...&English,B.P. (2014).Lattice light-sheet microscopy:imaging molecules to embryos at high spatiotemporal resolution.Science,346(6208),1257998。

[0093] [7].Cicchi,R.,&Pavone,F.S. (2017).Probing Collagen Organization: Practical Guide for Second-Harmonic Generation (SHG) Imaging.In Fibrosis (pp.409-425).Humana Press,New York,NY。

[0094] [8].Ragan,T.,Kadiri,L.R.,Venkataraju,K.U.,Bahlmann,K.,Sutin,J., Taranda,J.,...&Osten,P. (2012).Serial two-photon tomography for automated ex vivo mouse brain imaging.Nature methods,9(3),255-258。

[0095] [9].Orringer,D.A.,Pandian,B.,Niknafs,Y.S.,Hollon,T.C.,Boyle,J.,Lewis,S.,...&Heth,J.A. (2017).Rapid intraoperative histology of unprocessed surgical specimens via fibre-laser-based stimulated Raman scattering microscopy.Nature

Biomedical Engineering,1,0027。

[0096] [10].Kawagoe,H.,Yamanaka,M.,Makita,S.,Yasuno,Y.,&Nishizawa,N. (2017, February).High-resolution and deep-tissue imaging with full-range,ultrahigh-resolution spectral-domain optical coherence tomography in 1.7 μ m wavelength region (Conference Presentation).In SPIE BiOS (pp.100531V-100531V).International Society for Optics and Photonics.

[0097] [11].Farzad Fereidouni,Zachary T.Harmany,Miao Tian,Austin Todd,John A.Kintner,John D.McPherson,Alexander D.Borowsky,John Bishop,Mirna Lechpammer,Stavros G.Demos and Richard Levenson,“Microscopy with ultraviolet surface excitation for rapid slide-free histology”,Nat.Biomed.Eng.,印刷中。

[0098] [12].Oakley,J. (2012).Science teachers and the dissection debate: perspectives on animal dissection and alternatives.International Journal of Environmental and Science Education,7(2),253-267。

[0099] [13].Hulleman,C.S.,&Harackiewicz,J.M. (2009).Promoting interest and performance in high school science classes.326 (5958),1410.doi:10.1126/science.1177067。

[0100] [14].Holstermann,N.,Grube,D.,&Bögeholz,S. (2010).Hands-on activities and their influence on students' interest.Research in Science Education,40(5),743-757。

[0101] [15].Russell,W.M.S.and Burch,R.L., (1959).The Principles of Humane Experimental Technique,Methuen,London.ISBN 0900767782。

[0102] [16].B.Lin,S.Urayama,R.M.G.Saroufeem,D.L.Matthews,S.G.Demos,“Real-time microscopic imaging of esophageal epithelial disease with autofluorescence under ultraviolet excitation”,Optics Express 17,12502-12509 (2009)。

[0103] [17].Rajesh N.Raman,Christopher D.Pivetti,Alexander M.Rubenchik,Dennis L.Matthews,Christoph Troppmann,and Stavros G.Demos,“Evaluation of the contribution of the renal capsule and cortex to kidney autofluorescence intensity under ultraviolet excitation”,Journal Biomedical Optics 14,020505-1 (2009)。

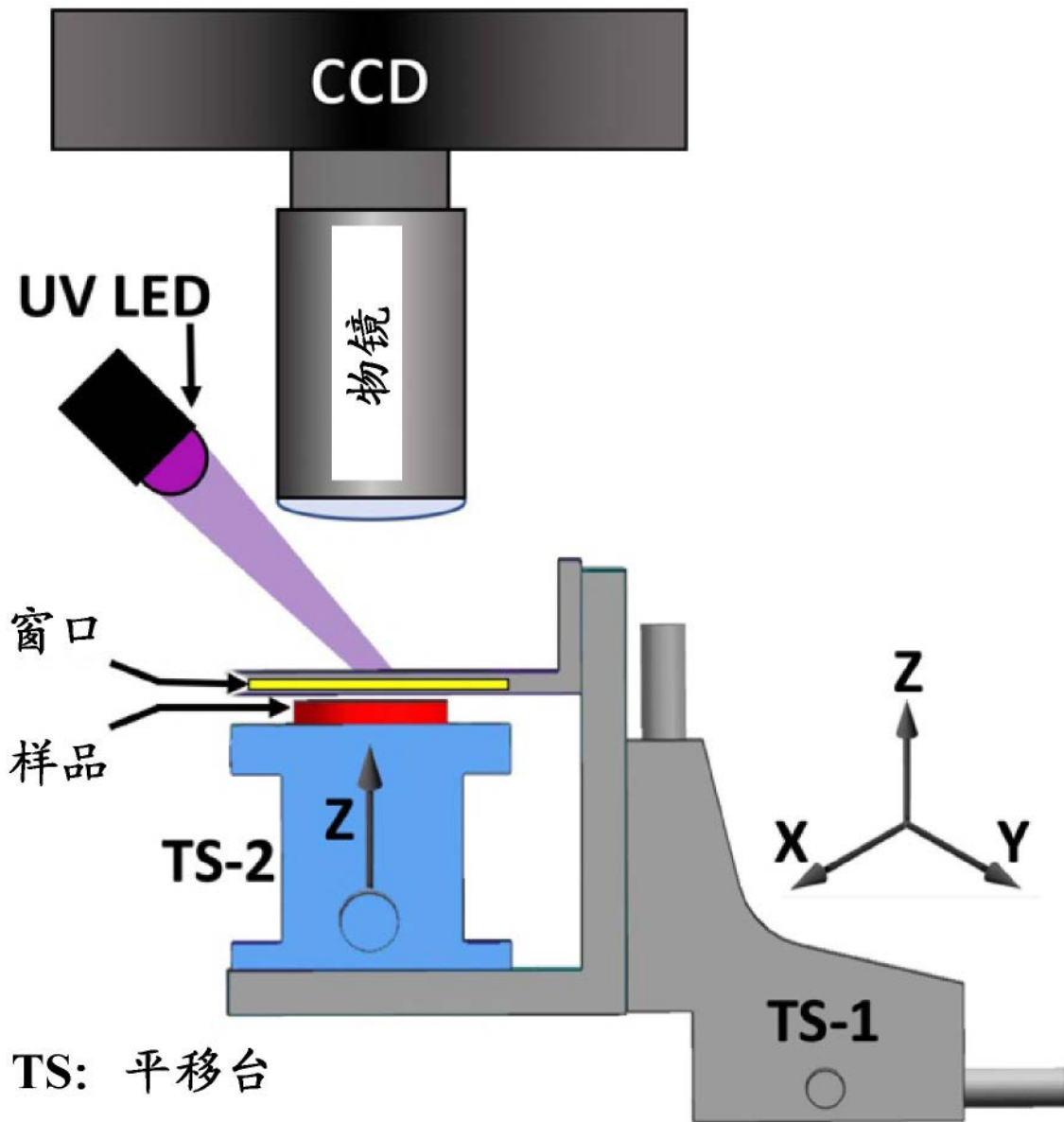


图 1

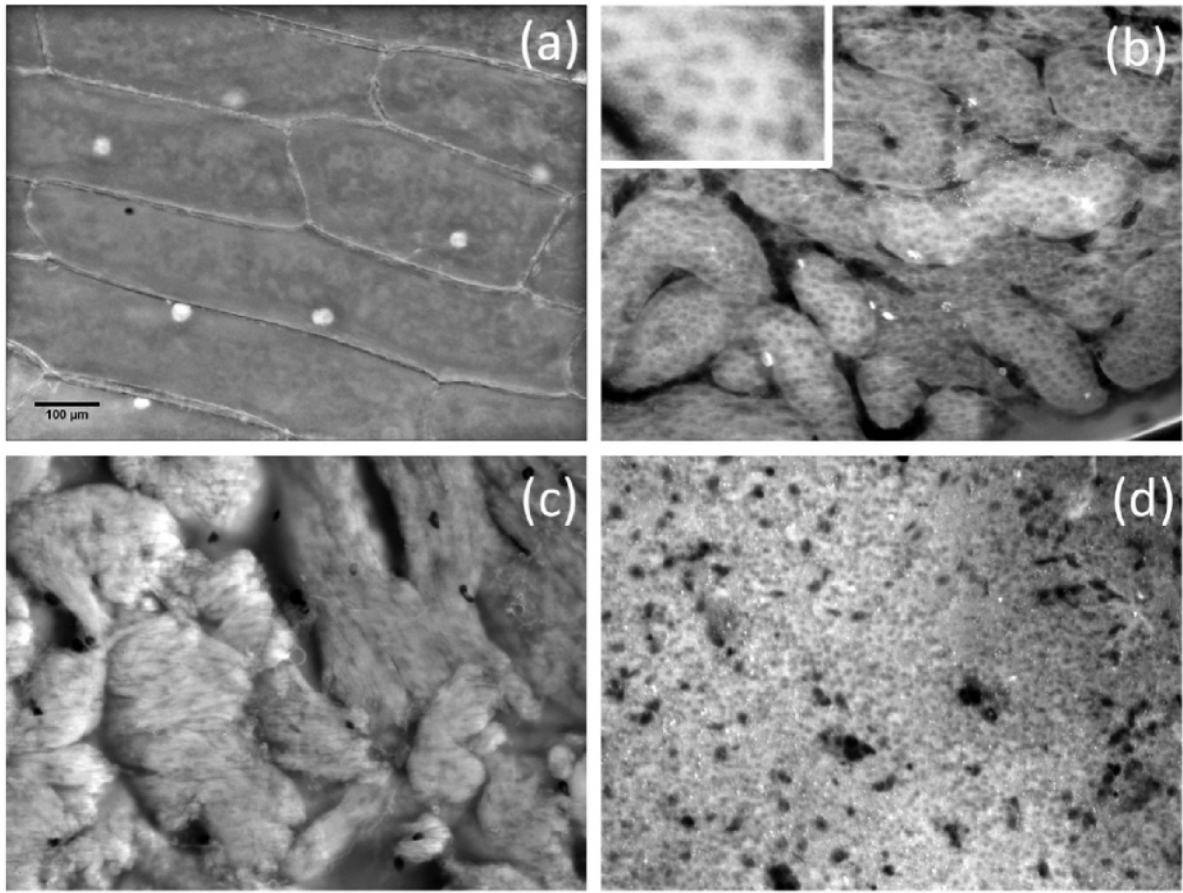


图 2

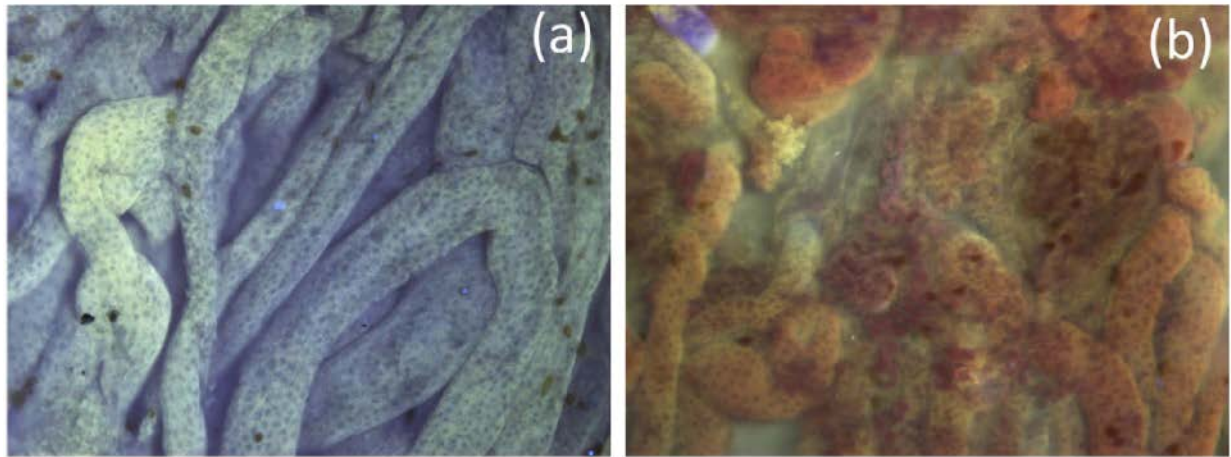


图 3

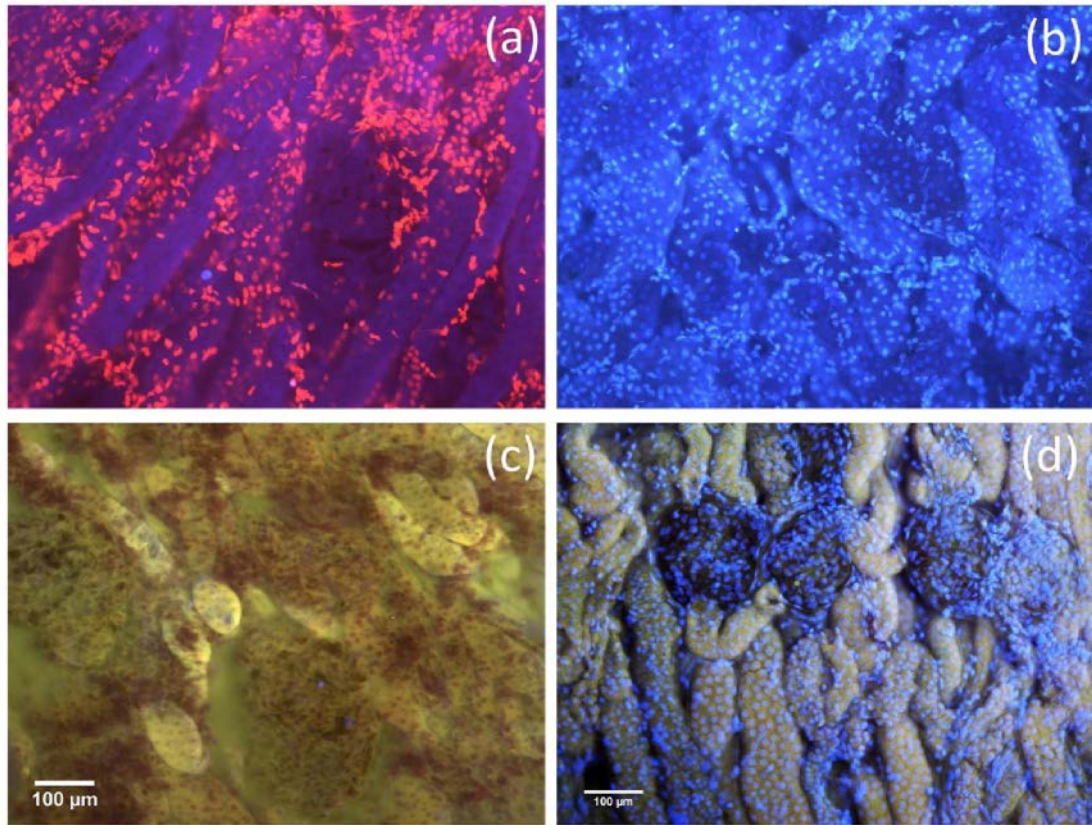


图 4

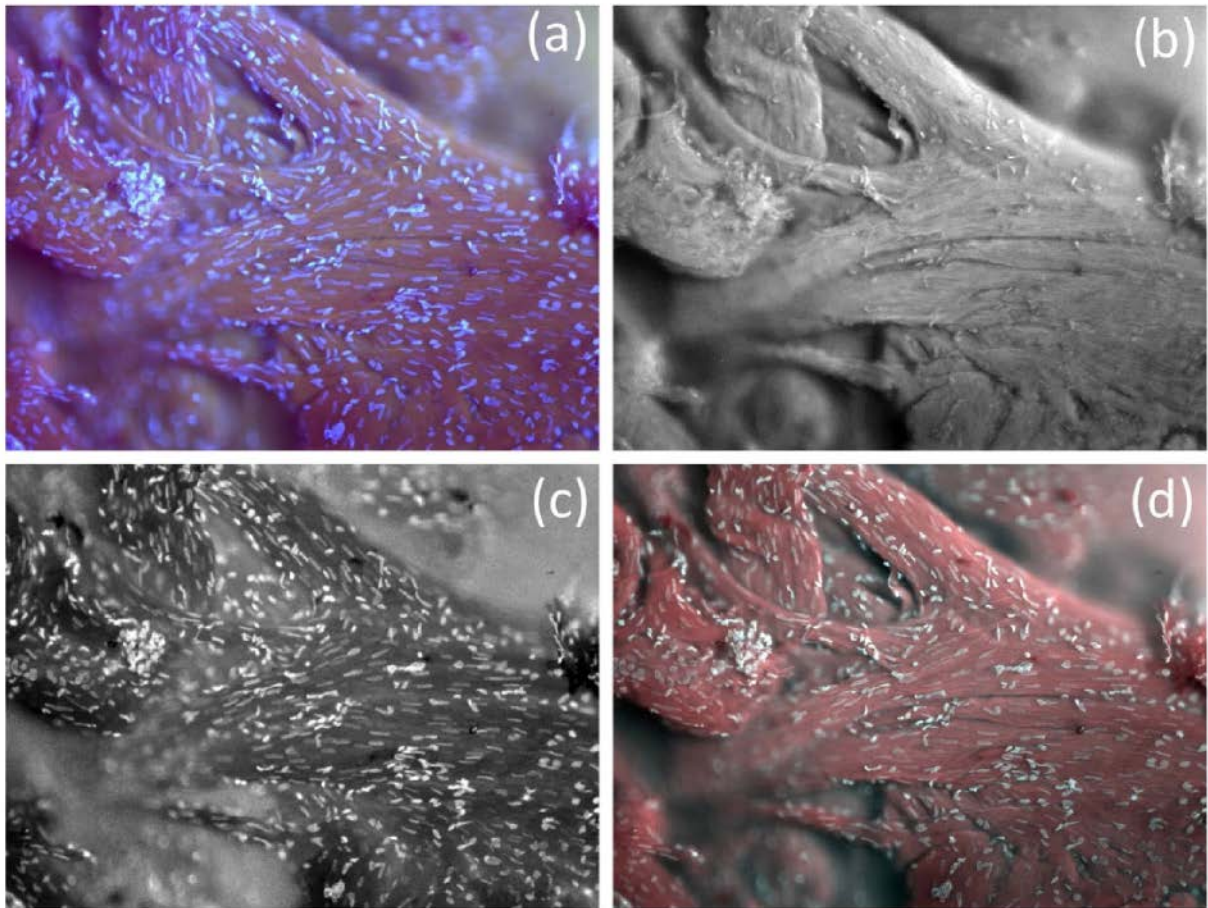


图 5

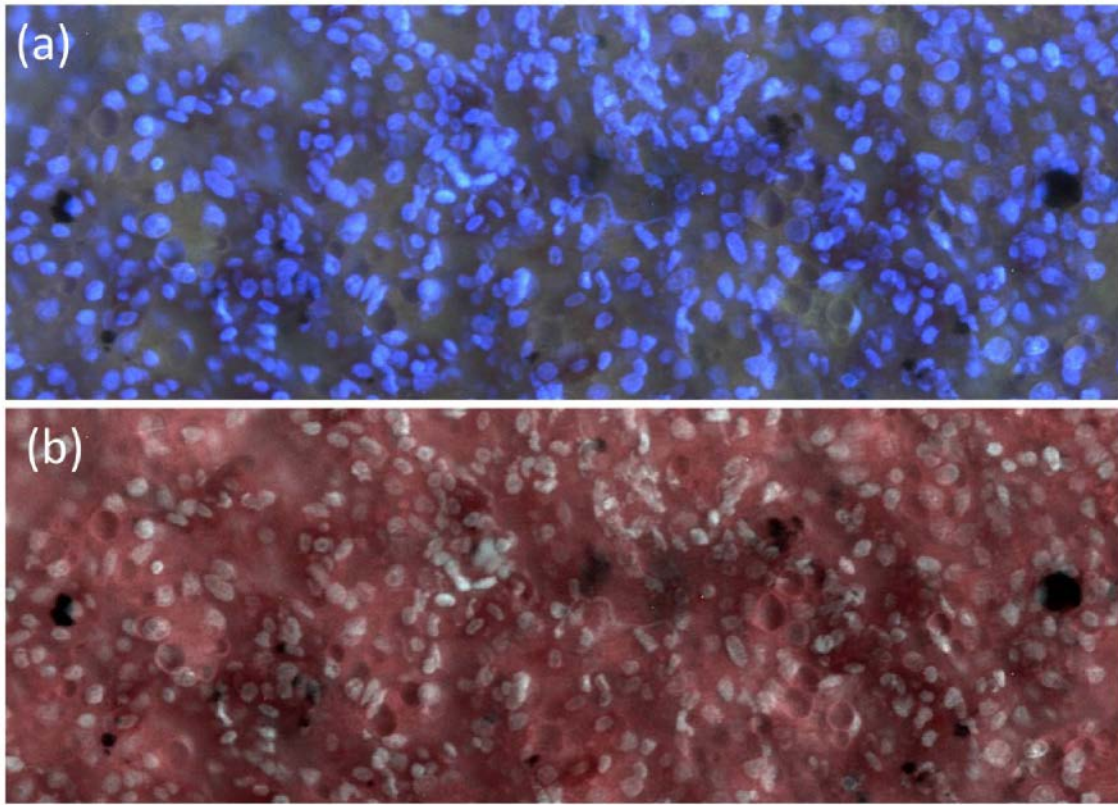


图 6

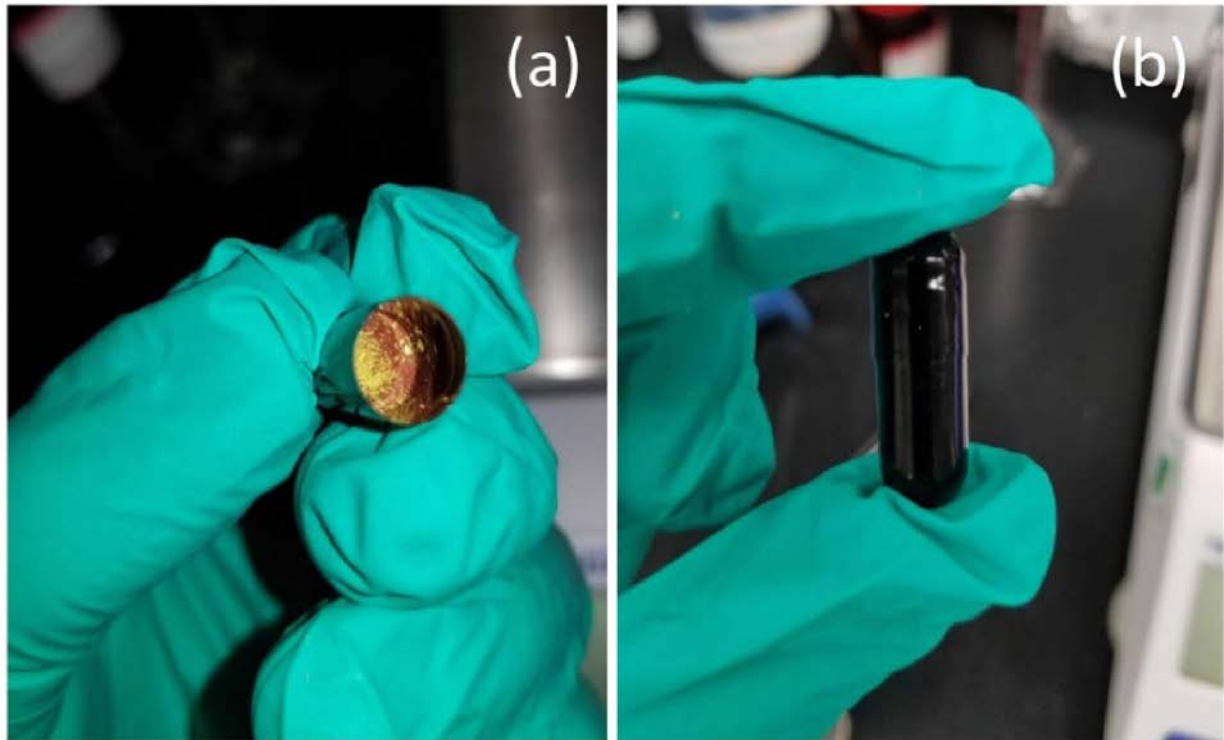


图 7

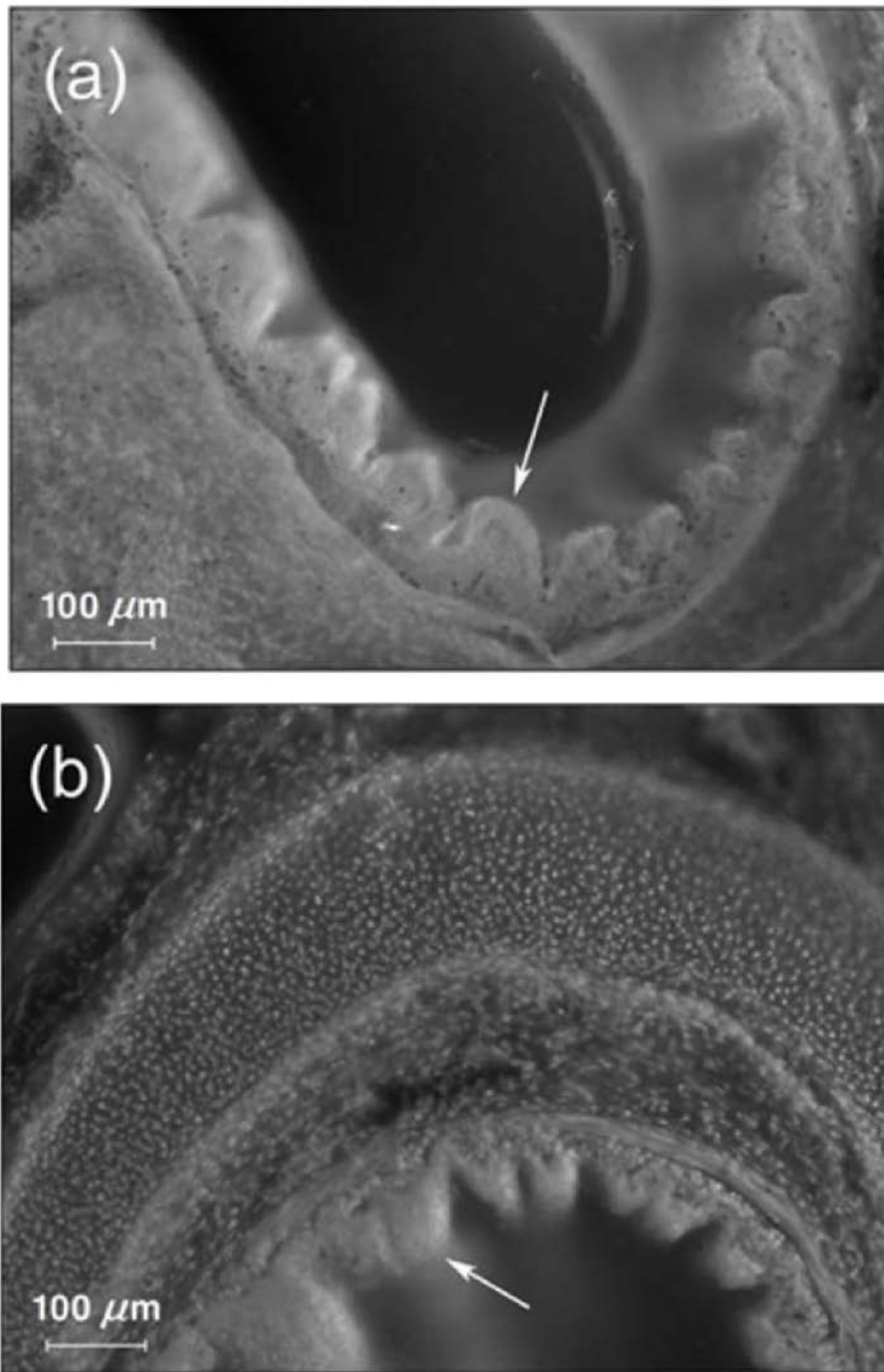


图 8

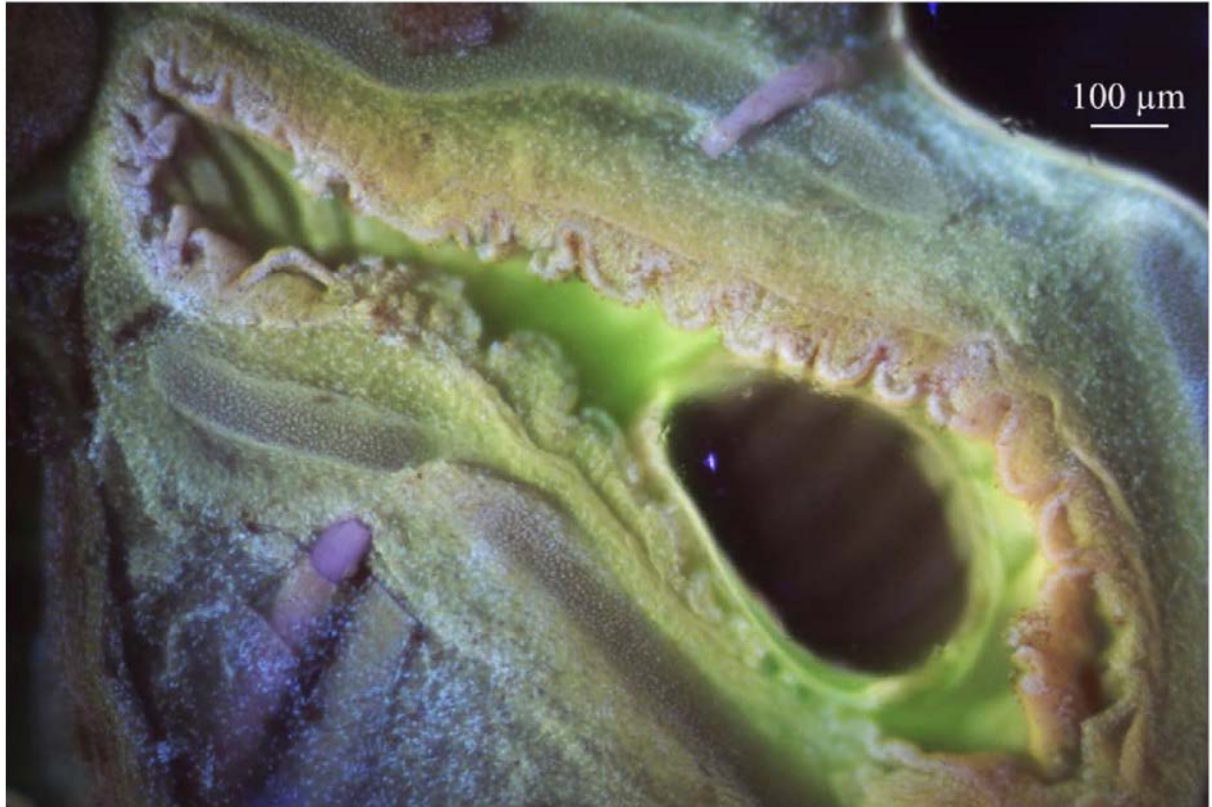


图 9

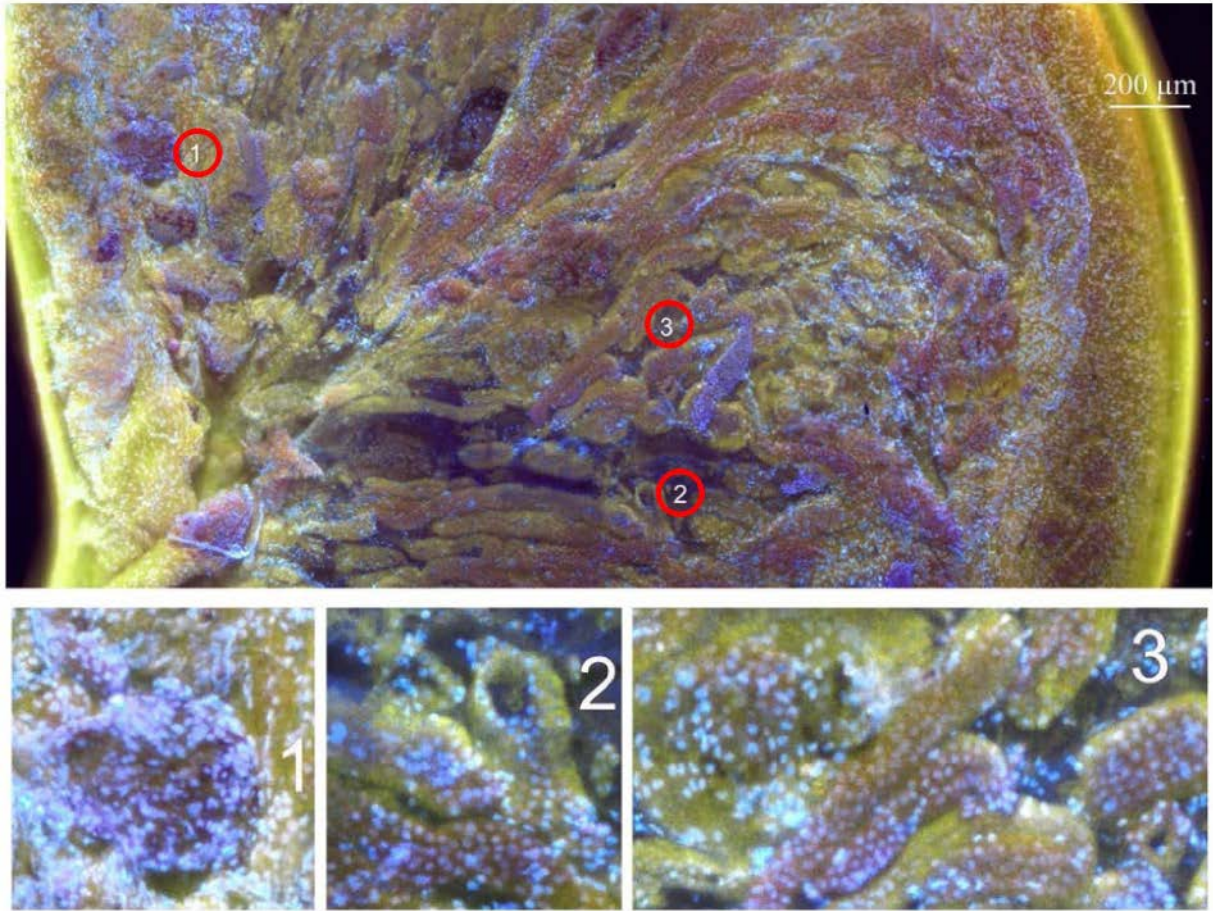


图 10