(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 102254150 A
(43)申请公布日 2011.11.23

(21)申请号 201110157984.0
(22)申请日 2006.10.16
(30)优先权数据
PA200501438 2005.10.14 DK
PA200600821 2006.06.16 DK
60/726,795 2005.10.14 US
60/814,115 2006.06.16 US
(62)分案原申请数据
200680047484.9 2006.10.16
(71)申请人 尤尼森斯繁殖技术公司
地址 丹麦奥胡斯
(72)发明人 尼尔斯·B·拉姆辛
于尔根·伯恩特森
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
代理人 罗天乐
(51)Int.Cl.
G06K 9/00(2006.01)
G06T 7/00(2006.01)
G06T 7/20(2006.01)

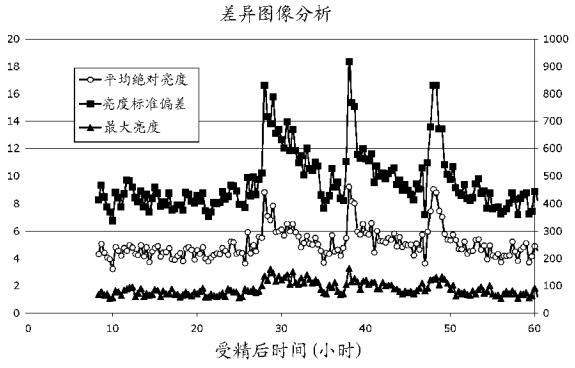
权利要求书 6 页 说明书 31 页 附图 14 页

(54)发明名称

细胞群的变化的测定

(57)摘要

本发明涉及细胞群的变化的测定，更具体地，本发明涉及用于测定细胞群中的变化的方法和系统，以及使用所述方法和系统来评估胚胎的质量量度和选择供体外受精用的胚胎的方法，所述方法包括以下步骤：顺序获取至少两幅细胞群图像，比较所述至少两幅图像的至少一部分而得到至少一幅差异图像，从所述至少一幅差异图像计算参数，基于所述计算得出的参数而确定是否发生了变化。



CN 102254150 A

1. 用于测定包含至少一个细胞的细胞群中的变化的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 顺序获取细胞群的至少两幅图像；

b) 比较所述至少两幅图像的至少一部分而得到至少一幅差异图像；

c) 从所述至少一幅差异图像计算参数；和

d) 基于所述计算得出的参数确定是否发生了变化。

2. 权利要求 1 的方法，其中所述参数是从所述至少一幅差异图像基于完整差异图像计算得出的。

3. 权利要求 1 或 2 的方法，其中所述参数相对于其它一个或多个参数是维持未归一化的，所述其它一个或多个参数是从获自同一细胞群的其它差异图像通过相同的计算导出的。

4. 前述权利要求任一项的方法，其中所述参数未计算成或调整成 0-1 之间的归一化值。

5. 前述权利要求任一项的方法，其中所述参数表现所比较图像之间的差异。

6. 前述权利要求任一项的方法，其中所述参数未与自相似矩阵中的值的计算相关联。

7. 前述权利要求任一项的方法，其中所述参数是在没有将图像适应性分割成关注区和非关注区的条件下计算的。

8. 前述权利要求任一项的方法，其中所述细胞群是胚胎。

9. 前述权利要求任一项的方法，其中所述细胞群的变化是细胞重排，诸如细胞运动。

10. 前述权利要求任一项的方法，其中所述细胞群的变化是细胞重排，其中超过两个细胞发生运动，诸如其中大多数细胞发生运动，诸如其中所有细胞发生运动。

11. 前述权利要求任一项的方法，其中所述细胞群的变化是细胞分裂。

12. 前述权利要求任一项的方法，其中所述细胞群的变化是至少一个细胞的死亡。

13. 前述权利要求任一项的方法，其中所述差异图像是通过将所述至少两幅图像中相应像素的值相减得到的。

14. 前述权利要求任一项的方法，其中所述差异图像是通过将所述至少两幅图像中相应像素的经变换的值相减，诸如将所述至少两幅图像中相应像素的值的对数相减而得到的。

15. 前述权利要求任一项的方法，其中所述差异图像是通过计算所述至少两幅图像中相应像素的值的比率得到的。

16. 前述权利要求任一项的方法，其中从差异图像计算得出的所述参数选自：差异图像中像素绝对值的和；差异图像中像素绝对值的均值；差异图像中像素绝对值的中值；平方值的和；差异图像中像素的平方值的均值；差异图像中像素的平方值的中值；差异图像中像素值的方差；差异图像中像素值的标准偏差；图像的直方图中不同百分位的值；差异图像的最小值和最大值；及直方图的范围或方差或从这些参数的一项或多项的组合导出的另一参数。

17. 前述权利要求任一项的方法，其中从差异图像计算得出的所述参数选自：差异图像中像素绝对值的和；差异图像中像素值的标准偏差；及差异图像中像素值的方差。

18. 前述权利要求任一项的方法，其中所述差异图像是亮度差异图像。

19. 前述权利要求任一项的方法，其中对应于差异图像中的像素的值是亮度的差异。

20. 权利要求 1-17 任一项的方法，其中所述对应于差异图像中的像素的值是相的差异，诸如相衬的差异。

21. 权利要求 1-17 任一项的方法，其中所述对应于差异图像中的像素的值是光谱特征的差异。

22. 前述权利要求任一项的方法，其中在进行所述比较以得到至少一幅差异图像之前，对所述至少两幅图像进行配准。

23. 前述权利要求任一项的方法，其中在进行所述比较以得到至少一幅差异图像之前，消除所述至少两幅图像中的图像假像。

24. 前述权利要求任一项的方法，其中在进行所述比较以得到至少一幅差异图像之前，对所述至少两幅图像进行相同的缩放。

25. 权利要求 24 的方法，其中所述缩放是分辨率的降低。

26. 权利要求 24 和 25 的方法，其中所述分辨率的降低是通过属于下组的方法进行的：重采样、取平均、平滑、运行平均值、双三次插值、b 样条插值、和图像矩阵的简单缩小。

27. 前述权利要求任一项的方法，其中所述至少两幅图像是至少三幅图像，且这些图像是以规则的时间间隔得到的。

28. 前述权利要求任一项的方法，其中所述至少两幅图像是至少三幅图像，且这些图像是以不规则的时间间隔得到的。

29. 前述权利要求任一项的方法，其中从连续图像序列得到多幅差异图像，且所述计算得出的参数的变化指示细胞群的变化。

30. 权利要求 29 的方法，其中每一幅所述差异图像均是从在后的两幅图像得到的，且从所述差异图像计算得出的参数集合形成时间系列。

31. 权利要求 29 或 30 的方法，其中所述计算得出的参数的极值指示细胞重排，诸如细胞运动性。

32. 权利要求 29-31 任一项的方法，其中所述计算得出的参数的极值指示细胞分裂。

33. 权利要求 29-32 任一项的方法，其中所述极值是峰。

34. 权利要求 33 的方法，其中所述峰的形状指示细胞群中所发生的变化的性质。

35. 权利要求 33 至 34 的方法，其中高而尖的峰指示快速的细胞分裂，且碎裂最少。

36. 权利要求 35 的方法，其中所述高而尖的峰指示细胞群中基本上同步化的细胞分裂。

37. 权利要求 33 或 34 的方法，其中宽的和 / 或双峰型的峰指示较慢的细胞分裂，且可能有较多碎裂。

38. 权利要求 37 的方法，其中所述宽的和 / 或双峰型的峰指示不同步的细胞分裂。

39. 前述权利要求 29-38 任一项的方法，其中所述计算得出的参数的基础水平的突然变化指示至少一个细胞的死亡。

40. 权利要求 39 的方法，其中所述变化是基础水平平均值显著升高，继而突然降低。

41. 前述权利要求任一项的方法，其中将成群细胞群的变化的测定结果与成群细胞群的其它量度进行比较。

42. 权利要求 41 的方法，其中所述其它量度选自：呼吸速率、氨基酸摄取、运动性分析、形态学、卵裂球大小、卵裂球粒化、碎裂、卵裂球颜色。

43. 前述权利要求任一项的方法，其中所述成群细胞群在获取所述至少两幅图像的过程中位于培养基中。

44. 用于确定包含至少一个细胞的细胞群的质量的方法，所述方法包括以下步骤：

a) 顺序获取细胞群的至少两幅图像；

b) 比较所述至少两幅图像的至少一部分以得到至少一幅差异图像；

c) 从所述至少一幅差异图像计算参数；

d) 基于所述计算得出的参数确定细胞群的质量。

45. 权利要求 44 的方法，其中所述参数相对于其它一个或多个参数是维持未归一化的，所述其它一个或多个参数是从获自同一细胞群的其它差异图像通过相同的计算导出的。

46. 权利要求 44 或 45 的方法，其中所述参数未计算成或调整成 0-1 之间的归一化值。

47. 权利要求 44 或 46 的方法，其中所述参数表现所比较图像之间的差异。

48. 权利要求 44-47 任一项的方法，进一步包括权利要求 1-43 的任何特征。

49. 用于确定胚胎质量的权利要求 44-48 任一项的方法，包括监测胚胎一段时期，所述时期的长度足以包含至少一个细胞分裂期和分裂间期的至少一部分，并测定至少一个细胞分裂期的长度和 / 或测定分裂间期中的细胞运动和 / 或测定分裂间期中细胞运动期的长度，由此获得胚胎质量量度。

50. 权利要求 49 的方法，其中监测胚胎一段时期，所述时期包含至少两个细胞分裂期。

51. 权利要求 49 的方法，其中监测胚胎一段时期，所述时期包含至少三个细胞分裂期。

52. 用于确定胚胎质量的权利要求 44-48 任一项的方法，包括监测胚胎一段时期，所述时期的长度足以包含至少一个细胞重排时期和一个没有实质性细胞重排的时期，并使用权利要求 1-43 任一项所述的方法来测定细胞重排的时间分布，从而得到胚胎质量量度。

53. 权利要求 52 的方法，其中监测胚胎一段时期，所述时期包含至少两个细胞分裂期。

54. 权利要求 52 的方法，其中监测胚胎一段时期，所述时期包含至少三个细胞分裂期。

55. 权利要求 44-54 任一项的方法，其中测定各个重排期和 / 或细胞分裂期的时间长度。

56. 权利要求 44-55 任一项的方法，其中测定各个重排期和 / 或细胞分裂期之间的时间长度。

57. 权利要求 44-56 任一项的方法，其中测定至少两个分裂间期中的细胞运动期。

58. 权利要求 44-57 任一项的方法，其中测定至少两个分裂间期中的细胞运动程度。

59. 权利要求 44-58 任一项的方法，其中所述至少两个分裂间期是在后的分裂间期。

60. 权利要求 44-59 任一项的方法，其中进行至少一个细胞分裂期的长度的测定和分裂间期中细胞运动的测定。

61. 权利要求 44-60 任一项的方法，其中进行至少一个细胞分裂期的长度的测定和分裂间期中细胞运动的时期的测定。

62. 权利要求 44-61 任一项的方法，其中进行至少一个细胞分裂期的长度的测定和分裂间期中细胞运动的测定和分裂间期中细胞运动的时期的测定。

63. 权利要求 44-62 任一项的方法，其中突然的细胞分裂是高质量胚胎的指示。

64. 权利要求 44-63 任一项的方法，其中细胞分裂后细胞重排的持续时间短是高质量

胚胎的指示。

65. 权利要求64的方法，其中所述细胞重排的持续时间是通过权利要求1-43任一项所述的方法测定的。

66. 权利要求44-65任一项的方法，其中通过权利要求1-43任一项所述方法测定的高而尖的参数峰是高质量胚胎的指示。

67. 权利要求63的方法，其中所述突然的细胞分裂表现为卵裂球活动中的尖峰。

68. 权利要求63的方法，其中所述突然的细胞分裂表现为通过权利要求1-43任一项所述方法测定的高而尖的参数峰。

69. 权利要求44-68任一项的方法，其中长期的细胞质分裂和随后其它卵裂球广泛的和/或长期的重排是低质量胚胎的指示。

70. 权利要求69的方法，其中所述其它卵裂球广泛的和/或长期的重排表现为卵裂球活动中的宽峰。

71. 权利要求69的方法，其中所述长期的细胞质分裂和随后其它卵裂球广泛的和/或长期的重排表现为通过权利要求1-43任一项所述方法测定的宽的参数峰。

72. 权利要求44-71任一项的方法，其中在细胞分裂之间卵裂球位置重排几乎没有持续时间和/或持续时间短是高质量胚胎的指示，而在细胞分裂之间广泛和/或长期的运动则是低质量胚胎的指示。

73. 权利要求72的方法，其中所述运动是通过权利要求1-43任一项所述方法表现的。

74. 权利要求44-73任一项的方法，其中在细胞分裂之间长期的细胞位置重排常常与低胚胎质量、不同步细胞分裂和广泛碎裂相关联。

75. 权利要求74的方法，其中所述长期的重排表现为卵裂球活动中的宽峰。

76. 权利要求74的方法，其中所述长期的细胞位置重排表现为通过权利要求1-43任一项所述方法测定的宽参数峰。

77. 权利要求44-76任一项的方法，其中胚胎中广泛而持续静止的区域指示低质量胚胎。

78. 权利要求77的方法，其中“广泛”是指所观察的横截面总面积的至少30％。

79. 权利要求77的方法，其中“广泛”是指所观察的横截面总面积的至少15％。

80. 权利要求44-80任一项的方法，其中在桑椹胚阶段中的紧密化发生之前不存在无运动的静止区是高质量胚胎的指示。

81. 权利要求44-80任一项的方法，其中合适的时间-分区中平均运动的比率和/或不同时间-分区中差异图像的标准偏差的比率是质量参数。

82. 权利要求81的方法，其中所述时间-分区对于牛胚胎而言基本上是受精后32-60小时和/或受精后60-75小时和/或受精后75-90小时。

83. 权利要求81至82的方法，其中所述合适的时间-分区是物种特异性的。

84. 权利要求44-83任一项的方法，其中第一次细胞分裂的早开始至少是高胚胎质量的共同指示。

85. 权利要求44-84任一项的方法，其中在后来的阶段中的同步细胞分裂是高质量胚胎的指示，而不同步细胞分裂是低质量胚胎的指示。

86. 权利要求44-85任一项的方法，其中若细胞分裂期显著短于1小时，则胚胎质量量

度提高。

87. 权利要求 44-86 任一项的方法，其中若分裂间期几乎没有细胞运动，则胚胎质量量度提高。

88. 权利要求 44-87 任一项的方法，其中若第一次细胞分裂开始早，即对于人类胚胎而言在受精后 25 小时前，则胚胎质量量度提高。

89. 权利要求 44-88 任一项的方法，其中若细胞重排诸如细胞运动在胚胎中经时均匀分布，则胚胎质量量度提高。

90. 用于选择适于移植、冷冻保存或淘汰的受精卵母细胞或胚胎的方法，所述方法包括：

a) 通过权利要求 1-89 任一项所述方法测定卵母细胞或胚胎的变化；并

b) 选择适于移植、冷冻保存或淘汰的卵母细胞或胚胎。

91. 权利要求 90 的方法，其中所选择的卵母细胞或胚胎是具有最高胚胎质量量度的卵母细胞或胚胎。

92. 权利要求 90 的方法，其中所选择的卵母细胞或胚胎是具有最低胚胎质量量度的卵母细胞或胚胎。

93. 权利要求 90 的方法，其中所选择的卵母细胞或胚胎是这样的卵母细胞或胚胎，其在通过权利要求 1-44 任一项所述的方法所测定的一个参数上具有独特的属性，诸如独特的时间模式。

94. 用于测定包含至少一个细胞的细胞群的变化的系统，所述系统包括：

a) 用于顺序获取细胞群的至少两幅图像的部件；

b) 用于比较所述至少两幅图像的至少一部分以得到至少一幅差异图像的部件；

c) 用于从所述至少一幅差异图像计算参数的计算机；和

d) 用于基于所述计算得出的参数确定是否发生了变化的部件。

95. 权利要求 94 的系统，其中所述计算机使得所述参数相对于其它一个或多个参数维持未归一化，所述其它一个或多个参数是从获自同一细胞群的其它差异图像通过相同的计算导出的。

96. 权利要求 94 或 95 的方法，其中所述计算机不将所述参数计算成或调整成 0-1 之间的归一化值。

97. 权利要求 94-96 的方法，其中由所述计算机计算得出的所述参数表现所比较图像之间的差异。

98. 权利要求 94-97 的系统，其包括权利要求 1-43 任一项的一个或多个特征。

99. 用于确定胚胎质量的系统，其包括用于监测胚胎一段时期的部件，所述时期的长度足以包含至少一个细胞分裂期和分裂间期的至少一部分，所述系统进一步包括用于测定所述至少一个细胞分裂期的长度和 / 或测定分裂间期中的细胞运动和 / 或测定分裂间期中细胞运动时间段的长度的部件，并且包括用于基于对一个或多个细胞分裂期和一个或多个分裂间期的测定来测定胚胎质量量度的部件。

100. 权利要求 99 的系统，其包括用于测定权利要求 44-89 任一项所限定的一个或多个特征的部件。

101. 权利要求 99 或 100 的系统，其包括权利要求 1-43 任一项的一个或多个特征。

102. 用于测定包含至少一个细胞的细胞群的质量的系统，所述系统包括：

a. 用于顺序获取细胞群的至少两幅图像的部件；

b. 用于比较所述至少两幅图像的至少一部分以得到至少一幅差异图像的部件；

c. 用于从所述至少一幅差异图像计算参数的计算机；和

d. 用于基于所述计算得出的参数确定是否发生了变化的部件。

103. 权利要求 102 的系统，其包括用于测定权利要求 44-89 任一项所限定的一个或多个特征的部件。

104. 权利要求 102 或 103 的系统，其包括权利要求 1-43 任一项的一个或多个特征。

细胞群的变化的测定

[0001] 本申请是申请日为 2006 年 10 月 16 日、申请号为 200680047484.9(国际申请号为 PCT/DK2006/000581)、发明名称为“细胞群的变化的测定”的发明申请的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明涉及用于测定细胞群的变化的方法和系统,以及使用所述方法和系统来评估胚胎的质量量度和选择供体外受精用的胚胎的方法。

[0003] 发明背景

[0004] 在世界范围内,有超过 8 千万人为不孕所累。估计有 10%的夫妇遭受原发或继发不孕 (Vayena et al.,2001)。体外受精 (IVF) 是一种可以选择的医学治疗方法,它可能为原本不能怀孕的的夫妻提供了怀孕的机会。它是这样一种过程 :首先从女性卵巢中取出卵子 (卵母细胞),然后在实验室中用精子给卵子受精。然后将此过程中产生的胚胎置入子宫,以实现可能的着床 (implantation)。为了避免多胎妊娠和多胎生产,只转移少数胚胎 (通常少于四个,理想的是只有一个 (Bhattacharya et al.,2004))。选择正确的转移用胚胎是 IVF 治疗中的关键步骤。当前的选择规程大多完全基于胚胎在发育过程中不同时间点的形态学评估,特别是转移时使用标准立体显微评估。然而,人们广泛认为所述评估规程需要定性的和定量的改进。

[0005] 早期细胞分裂。一种有希望的新方法是利用到 2 细胞阶段为止的“早期分裂”(即授精 / 注射后前 25-27 小时) 作为质量指标。在此方法中,在受精后 25-27 小时目视检查胚胎,以确定第一次细胞分裂是否完成。数项研究证明了胚胎个体的早期分裂与后续发育潜能之间存在强有力的关联性 (Shoukir et al.,1997 ;Sakkas et al.,1998,2001 ;Bos-Mikich et al.,2001 ;Lundin et al.,2001 ;Petersen et al.,2001 ;Fenwick et al.,2002 ;Neuber et al.,2003 ;Salumets et al.,2003 ;Windt et al.,2004)。若干评论者指出更频繁的观察是必要的,然而,频繁的目视观察及相关的从培养箱到倒置显微镜的转移会诱发物理应力,物理应力可能妨碍或者甚至阻止胚胎发育。它还耗费时间,而且难以纳入 IVF 的临床规程。

[0006] 数名研究人员进行了胚胎发育过程中的时移图像获取。这主要是通过将研究显微镜置于培养箱中或者在具有自动化图像获取的显微镜载物台上建立“培养箱载台”来进行的。“培养箱”维持可接受的温度 (37℃)、湿度 (> 90%) 和气体组成 (5% CO_2,有些场合还有降低的氧浓度)。时移图像的人工评估提供了关于细胞分裂的计时和持续时间的重要信息 (Grisart et al.,1994 ;Holm et al.,1998 ;Maje-rus et al.,2000 ;Holm et al.,2002 ;Holm et al.,2003 ;Lequarre et al.,2003 ;Motosugi et al.,2005)。

[0007] 一种备选的实验设置包括将图像获取系统置于培养箱中以在发育过程中观察胚胎,从而避免了将胚胎从培养箱内的优化条件移出而对胚胎施加压力。IMT international 制造和销售一种商品化系统,EmbryoGuard(见文献列表)。在这种设置中,有可能在培养箱中在线观察胚胎。

[0008] 常规图像分析。胚胎图像和胚胎发育的时移视频的形态学评分依赖于人工分析,

其中评阅人给照片评级，而计算机只追踪此评级，产生带注解的时间线，显示何时发生重大变化。此类软件的例子有 EmbryoGuard 的时移图像获取系统提供的注解软件。时移视频人工分析的例子见 Grisart et al.，1994；Holm et al.，1998；Majerus et al.，2000；Holm et al.，2002；Holm et al.，2003；Lequarre et al.，2003；Motosugi et al.，2005。

[0009] 当前用于胚胎照片的定量图像分析的软件采用半自动的或计算机辅助的算法。它是一种计算机辅助图像评分，其中使用者使用画图工具来描绘胚胎结构，随后基于使用者描绘的胚胎结构轮廓对胚胎结构进行定量。可通过商业途径获得数种用于进行胚胎照片半自动分析的程序（例如图像 House 的 FertiMorph，Copenhagen，Denmark）。人们进行了若干建立完全自动化的胚胎照片分析系统的尝试（例如 Christina Hnida 的博士论文）。然而，胚胎学和 IVF 实验室中一般使用的霍夫曼调制相衬 (Hoffmann modulation contrast，HMC) 图像使得自动细胞检测难以进行。

[0010] 已经为其它应用开发了自动化图像分析，诸如检测细胞培养物中的有丝分裂细胞 (Eccles et al.，1986；Klevecz et al.，1988；美国专利 US 4724543；Belien et al.，1997；Curl et al.，2004)。所有已报道的自动算法均采用经典方案进行定量图像分析：

[0011] 1. 获取图像；

[0012] 2. 增强图像；

[0013] 3. 通过设定阈值将图像分割成关注区 (region of interest，ROI)；并

[0014] 4. 对 ROI 计数和表征（大小 (size)、密度等）。

[0015] 有关这些步骤及每个步骤的众多变量的一般性描述可见于有关图像分析的综述性论文和教科书（例如 Oberholzer et al.，1996 的组织学图像分析综述或 John Russ 的 The Image Processing Handbook，第 4 版，2002)。增强关注结构的表现的最好方法依赖于现有图像（例如显微镜检术照片）和关注结构（例如核）的表示，而且使用了许多不同变量。然而，增强程序总是用于帮助分割照片，以鉴定和描绘关注区。一旦找到并鉴定这些区，可以在面积 (area)、大小 (size)、亮度、位置等方面进一步表征这些区。

[0016] 分割自身是通过将像素亮度 (intensity)（或像素亮度衍生的函数）与给定阈值进行比较来进行的。在阈值以上的区域属于关注区 (ROI)，它通常是必须测量的对象（例如核）。为这种分割使用了众多不同算法，但是它们总是服务于同一目的，即图像的分割。

[0017] Eccles et al.，1986 的论文介绍了对时移显微镜检图像进行自动化分析以检测细胞分裂。该论文描述了一种通过分析时移系列图像在同步化哺乳动物细胞中自动化检测细胞分裂的方法。该论文中所描述的和所使用的图像分析算法没有利用连续帧中的亮度差异。取而代之的是，它以如下方式分析每幅图像：首先提取高频率的照片组成部分，然后设定阈值，并探寻象征假定的有丝分裂细胞的环形目标。此操作构成用于检测细胞轮廓及其相对位置的图像分割。检查连续帧上的环形之间的空间和时间关系，以辨别有丝分裂的发生。

[0018] US23185450 介绍了另一种方法，其使用自相似矩阵法来分析系列图像。所述矩阵由归一化的成对相似性值组成。此方法用于分析各帧之间的长期和短期相似性。

[0019] 本申请通过提述并入所有引用的专利和非专利参考文献的全部内容。

[0020] 发明概述

[0021] 本发明涉及用于自动化测定细胞群（例如成群细胞群，如胚胎）的变化的方法和

系统。变化可以是细胞重排，诸如细胞运动 (movement) 或细胞运动性 (motility)。相关变化还包括细胞分裂和细胞死亡。变化的时间模式和程度 / 大小 (magnitude) 指示细胞群的质量。由此，本发明有助于在体外受精 (IVF) 后选择供植入用的最佳胚胎，或者，本发明还可用于测定每个时间单位里汇合细胞培养物中发生的细胞分裂数。

[0022] 可以从观察到的透明带内细胞重排的空间 - 时间模式推知胚胎质量。可以从顺序获取的图像之间的差异计算出给定时间点上细胞重排的量。许多不同的非归一化参数可用于定量变化的量。如下所述，一种最优选的方法是所得差异图像中的标准偏差（或方差 (variance)）。与现有技术相反，参数优选是未归一化的，即它是“差异性”而非相似性的量度。本发明的一个新颖方面是胚胎内细胞重排的时间模式可指示胚胎质量。细胞重排对应于胚胎内至少一个细胞、优选超过两个细胞、最优选所有细胞的运动。细胞重排可能与细胞分裂有关，但是优势在于其检测迅捷和容易得多，因为不需要直接观察发生分裂的特定细胞，而是可以通过邻近细胞的相关重排来间接测量。因为是间接效应，所以我们不需要识别图像中的“关注区”作为分裂对象（事实上，分裂细胞甚至可以不在图像中）。细胞分裂会引起细胞重排，因为胚胎细胞由于被透明带所限制，在每次细胞分裂后，细胞彼此撞击，大部分（有时是所有的）细胞改变位置。然而，其它机制可能不依赖细胞分裂就引起细胞运动（和细胞重排），或者可能导致运动（和细胞重排）在细胞质细胞分裂完成后持续进行。

[0023] 具体而言，本发明涉及如下发现，即从差异图像直接导出的参数与成群细胞群的变化有关联，其中所述差异图像是通过比较成群细胞群的至少两幅图像得到的。如此，本发明介绍了与现有技术的方法相比有所改进的方法。在用于分析系列图像诸如时移图像的现有方法，包括增强中，在得到关于胚胎或细胞的任何信息之前，计算各图像中每个像素在连续帧之间亮度的差异，以其作为起点用于随后的常规增强和分割图像分析。

[0024] 相应的，在第一个方面，本发明涉及用于测定包含至少一个细胞的细胞群的变化的方法，所述方法包括以下步骤：

[0025] a) 顺序获取细胞群的至少两幅图像；

[0026] b) 比较所述至少两幅图像的至少一部分而得到至少一幅差异图像；

[0027] c) 从所述至少一幅差异图像计算参数；并

[0028] d) 基于所述计算出的参数确定是否发生了变化。

[0029] 此外，在第二个方面，本发明涉及用于测定包含至少一个细胞的细胞群的变化的系统，所述系统包括：

[0030] a) 用于顺序获取细胞群的至少两幅图像的部件；

[0031] b) 用于比较所述至少两幅图像的至少一部分而得到至少一幅差异图像的部件；

[0032] c) 用于从所述至少一幅差异图像计算参数的部件；和

[0033] d) 用于基于所述计算得出的参数确定是否发生了变化的部件。

[0034] 在第三个方面，本发明涉及用于选择适于移植、冷冻保存或淘汰的已受精卵母细胞或胚胎的方法，所述方法包括：

[0035] a) 通过权利要求 1-89 任一项所限定的方法测定卵母细胞或胚胎的变化；并

[0036] b) 选择适于移植、冷冻保存或淘汰的卵母细胞或胚胎。

[0037] 在第四个方面，本发明涉及用于确定包含至少一个细胞的细胞群的质量的系统，所述系统包括：

[0038] a) 用于顺序获取细胞群的至少两幅图像的部件；

[0039] b) 用于比较所述至少两幅图像的至少一部分而得到至少一幅差异图像的部件；

[0040] c) 用于从所述至少一幅差异图像计算参数的计算机；和

[0041] d) 用于基于所述计算得出的参数确定是否发生了变化的部件。

[0042] 在第五个方面，本发明涉及用于测定包含至少一个细胞的细胞群的质量的方法，所述方法包括以下步骤：

[0043] a) 顺序获取至少两幅细胞群图像；

[0044] b) 比较所述至少两幅图像的至少一部分而得到至少一幅差异图像；

[0045] c) 从所述至少一幅差异图像计算参数；并

[0046] d) 基于所述计算得出的参数确定细胞群的质量。

[0047] 此外，在一个优选的实施方案中，所述细胞群是胚胎或卵母细胞。

[0048] 附图简述

[0049] 图 1 受精后 8-60 小时、以 20 分钟为间隔的牛胚胎时移图像的分析。计算连续帧之间的差异作为差异图像。图上显示了差异图像中所有像素的平均绝对亮度（空心圆圈）、亮度的标准偏差（实心方形）、和最大观察亮度（实心三角形）。后一种变量以右边的比例尺显示，其它变量以左边的比例尺显示。28 小时、38 小时和 48 小时后观察细胞分裂。

[0050] 图 2 牛胚胎发育的时移系列图像的分析。以 20 分钟为间隔得到的胚胎发育过程中的一系列 167 幅图像的分析。结果堆 (stack) 显示了计算得出的差异图像，对其分析而产生了下面显示的运动曲线。可以以表格划界的文本文件的形式输出所有分析参数，供后续加工用。

[0051] 图 3 牛胚胎发育的图像。自受精后 8 小时开始、以 20 分钟为间隔得到的 167 幅图像。

[0052] 图 4 从图 3 所示的胚胎图像计算得出的差异图像。插入了以受精后小时数表示的每幅图像的获取时间。

[0053] 图 5 图 4 所示 ImageJ 宏的图形输出。灰线是标准偏差，黑线是平均绝对差异亮度。

[0054] 图 6 细胞（例如在一层饲养 / 支持细胞上生长的干细胞）汇合单层中细胞分裂的检测。最上面的图以空心符号显示了全区域的直接分析。下面显示了四个四分区（如照片所示）的每一个的分析。全区域图的判读是困难的，但在下面显示的每个四分区中能清楚的观察到细胞分裂。所有数据在理论上用于例示方法原理。

[0055] 图 7 2 个代表性牛胚胎的卵裂球活动。“好的”发育成孵化中的胚泡，但“差的”从未发育成胚泡。

[0056] 图 8 41 个牛胚胎在受精后 24-175 小时的卵裂球活动。卵裂球活动展示为假凝胶图像，其中运动性峰表示为暗带，而无活动为白色。每条道对应于一个胚胎，每个像素对应于在 30 分钟内得到的差异。

[0057] 图 9 13 个代表性牛胚胎的卵裂球活动。发育成孵化中的胚泡的“好”胚胎以绿色曲线表示。从未发育成胚泡的“差”胚胎以红色显示。X 轴是帧数，Y 轴是卵裂球活动。受精后 24 小时开始图像获取，以每小时 2 帧前进。绿色曲线已经通过给卵裂球活动值加上 30 而沿 Y 轴移位。

[0058] 图 10 所有已得帧的平均卵裂球活动（亮区域＝高卵裂球活动，暗区域＝低卵裂球

活动）。

[0059] 图 11 未发育成高质量胚泡的 21 个牛胚胎的卵裂球活动。指出了曲线中用于将卵裂球活动模式归类的三个部分。

[0060] 图 12 未发育成高质量胚泡的 18 个牛胚胎的卵裂球活动。指出了曲线中用于将卵裂球活动模式归类的三个部分。

[0061] 图 13 基于下列 A) 和 B) 的选择标准的应用 :A)R1 ＝胚泡活动模式的部分 1 与部分 3 的平均胚泡活动之间的比率 ;B)R2 ＝胚泡活动模式的部分 2 与部分 3 的胚泡活动标准偏差之间的比率。

[0062] 图 14 对 13 个代表性胚胎人工检测与自动化检测出的细胞分裂之间的关联。这种算法没有检测出大约 10％的细胞分裂，但是在其它方面对应关系是优良的。

[0063] 图 15 好胚胎和差胚胎的人工检测出的细胞分裂。

[0064] 发明详述

[0065] 定义

[0066] 细胞分裂期 :从第一次观察到细胞膜中的凹痕（表明细胞质分裂开始）起，至细胞质细胞分裂完成使得随之产生的子细胞的细胞质分成两个分开的细胞止的时期。

[0067] 分裂间期 :自前一个细胞分裂期结束起，至后一个细胞分裂期开始止的时期。

[0068] 分裂周期 :连续的细胞分裂起始之间的时间间隔，即自前一个细胞分裂期开始至后一个细胞分裂期开始的时间间隔。

[0069] 细胞运动 :细胞中心和外部细胞膜的运动。细胞内的细胞器的内部运动不是细胞运动。外部细胞膜是一种动态结构，因而细胞边界会不断地稍微改变位置。然而，这些轻微波动不视为细胞运动。细胞运动指细胞的重心及其相对于其它细胞的位置发生改变，以及细胞分裂。细胞运动可以通过计算运动中的细胞的两幅连续的数字图像之间的差异来予以定量。

[0070] 细胞器运动 :胚胎中内部细胞器和细胞器膜的运动，可通过显微镜检见到。在本申请语境的中细胞器运动不是细胞运动。

[0071] 细胞重排 :群体中两个或多个细胞的位置的改变。细胞重排牵涉胚胎中两个、优选多个、最优选所有卵裂球的细胞运动。

[0072] 图像 :与空间分布对应的经过变换或未经过变换的数据集，其中所述空间分布被分成空间像素 (2D) 或体素 (voxel)(3D)，这些像素或体素从细胞群体记录得到。应理解，本发明说明书中的像素可以用体素替换，而不偏离本发明的范围。

[0073] 差异图像 :与空间分布对应的经过变换或未经过变换的数据集，其中所述空间分布被分成空间像素 (2D) 或体素 (3D)，其中所述像素或体素是从两幅图像的数据集通过逐像素计算而得的。

[0074] 用于测定细胞重排的方法和系统

[0075] 本发明涉及通过分析成群细胞群的时移图像来确定何时发生了细胞变化以及细胞群的一般活动水平，用于测定细胞群、诸如成群细胞群、诸如发育中的胚胎中的变化的方法和系统。

[0076] 在本发明的内容中，术语“成群细胞群”(grouped cell population) 指一个或多个细胞的群体，特别是细胞群中的细胞分裂导致细胞群中一个或多个细胞的相对位置发生

三维变化的一个或多个细胞的群体。如此，成群细胞群优选是成块（in a lump）生长中的细胞群，而非只在一维或二维上生长的细胞群。成群细胞群的例子有发育中的胚胎或在饲养层上生长的干细胞块或细胞个体的边界难以辨别的汇合细胞层。

[0077] 胚胎

[0078] 胚胎近似球形，由一个或多个细胞（卵裂球）构成，周围被明胶样的壳，即称为透明带的细胞基质所包围。透明带执行多种功能，直到胚胎孵化，而且是良好的胚胎评估标志。该带呈球形、半透明，应当能与细胞碎片清楚地区分开。

[0079] 胚胎在卵母细胞通过融合或注射精子细胞（精虫）而受精后形成。该术语传统上还用在孵化（即透明带破裂）和随之发生的着床后。对于人类，已受精的卵母细胞在前 8 周传统上称为胚胎。此后（即 8 周后和所有重要器官形成后）它称为胎儿。然而，胚胎与胎儿之间的区别一般没有清楚限定。

[0080] 在胚胎发育过程中，卵裂球数目几何增加（1-2-4-8-16- 等）。同步细胞分裂一般维持至胚胎的 16 细胞阶段。此后细胞分裂变得不同步，最后细胞个体具有它们各自的细胞周期。对于牛细胞，构成胚胎的细胞直到 16 细胞阶段为止都应当能容易地作为球形细胞加以鉴定。在 32 细胞阶段（桑椹胚阶段）后，胚胎发生紧密化（compaction）。结果使得此阶段以后胚胎中的细胞个体难以评估。对于人类，胚胎紧密化发生稍早，而且卵裂球个体在 16 细胞阶段不易计数。通常将不孕治疗中生成的人类胚胎在桑椹胚阶段前转移至接受者，而其它哺乳动物胚胎则往往被实验培养至更进一步的发育阶段（扩大的胚泡）后再转移至接受者或排出（discharge）。在有些情况下，也将人类胚胎在转移前培养至胚泡阶段。这样做在下述情况下是优选的：在可获得许多高质量的胚胎时，或者在必须延长培养以等待植入前遗传诊断（PGD）结果时。相应地，术语“胚胎”常规地用于指以下各个阶段：已受精卵母细胞、合子、2 细胞、4 细胞、8 细胞、16 细胞、桑椹胚、胚泡、扩大的胚泡和已孵化的胚泡。

[0081] 汇合细胞层和本发明的其它应用例

[0082] 除了发育中的胚胎以外，本发明还可用于检测其它细胞培养物中的细胞分裂。特别关注的是下述场合：细胞个体边界难以精确确定的，和涉及分割和识别细胞对象的经典图像分析难以实施的。这些场合包括对培养块中的细胞分裂、汇合细胞层（诸如双层或组织样品）之中或之上的细胞分裂的考察。它还可包括在饲养细胞层之上培养的细胞（诸如干细胞）的细胞分裂，或在难以实施传统分割的其它结构之上培养的细胞的细胞分裂。

[0083] 图像获取

[0084] 术语“图像”用于描述待检查区域的画像，即术语“图像”包括一维表示（representation）、二维表示、三维表示、及 n 维表示。如此，术语“图像”包括该区域的体积（volume）、该区域的矩阵（matrix）、及该区域的信息数组（array）。

[0085] 成群细胞群的图像可以由任何类型的图像构成，诸如照片、照相胶片（photographic films）、以及在下述意义上的数字图像：通过在 CCD 芯片、CMOS 芯片、视频摄像机、静像照相机、平板扫描仪、鼓式扫描仪、激光扫描仪、光电倍增器、数字化仪阵列或任何其它类似图像获取部件上呈现而产生的图像而言；优选将图像进行数字化以便于后续图像比较。

[0086] 具体而言，图像可以是相差照片、暗视野图像、亮视野图像（使用Köhler光学）、霍夫曼调制相衬图像、干涉调制相衬（interference modulation contrast）图像、偏振图像、

荧光图像、红外图像、近红外图像、紫外图像、或其组合、或显现细胞个体和 / 或细胞器（诸如核）的边界的任何其它类型的光学。通常，8 位图像（即 256 种不同灰度）是足够的，然而，也可以使用高分辨率（12 或 16 位）图像。彩色图像可以在分析前转换成灰度图像，但也可以在不同的色空间或单独的颜色（如可能对合成荧光图像有用的）中加以分析。此外，像素可以取正值及负值。

[0087] 然而，所讨论的图像是活细胞的图像，因而用于生成图像的部件应当优选自身不会损害细胞。

[0088] 如此，术语“获取图像”既包括可以从照相机获取图像，又包括从数字存储介质、计算机 CPU、硬盘、CDROM、书籍、打印输出、传统照片、扫描图像、及其它来源获取图像。然而，在大多数情况下将通过数字照相机获取图像。

[0089] 通常，使用显微镜获取图像，诸如安装在显微镜或等效的透镜系统中的数字照相机。放大倍数和图像分辨率一般不是至关重要的，只要胚胎优选地覆盖图像中的至少 25 个像素，诸如图像中的至少 100 个像素。在一项典型应用中，胚胎占据数千个像素。一般而言，应当使用可能的最高对比度和放大倍数，尽管随后在分析过程中可以缩小照片（见下文）。然而，在很高分辨率的照片（＞＞ 1 兆像素）的情况下，可能必须缩小照片以缩小其尺寸 (size)（见下文）。

[0090] 优选的是，选择所述至少两幅图像的有效分辨率使得所述细胞群的最大尺度占据 1 个像素到 10 兆 (mega) 像素，优选 10 个像素到 1 兆像素，优选 50-1000 个像素，优选 100-1000 个像素，优选 200-1000 个像素，优选 500-1000 个像素，优选 200-500 个像素。

[0091] 在一个实施方案中，选择所述至少两幅图像的有效分辨率使得所述细胞群的最大尺度基本上占据 1-10 个像素，或者 10-50 个像素，或者 50-100 个像素，或者 100-200 个像素，或者 200-500 个像素，或者 500-1000 个像素，或者 1000 个像素 -1 兆像素，或者 1-10 兆像素，或者超过 10 兆像素。

[0092] 优选的是，自细胞群获取一系列连续图像，得到了许多图像，诸如至少 2 幅图像，诸如至少 3 幅图像，诸如至少 4 幅图像，诸如至少 5 幅图像，诸如至少 6 幅图像，诸如至少 7 幅图像，诸如至少 8 幅图像，诸如至少 9 幅图像，诸如至少 10 幅图像，诸如至少 25 幅图像，诸如至少 50 幅图像，诸如至少 100 幅图像，诸如至少 200 幅图像，诸如至少 1000 幅图像，诸如至少 10000 幅图像，诸如至少 100000 幅图像，诸如至少 1 兆幅图像，诸如至少 50 兆幅图像。

[0093] 两次连续获取之间的时间优选至多对应于一次细胞分裂的时间段，另一方面，优选获取最少的图像以便于加工。

[0094] 优选的是，两次连续获取之间的时间为至少 1/100 秒钟，优选至少 1/50 秒钟，优选至少 1/10 秒钟，优选至少 1 秒钟，优选至少 10 秒钟，优选至少 1 分钟，优选至少 2 分钟，优选至少 10 分钟，优选至少 30 分钟，诸如大约 30 分钟或 1 小时。

[0095] 还有，两次连续获取之间的时间优选为至多 2 小时，诸如至多 1.5 小时，诸如至多 1 小时，诸如至多 30 分钟，诸如至多 20 分钟，诸如至多 10 分钟，诸如至多 5 分钟，诸如至多 2 分钟，诸如至多 1 分钟。

[0096] 差异图像

[0097] 以前检测胚胎中细胞分裂的尝试试图分割图像来计算存在的卵裂球（＝细胞）的

数目并确定该数目何时增加。此方法对基本上平坦的细胞培养物效果较好，如 Eccles 所述检测哺乳动物细胞系中的细胞分裂 (Eccles et al.，1986)。然而，对于三维胚胎变得困难得多，此时必须分析并比较来自不同焦平面的多幅图像，以了解哪些部分是同一卵裂球的一部分。这在实践中是不可能的，因为图像分割最通常的是对霍夫曼调制相衬 (HMC) 图像进行的，这种图像易于由人类目测系统判读，但是不太适于基于计算机的图像分析。

[0098] 本发明不依赖于图像分割来鉴定关注区，诸如卵裂球个体的轮廓。取而代之的是，本发明评估图像序列中的细胞重排。这是通过来自成群细胞群的至少两幅图像的至少一幅、优选一系列差异图像得到的。在有些实施方案中，可以通过比较最近图像与在先图像的线性组合或其它功能相关性来获取差异图像。评估所述差异图像的至少一项参数来确定成群细胞群中的变化。在一个优选的实施方案中，差异图像得自细胞群的连续 / 后续图像。

[0099] 该方法涉及基于所获取的各图像帧来计算差异图像。可以依照本发明应用任何合适的差异图像，诸如通过两幅图像的差减而得到的差异图像、或通过建立两幅图像的比率而得到的差异图像。可以从两幅图像的原始图像如原样地得到差异图像，或者自两幅图像的任何变换图像得到差异图像。后者的例子有作为两幅原始图像中像素亮度比率的对数变换的差异图像（这等同于经对数变换的图像之间的亮度差异图像）。在一个优选的实施方案中，差异图像可以是亮度差异图像。

[0100] 通常，各图像中对应像素的值与获取图像时对应位置受到的光亮度相关联。然而，其它值类型包括相值，诸如相差，或光谱特征，诸如两条谱带中的能量比、光谱分布中的重心等等。相应地，在一个不同的优选实施方案中，差异图像是相差异图像或光谱差异图像。其中，前一种可能适于将本发明的方法应用于通过相差显微镜得到的图像，而后一种可能适于将本发明的方法应用于彩色图像和 / 或更高级的空间分布光谱学。

[0101] 如此，在一个实施方案中，通过将两幅连续图像中对应像素的亮度值相减来得到差异图像，即

[0102] $D_n(i,j) = I_n(i,j) - I_{n-1}(i,j)$

[0103] 其中，

[0104] $D_n(i,j)$ 表示时间 n 时位置 i，j 处的亮度差异，

[0105] $I_n(i,j)$ 表示时间 n 时位置 i，j 处的亮度，

[0106] $I_{n-1}(i,j)$ 表示时间 n-1 时位置 i，j 处的亮度。

[0107] 差异图像常常显示为图像。这需要适宜的缩放 (scaling)，因为计算得出的差异可能是正的，也可能是负的。然而，为了本发明的目的，建立差异的图像表示不是必要的，因为本发明不依赖于差异图像的分割，而是仅仅依赖于差异图像中所有像素值的数值分析，$D_n(x,y)$。描绘差异图像的图形表示不是必需的。如果建立了图形表示，避免舍入 (round-off) 或缩放是有利的，因为它们可能对算法不利或者甚至有害。

[0108] 在另一个实施方案中，作为各连续图像中像素图像亮度之间的亮度比率得到差异图像。为了降低噪声、对原始图像和 / 或比率加以变换可能是有利的。在一个实施方案中，作为亮度比的对数（自然对数或以 10 为底的对数）建立差异图像，例如

[0109] 比率 $_{i,j} = \log(I_n(i,j)/I_{n-1}(i,j))$

[0110] 以这种方式计算得出的比率对数图像将表现得与上文所述差异图像非常相似，可以通过计算下文所述任何一般参数来加以分析，产生相似的有关细胞分裂等的信息。

[0111] 在一个优选的实施方案中，从一个连续图像序列中在后的 (subsequent) 两幅图像得到所述差异图像，并且从所述差异图像计算得出的参数集合形成时间系列。更优选的是，此时间系列包括细胞重排的时间模式，可以将它与峰、谷和 / 或基础水平的程度 / 大小 (magnitude) 结合进行判读，获知细胞群的质量、状况和 / 或状态。

[0112] 在一个优选的实施方案中，使用由 PCA 分析、SVD、GPCA、支持矢量机器 (Support Vector Machine)、n 元组归类模型、神经网络、前馈神经网络等机器学习工具得到的模型来分析所述时间系列。

[0113] 以规则时间间隔得到的图像的优点是显而易见的。然而，应当注意，非规则胶片图像的分析也是可能的。在这种情况中，可以应用加权来补偿各帧之间时间间隔的差异。将以短时间间隔得到的各图像之间的差异放大，而将以长时间间隔得到的各图像之间的差异缩小。甚至可能获取具有恒定差异的图像，如此采用所得到的各图像之间的时间间隔作为细胞分裂的指标。

[0114] 一旦得到了差异图像，就通过计算参数，优选来从差异图像中几乎所有像素的参数来描述从前一帧图像到后一帧图像的变化。根据差异图像中所遭遇的差异值的列表，优选根据所遇到的所有差异值，计算这些参数。

[0115] 参数

[0116] 任何合适的计算参数都可用作变化的指标，诸如从差异图像或其一部分计算得出的参数，其中所述部分是非适应性确定的，所述参数选自：差异图像中各像素绝对值的和；差异图像中各像素绝对值的均值；差异图像中各像素绝对值的中值；差异图像中各像素的平方值的和；差异图像中各像素的平方值的均值；差异图像中各像素的平方值数的中值；差异图像中各像素值的方差；差异图像中各像素值的标准偏差；差异图像的直方图中不同百分位的值；差异图像值最小和最大值；及差异图像直方图或自这些参数的一项或多项导出的另一参数的范围或方差。

[0117] 在一个优选的实施方案中，计算参数时没有将系列中的每一帧适应性地分割成关注区和非关注区。然而，可以非适应性地选择原始图像的一个子部分（例如通过裁剪原始图像以集中在包含胚胎的那部分）。该子部分优选在细胞群的同一时移系列的各图像之间是固定的。可以将所分析的子部分（例如包含胚胎的）与该图像的其它参比区域进行比较以校准所导出的参数。例子有比较差异图像中包含胚胎的区域的标准偏差与差异图像中空白区域类似计算得出的标准偏差。

[0118] 在有些实施方案中，从差异图像的子集计算参数。

[0119] 在一个实施方案中，从差异图像计算得出的参数选自：差异图像中各像素绝对值的和；及差异图像中各像素值的方差。在有些实施方案中，可以将其它函数应用于差异图像以计算参数。

[0120] 这些参数中每一项都是这样的一个数：它会随着成群细胞群中的变化（诸如细胞分裂）而变化，从而反映所研究的系列图像中细胞边界位置的变化的。

[0121] 在一个优选的实施方案中，所述参数是基于完整差异图像，从所述至少一幅差异图像计算的。

[0122] 如上所述，可以从差异图像中的所有像素值计算参数，诸如：

[0123] 差异图像中所有像素绝对值的均值；

[0124] 差异图像中所有像素绝对值的中值；

[0125] 差异图像中所有像素值的方差；

[0126] 差异图像中所有像素值的最大值。

[0127] 参数计算的例子有值差之平方的均值：

[0128] 均值＝（$\sum_{i=1}^{m}\sum_{j=1}^{k}D_{i,j}^{2}$）/（m·k）＝（$\sum_{i=1}^{m}\sum_{j=1}^{k}[I_n(i,j)-I_{n-1}(i,j)]^2$）/（m·k）

[0129] 其中

[0130] k 是图像的长度，

[0131] m 是图像的宽度。

[0132] 本发明依赖于如下观察结果，即细胞位置在各次细胞分裂间通常相对固定，除了每次细胞分裂前后的一个较短时间间隔之外；在该间隔中，细胞一分为二的分裂导致分裂中的细胞及周围的细胞发生程度可观的重排。此重排反映在差异图像中，其中细胞边界（即细胞膜）的位置变化导致上述所有差异图像导出参数的暂时升高，诸如绝对值均值或方差的升高。因此，可通过差异图像中所有像素绝对值的均值或者任何上文所列其它导出参数的暂时变化，即升高或降低，来检测细胞分裂。

[0133] 本发明依赖于导出参数中暂时变化的分析。特别关注参数值中显著的极值——峰或谷——的开始（onset）、大小（magnitude）和持续时间（duration）。这些极值、峰或谷常常表示细胞分裂事件，而且可以用这些事件的时刻和持续时间来表征的给定细胞群，诸如胚胎，及评估其发育潜能。每个峰的形状还可提供额外信息，而峰的大小（size）一般亦可额外其它信息。峰还可以表示卵裂球的突然破裂和并发的细胞死亡。然而，根据峰的形状和事件前后基础值的变化，有可能将细胞分裂事件与细胞死亡事件分开。

[0134] 图 1 显示了每次细胞分裂以每项导出变量中的显著峰为标志。如此，细胞分裂可通过多个导出变量中每一个的显著升高来检测，例如图 1 所示亮度方差或标准偏差。

[0135] 在一个优选的实施方案中，所述参数表现了所比较图像之间的差异。在第一个优选的实施方案中，该参数相对于另一个或多个参数保持未归一化，其中所述另一个或多个参数是通过相同计算从其它获自同一细胞群的差异图像导出的。这使得在自一个细胞群得到的参数值与自另一个细胞群得到的参数值之间进行定量比较成为可能。在第二个优选的实施方案中，所述参数未计算成或调整成 0-1 之间的归一化值。在第三个优选的实施方案中，计算得出的参数未与自相似矩阵中的值的计算相关联。

[0136] 如此，本发明提供了这样一种方法，利用该方法，有可能直接测定细胞分裂，而且有可能测定第一次细胞分裂的精确时刻。

[0137] 差异图像中变化的形状

[0138] 如上所述，本发明提供了用于确定细胞群变化的开始的方法。然而，在一个实施方案中，本发明进一步提供了用于测定关于变化的质量和 / 或数量信息的方法，因为峰形也被认为是重要的。高而尖的峰应该反映伴随最少碎裂（fragmentation）的快速细胞分裂。而较宽而不太突出的峰可反映较慢的分裂，可能伴有较多的碎裂。就对应于随后的细胞分裂的峰而言，这一点是更为重要的，因为第二个尖峰可指示从 2 个细胞变成 4 个细胞的同步细胞分裂，而较宽或甚至双峰型的峰则可指示分裂是不同步的（即 2 个细胞变成 3 个细胞，然后 3 个细胞变成 4 个细胞）。总而言之，对峰位置、高度、宽度和形状的详细分析提供了关

于某一特定分裂事件的重要信息。在此语境下,“同步”理解为所有的细胞分裂在 5 小时、更优选 3 小时、最优选 1 小时的时间跨度内发生。

[0139] 在上文中,“高”视为大于计算得出的参数的标准偏差的 2 倍、优选大于计算得出的参数的标准偏差的 3 倍、最优选大于计算得出的参数的标准偏差的 5 倍。此外,“尖”视为持续时间短于 3 小时、更优选持续时间短于 2 小时、最优选持续时间为 1 小时或更短的峰。反之,“宽”峰理解为持续时间长于 3 小时、更优选长于 5 小时、最优选持续时间长于 10 小时。

[0140] 基础水平

[0141] 在鉴定了峰之后,有可能评估各峰之间的活动的基础水平。基础水平理解为准稳定的或缓慢变化的值。此值常常定义为变化小于每小时 10%、优选小于每小时 5%、最优选小于每小时 3%的值。分裂与分裂之间每项参数的基础水平也包含有用的信息。细胞代谢与细胞器的运动(例如线粒体在细胞质中的循环)有关。这种运动反映上述数种参数的基础水平中。此背景水平给出了关于细胞群中细胞器运动——这种在细胞死亡后将会停止——的程度的重要信息。因此,观察到对应于基础水平变化的细胞器运动的部分降低,可暗示一个或多个细胞衰退等问题。通常,该变化表现为所述计算参数的基线的突然变化,指示至少一个细胞的死亡。此外,所述变化的发生常常是这样的 :所述变化是基线均值显著升高,接着突然降低。在此语境中,“突然”理解为在短于 5 小时、优选短于 2 小时、最优选短于 1 小时内的变化,“显著”升高理解为在优选短于 1 小时内超过 5%、更优选在短于 1 小时内超过 10%、最优选在短于 1 小时内超过 30%的明显增加。最后,“降低”最常见的是轻微升高接着显著降低至原始值的 m/N,其中 N 表示细胞群中的细胞数,m 是 0 到 N-1 的一个整数。

[0142] 在一个实施方案中,使用平均绝对亮度作为总活动的量度,而且各峰之间此参数的基础水平可视为胚胎发育和可能的发育潜能的指标。

[0143] 为了充分利用基础水平,可能必须将评估范围限制于细胞群的整体轮廓,并且将此区域的导出值与胚胎以外的对照区域进行比较。如此,为了建立基础水平,可能需要如文献中所述用标准图像分析规程选择胚胎的轮廓。这样的例子包括比较胚胎内的细胞运动与胚胎外的运动(因布朗运动配准问题等所致的)。这一点大多通过描绘胚胎轮廓并比较胚胎内的差异图像与胚胎外类似区域的算得差异来实现。胚胎轮廓描绘可人工进行,或者自动进行,后者通过为照片设定包含整个时移系列中所有绝对差异的和的阈值来实现。可以简单地选择其余像素作为外部区域,或者(优选地)可以通过扩张胚胎区域然后进行反向选择,省略围绕胚胎的边界像素,来选择外部区域。

[0144] 配准

[0145] 定位系统存在细微的不精确,使得时间系列中的各次图像获取之间载物台的运动不精确,导致时间系列中的连续图像不是在精确相同的位置采集的,可造成差异图像不尽完美。这些轻微的位置变化会影响差异图像,因为所有清晰的结构都会对差异图像产生光圈和阴影效果 (halo-and-shadoweffect),即使没有发生真实的运动。在一个实施方案中,对时间系列中的连续图像进行配准,例如使用已有的算法联合本发明来实现这一点,以改善导出的参数。为配准照片而建立的数种算法已有记载 (John Russ,2002)。一种非常简单的配准照片的方法是比较原始差异图像与将原始图像之一沿指定方向移动一个像素后计算得出的差异图像。若易位后计算得出的差异图像的方差小于原始差异图像的方差,则该易位产生了更好的配准。通过系统地尝试所有可能的易位方向和所有相关易位大小

(magnitude)，有可能得到配准后的系列。具体地，对于胚胎，可以关于透明带——即以降低区域对应于透明带的方差为目标——进行配准。

[0146] 图像质量的改善和假像的消除

[0147] 在又一个实施方案中，优选改善图像质量并消除假像。假像可能与以下各项有关：获取图像的光学和/或电子途径，例如照相机镜头上的尘埃/斑点、因照相机假像产生的斑点、因照相机或 CCD 误差产生的像素误差、由细胞群产生的、导致亮区的反射。

[0148] 因此，假像指图像上不是图像情景的一部分的任何展示。从而，假像可以是例如以下一项或多项：投射到图像上的不想要的物体、光学系统的散射、衍射和/或反射。

[0149] 为了补偿不精确移动而进行的易位通常会改变整个图像的位置，包括上文所述的固定位置的假像。因而，后续的差异将包括来自固定位置假像的假贡献。因此，在易位前清除固定位置的假像是重要的。可利用不同的标准技术来清除固定假像（见 John Russ，2002）。一种简单的型式是获得散焦的参比图像，并从系列中的每幅照片减去此假像图像。减去不同胚胎的数个非相关帧的平均照片可以得到类似的效果。数个散焦图像的均值是最佳的。

[0150] 此外，载物台移动中小于 1 个像素的轻微不精确难以通过易位进行连续帧的整体配准来消除或补偿。但是，即使是轻微的（小于 1 个像素）的易位亦可对差异图像产生显著贡献。高质量照片经常遇到到的另一个问题是细胞器，诸如液泡和线粒体，它们可能是部分可见的，并且赋予细胞粒状的外观。细胞群运动对差异图像的贡献可达到这样的程度，使得细胞分裂在细胞器运动的噪声中变得模糊和不太可见。通过降低图像尺寸 (size)（缩小图像）或轻微地模糊/平滑图像，可以减轻或甚至消除上述两个问题。例如，降低时间系列中所有图像的图像尺寸 (size) 使得每个胚胎的直径为 100-200 个像素是优选的做法，因为它往往可减少配准的问题并正确地聚焦于细胞分裂而非细胞器运动。最佳的缩放可能依赖于所获取的时间系列的整体质量。重要的是在消除固定位置假像和易位补偿等之后再进行上述缩放。在一个优选的实施方案中，所述缩放或分辨率降低是通过属于下组的方法进行的：重采样 (resampling)、取平均 (averaging)、平滑 (smoothing)、运行平均值 (runningaverage)、双三次插值 (bicubic interpolation)、b 样条插值、和图像矩阵的简单缩小 (simple reduction)、或本领域技术人员显而易见的其它方法。

[0151] 许多照相机系统采用在各帧之间动态缩放图像亮度的自动增益函数。优选避免这种做法。优选还避免按下述方式计算差异照片：使时间系列中的连续图像相减，然后个别地缩放这些差异图像以使用完整亮度范围，使得差异图像更易于通过人眼来评估——这是图像分析程序中通常采用的计算方法。在图像分析程序的优选设置中应当关闭此缩放。如果这样做不可能，那么定量分析应当使用不太受此假像影响的方差和标准偏差。对以相同因数从时间系列计算得出的所有差异图像进行概括的缩放是没有问题的，甚至推荐这样做以更好地显现差异图像。在一些罕见的情况下，在时间系列中连续图像之间照明不均匀，此时可能必须在计算亮度差异前对个别帧的图像亮度进行缩放。在这些情况下，定量分析应当使用不太受亮度缩放假像影响的方差和标准偏差。

[0152] 培养基

[0153] 在一个优选的实施方案中，图像获取是在细胞群的培养过程中进行的，例如其中细胞群位于培养基中。用于培养细胞群的手段是本领域已知的。培养胚胎的一个例子见

PCT 申请 No. WO 2004/056265。

[0154] 胚胎的选择或鉴定

[0155] 本发明进一步提供了选择供移植、冷冻保存或淘汰的胚胎的方法。该方法意味着已经采用如上所述的测定胚胎变化的方法对胚胎进行了监测，以确定细胞分裂是在何时发生的，并任选地确定是否发生了细胞死亡，以及确定细胞分裂的质量和胚胎的整体质量。优选的是选择细胞分裂基本上同步，从而在差异图像中产生尖极值的胚胎，更优选的是选择没有细胞死亡的胚胎。

[0156] 选择或鉴定方法可以与下文所述其它测量法联合以评估胚胎质量。胚胎形态学评估的重要标准有：(1) 胚胎的形状，包括卵裂球的数目和碎裂的程度；(2) 透明带的存在和质量；(3) 尺寸 (size)；(4) 颜色和纹理；(5) 关于胚胎的年龄（就其发育阶段而言）的所知情况；和 (6) 卵裂球膜的完整性。

[0157] 然后可通过本领域技术人员知道的任何合适方法进行移植、冷冻保存高质量胚胎或清除低质量胚胎。

[0158] 质量的确定

[0159] 细胞边界（即细胞膜）的变化的位置导致差异图像的所有上述导出参数暂时升高，诸如绝对亮度均值或方差的升高。如此，可通过差异图像中所有像素的标准偏差或从差异图像计算得出的任何其它导出参数的暂时变化，即升高或降低，来检测细胞分裂及其持续时间和相关细胞重排，诸如细胞运动性。在将本发明应用于评估胚胎时，此类参数主要被认为反映了“卵裂球活动”。这依赖于如下观察结果，即细胞位置在各次细胞分裂之间通常是相对固定的，除了每次细胞分裂前后的较短时间间隔之外——此时细胞一分为二的分裂导致分裂中的细胞及周围的细胞发生短暂但程度可观的重排。

[0160] 相应地，本发明提供了胚胎质量量度，其基于对胚胎的一项或多项测定，诸如测定至少一个细胞分裂期的长度和 / 或测定分裂间期的细胞运动和 / 或测定分裂间期细胞运动的时间段长度。此量度可用于确定胚胎是否达到足以用于移植或冷冻保存的质量，或者质量不够而加以淘汰。在一个优选的实施方案中，选择用于移植或冷冻保存的卵母细胞或胚胎是具有最高胚胎质量量度的卵母细胞或胚胎，并且 / 或者，选择加以淘汰的卵母细胞或胚胎是具有最低胚胎质量量度的卵母细胞或胚胎。

[0161] 特别关注的是细胞分裂的开始、程度 (magnitude) 和持续时间，它们可以定量为参数值的峰或谷。这些极值——峰或谷——往往表示细胞分裂事件，这些事件的时刻和持续时间被用于表征给定细胞群，诸如胚胎，及评估其发育潜能。每个峰的形状也提供额外的信息，峰的大小 (size) 一般也可以提供额外信息。峰还可以表示卵裂球的突然破裂和并发的细胞死亡。然而，根据峰的形状和事件前后基础值的变化，有可能将细胞分裂事件与细胞死亡事件区分开。

[0162] 如此，胚胎质量的量度包括关于至少一次细胞分裂的细胞分裂时间、分裂间期的时间、分裂间期中细胞运动的时间、和 / 或分裂间期中细胞运动的程度的信息。在一个优选的实施方案中，胚胎质量的量度包括关于本文所述两项或多项测定的信息。在一个更优选的实施方案中，胚胎质量的量度包括关于本文所述的所有测定的信息。

[0163] 胚胎质量的量度基于以下观察结果：

[0164] a) 突然的细胞分裂——其中细胞质的实际分裂快速进行，随之快速发生其它卵裂

球位置重排（如尖的卵裂球活动峰）——指示高质量的胚胎。长期的细胞质分裂和此后其它卵裂球的广泛重排则指示低质量的胚胎（例如宽的卵裂球活动峰）（实施例 3a）；

[0165] b) 各次细胞分裂之间的卵裂球位置重排很少指示高质量胚胎，而可见的细胞分裂之间的运动则常常指示低质量胚胎（实施例 3a）；

[0166] c) 各细胞分裂间延长的细胞位置重排（例如宽的卵裂球活动峰）常常与胚胎质量低、细胞分裂不同步和广泛的碎裂相关联（实施例 3a）；

[0167] d) 对大多数哺乳动物而言可观察到一个细胞运动很少的静止期，此时胚胎基因组被激活，且蛋白质合成由母体转录物转向胚胎转录物。若此时期：i) 开始早；ii) 活动很低（＝细胞运动少＝静止的）；和 iii) 终止早，则强有力地指示高质量胚胎。在低质量胚胎中，静止期常常延迟，且有时被细胞运动打断（实施例 3b）。在本文语境中，“早”理解为优选在受精后 30 小时之前，更优选在受精后 27 小时之前，最优选在受精后 25 小时之前。

[0168] e) 在随后停止发育的低质量胚胎中，常常观察到独特的持续静止的区域，它们持续存在且最终导致发育停滞。此类静止区域可能与广泛碎裂或卵裂球死亡和溶解相关联。如果这些区域在给定的发育阶段大于给定的百分比，那么胚胎存活的可能性极低。此百分比在一种情况下是至少 15％，在另一种情况下是至少 35％，其中预计这些百分比是物种特异性的。在高质量胚胎中，在每次细胞质分裂事件后不久继发的细胞运动性最初分布在整个胚胎表面上（即所有卵裂球均轻微运动），只有在桑椹胚阶段中的紧密化之后才见到局部化的运动（实施例 3c）；

[0169] f) 不同时间间隔中细胞运动的量是胚胎质量的良好指示物，其中合适的时间间隔预计是物种特异性的。可以从不同时间－分区中平均运动的比率和／或不同时间－分区中标准偏差的比率计算得出质量相关参数。可以基于这些参数的值来建立胚胎选择程序（实施例 3d）；

[0170] g) 若第一次细胞分裂的极早开始，则指示高胚胎质量。若第一次（和后续）细胞分裂很晚开始，则指示低质量胚胎。然而，对于大多数胚胎而言，确切的第一次细胞分裂的开始并不能单独提供胚胎质量的清楚指示（实施例 3d）；

[0171] h) 后续阶段中的同步化细胞分裂（例如 2 → 4、4 → 8）大多见于高质量胚胎，而不同步的细胞分裂常常见于低质量胚胎（例如 2 → 3 → 4 → 5 → 6 → 7 → 8）（实施例 3a）。

[0172] 以下测定结果指向最高的胚胎质量量度：

[0173] • 细胞分裂期短，其中“短”定义为少于 1 小时；

[0174] • 分裂间期中几乎没有细胞运动，其中“几乎没有”定义为在通常的剥夺 (fluctuation) 和细胞器运动（它们总是对差异图像有贡献）之外，细胞位置几乎没有变化。“几乎没有细胞运动”暗示细胞重心是固定的（运动＜ 3μm），而且细胞质膜是大体上静止的（＜ 3μm）。

[0175] • 第一次细胞分裂期开始早，即在受精后 25 小时之前（对于人类胚胎）或在受精后 30 小时之前（对于牛胚胎）。

[0176] • 分裂间期中的细胞运动期短，其中“短”定义为少于 3 小时；

[0177] • 在一段时间内胚胎内细胞运动分布均匀，即在胚胎中不存在较长一段时期（即＞ 24 小时）没有观察到细胞运动的不活动区域／地带／体积。此类不活动地带可能是由于死亡或濒死的卵裂球和碎片所致，它们可阻止进一步的发育。

[0178] 可以使用神经网络或其它定量模式识别算法来评估上文所述复杂细胞运动性模式。这样的网络可用于找出质量最好的胚胎供 IVF 治疗中的转移用。

[0179] 其它量度

[0180] 确定胚胎质量时的第一个分析步骤可以包括将所作的观察与对不同质量和发育能力的胚胎所作的类似观察相比较，以及比较给定胚胎的参数值与对同一胚胎所做的其它定量量度。这可以包括与卵裂球运动性、呼吸速率、氨基酸摄取等在线量度的比较。卵裂球运动性分析、呼吸速率和其它定量参数的联合数据集有可能改进胚胎选择，为胚胎学家选择最好的转移用胚胎提供可靠的保证。

[0181] 如此，在一个实施方案中，本发明的方法可以与其它量度结合起来评估所讨论的胚胎，而且可用于选择转移给接受者的合格胚胎。

[0182] 所述其它量度可选自：呼吸速率、氨基酸摄取、运动性分析、卵裂球运动性、形态学、卵裂球大小 (size)、卵裂球成粒 (granulation)、碎裂、卵裂球颜色、极体取向、成核、纺锤体形成和完整性、及许多其它定性量度。呼吸量度可以如 PCT 申请 No.WO 2004/056265 所述进行。

[0183] 数据载体

[0184] 本发明进一步涉及一种数据载体，其包含可直接加载于数字处理装置的存储器中的计算机程序，且包含构成用于如上所述执行本发明方法的手段的计算机代码部分。

[0185] 数据载体可以是磁盘或光盘，或者是 EEPROM 或 Flash 类型的电子卡的形状，而且设计成装载到已有的数字处理部件中。

[0186] 实施例

[0187] 实施例 1：ImageJ 所实现的基础程序

[0188] 图像程序 ImageJ 使用此程序的宏语言实现了上文概述的基础算法。ImageJ 是由 NIH(National Institute of Health,MD,USA) 的 Wayne Rasband 开发的公用域免费软件。它可以自站点：http://rsb.info.nih.gov/ij/ 免费获得。

[0189] 图 2 是计算过程中该程序的图形输出的一个例子，即用于依照本发明的算法分析这些图像的 ImageJ 宏源代码表。

[0190]

```
macro "1-Open image series" {


    // Check conditions

    requires("1.33r");


    // Open image and make selection

    run("Image Sequence...");

     makeRectangle(100, 100, 150, 150);


    //print experiment parameters to log

    print("----------------------");

    print(" Experiment parameters");
```

[0191]

```
        print("---------------------");
        print('');
        print('nImages: '+nImages);
        print('nSlices: '+nSlices);
    }
    //-------------------------------------------------

    macro "2-Crop" {

        // Check conditions
        requires("1.33r");
        if (nSlices==1)
            exit("Stack required");
        if (selectionType==-1)
            exit("Make selection first");

        doCommand('Crop');
    }
    //-------------------------------------------------

    macro "3-Difference stack" {

        // Check conditions
        requires("1.33r");
        saveSettings();
```

[0192]

```
if (nSlices==1)
     exit("Stack required");

//start settings
run("Conversions...", " ");

//make difference stack
run("Duplicate...", "title=Stack-copy duplicate");
run("Delete Slice");
setSlice(nSlices);
run("Add Slice");
setSlice(1);
run("Image Calculator...", "image1=Stack operation=Subtract
image2=Stack-copy create stack");
selectWindow("Stack-copy");
run("Close");

//make oval selection
selectWindow("Result");
setTool(1);
makeOval(30, 30, 90, 90);

//clean up
restoreSettings();
```

[0193]

```
}

//-------------------------------------------------

macro "4-Measure movement and annotate" {

    // Check conditions
    requires("1.33r");
    saveSettings();
    if (nSlices==1)
        exit("Stack required");
    if (selectionType==-1)
        exit("Make selection first");

    //print experiment parameters to log
    starttime=getNumber("Start time? (hrs)",24);
    print("");
    print("Start time " + starttime + " hrs");
    interval=getNumber("Interval? (hrs)",2);
    print("");
    print("Interval " + interval + "hrs");
    gray=getNumber("Gray? [Black=0, white=255]",255);

    //start settings
    setColor(gray, gray, gray);
    setFont("SansSerif", 12);
```

[0194]

```
        run("Set Measurements...", "  mean standard modal min redirect=None
    decimal=3");
        run("Clear Results");

        //measure
        for (i=1; i<=nSlices; i++){
            setSlice(i);
            run("Measure");
            integer=floor(starttime +(i-1)*interval+0.01);
            decimal=round(10*(starttime + (i-1)*interval))-integer*10;
            setJustification("left");
            drawString("Time ",10,20);
            setJustification("right");
            drawString(integer + "." + decimal + " hr",90,20);}
        for (i=0; i<=nSlices-1; i++){
            setResult("Time",i,starttime + i*interval);}
        updateResults();

        //Find variables to plot
        xValues=newArray(nSlices);
         yValues=newArray(nSlices);
         zValues=newArray(nSlices);
        for (i=0; i<nSlices; i++){
            xValues[i] = getResult("Time",i);
            yValues[i] = getResult("Mean",i);
```

[0195]

```
                zValues[i] = getResult("StdDev",i);}


            //Generate Plot
            Plot.create("Movement", "Time", "Mean");
            Plot.setLimits(starttime, xValues[nSlices-1], 0, 25);
            Plot.setLineWidth(1);
            Plot.setColor("red");
            Plot.add("line", xValues, yValues);
            Plot.add("circles", xValues, yValues);
            Plot.setColor("green");
            Plot.add("line", xValues, zValues);
            Plot.add("circles", xValues, zValues);
            Plot.show();


            //save results
            selectWindow("Results");
            run("Text..."); // File>Save As>Text


            //clean up
            restoreSettings();
        }
        //-------------------------------------------------
        macro "-" {}


        //    macro "Sample Tool - C0a0L18f8L818f" {
```

[0196]

```
//       getCursorLoc(x, y, z, flags);
//       print("Sample: "+x+" "+y);
//    }

//-------------------------------------------------

macro "Annotate" {

     // Check conditions
     requires("1.33r");
     saveSettings();
     if (nSlices==1)
          exit("Stack required");

     //print experiment parameters to log
     starttime=getNumber("Start time? (hrs)",24);
     print("");
     print("Start time " + starttime + " hrs");
     interval=getNumber("Interval? (hrs)",2);
     print("");
     print("Interval " + interval + "hrs");
     gray=getNumber("Gray? [Black=0, white=255]",255);

     //start annotation
     setColor(gray, gray, gray);
```

[0197]

```
        setFont("SansSerif", 12);


        for (i=1; i<=nSlices; i++){
            setSlice(i);
            integer=floor(starttime + i*interval+0.01);
            decimal=round(10*(starttime + i*interval))-integer*10;
            setJustification("left");
            drawString("Time ",10,20);
            setJustification("right");
            drawString(integer + "." + decimal + " hr",90,20);}


        //clean up
        restoreSettings();

    }
```

[0198] 材料和方法

[0199] 从来自屠宰场的卵巢吸出牛的未成熟丘-卵母细胞复合体(COC),选择,并在4孔平皿(Nunc,Roskilde,Denmark)中成熟24小时。每个孔装有400μL碳酸氢盐缓冲的TCM-199培养基(Gibco BRL,Paisley,UK),添加15%牛血清(CS;Danish Veterinary Institute,Frederiksberg,Denmark)、10IU/mL eCG和5IU/mLhCG(Suigonan Vet;Intervet Scandinavia,Skovlunde,Denmark)。将胚胎在矿物油下、于38.5℃、在5% CO_2中、在潮湿空气中成熟。在改良的Tyrode氏培养基中使用冻融的、Percoll选择的精子进行受精。22小时后,通过旋涡震荡除去丘细胞,并将假定的合子转移至400μL培养基,培养基组成为含氨基酸、柠檬酸盐和肌醇的合成输卵管液培养基(SOFaaci),并补充了抗生素(硫酸庆大霉素,10mg/ml)和5% CS,并于38.5℃在5% CO_2、5% O_2、90% N_2气氛中以最大湿度温育。

[0200] 培养箱系统以前就有详细描述,而且已经证明适于体外胚胎培养(Holm et al.,1998)。简而言之,将4孔培养板放置在Nikon TMD倒置显微镜(Diaphot,DFA A/S,Copenhagen,Denmark)的显微镜载物台(MultiControl 2000 Scanning stage,Marzhauser,Germany)上。将受空气温度控制器(Air-ThermTM,World Precision Instruments,Aston,UK)调节的黑色聚甲基丙烯酸甲酯有机玻璃(plexiglas)培养盒(incubator box)安置在载物台周围。将开底的塑料盖子放置在培养皿上,并将潮湿的混合空气在通过置于培养盒内的空气清洗瓶后通入此半闭培养室。

[0201] 此培养盒先前已经证明了可用于体外胚胎培养 (Holm et al.,1998,2003),提供稳定的温度和湿度条件。以实验期间我们每周例行的体外胚胎制备作为基础培养系统的完整性对照。

[0202] 照相机系统

[0203] 时移记录由图像分析软件 (ImagePro™, Unit One,Birkerød,Denmark) 管理,该软件所控制的有 :扫描平台沿 x、y 和 z 轴的移动,相连的高光敏视频摄像机 (WAT-902H, Watec,DFAA/S,Copenhagen,Denmark) 的操作,及时移序列在计算机硬盘上的记录和存储。在整个培养期间以 20 分钟为间隔在最小光照下顺序记录每个胚胎的图像 (总放大倍数 : x265)。在各次记录之间将胚胎移出光场。

[0204] 记录第一次出现以下分裂 / 胚胎阶段的时间 :对于焦点对准的、有可识别的卵裂球的合子,记录 2- 和 3-4 细胞阶段 ;对于有可见的粘结细胞团的桑椹胚和胚泡,记录最大紧密化桑椹胚、胚泡的第一次扩大、和胚泡的瓦解。

[0205] 图 3-5 显示了各图像的数据系列和活动曲线图 (activity profile) 形式的分析结果。

[0206] 实施例 2 :对饲养细胞单层上生长的干细胞中细胞分裂定量的理论例

[0207] 本发明还可用于检测和定量汇合细胞层中每单位时间单位面积 (per area) 中的分裂次数 (或在饲养细胞汇合层上生长的干细胞中的细胞分裂次数)。在细胞边界轮廓不清楚,使得细胞个体的检测、划分和计数难以进行时,本发明是特别有用的。然而,由于细胞分裂将伴随着运动,本发明的运动分析很可能反映细胞分裂诱发的运动性,只要其它细胞是保持静止的。如此,在不能辨别细胞个体的情况下,可通过本发明描绘的方法来实现对细胞分裂的分析。若细胞分裂是罕见事件,因而很少同时发生于图像的不同部分,则该方法将取得较好的效果。在这样的情况下,整个照片的导出参数的孤立峰 (isolated peak) 将与细胞分裂相关联。然而,在许多情况下,细胞分裂发生得更为频繁,在图像的不同部分总会发生某些运动。那么,一种简单的解决办法是将图像分割成较小部分 (例如 2x2、3x3、或 4x4 等),使得每个部分中细胞分裂的发生相对较不频繁。使用本发明分别分析每个部分的时间系列,将整个照片的结果相加。

[0208] 使用假设数据、例示原理的理论例见图 6。在此假想例中,以 60 个小时的时间,每 20 分钟获取汇合细胞培养物的图像。通过计算差异图像并计算每幅差异图像的方差来分析时移图像系列。然而,因为研究区域中细胞分裂的次数相对较多 (即 9),整个照片的方差 (上图,空心符号) 不易判读。然而,如果将图像分成四个四分区并分别分析每个四分区,那么每个四分区在所分析的时间跨度里具有 1-3 次细胞分裂,这在各个方差图中得到清楚的描绘 (下图,实心符号)。对每个四分区中清楚限定的峰计数,可得到整个区域的细胞分裂总次数,即 60 小时里有 9 次分裂。

[0209] 此假设例例示了理想的情形,其中细胞分裂不是沿着两个分区的边界发生的,而且没有单次分裂事件的重复计数。然而,如果两个相邻四分区中的所得峰低于阈值,边界处的细胞分裂也可能被忽略。这样,边缘效应是否会引起真实值的高估或低估,是否会清楚地呈现有用的近似,是不清楚的。

[0210] 实施例 3 :测定细胞群的质量 :胚胎质量评估

[0211] 已经发现有可能基于所观察到的细胞分裂和相关细胞运动的时刻、持续时间和程

度来确定供体外受精 (IVF) 后植入的最佳胚胎。

[0212] 相应地，第一个目标是通过执行如下方法来确定胚胎质量：该方法包括使用上文所述的测定细胞群变化的方法监测胚胎一段时期，所述时期的长度足以包含至少一个细胞分裂期和分裂间期的至少一部分，并测定至少一次细胞分裂期的长度和 / 或测定分裂间期中的细胞运动和 / 或测定分裂间期中细胞运动时期的长度，由此获得胚胎质量量度。

[0213] 然后，可以将所得到的胚胎质量量度用于鉴定和选择适于移植到女性或雌性子宫中的胚胎，从而实现怀孕和活产婴儿。

[0214] 如此，第二个目标是通过执行上文定义的方法，为在信息充分的条件下选择为适于移植的胚胎提供可能；所述方法包括监测胚胎，获得胚胎质量量度，并选择具有最高胚胎质量量度的胚胎。

[0215] 实施例 3a：实验、观察结果、分析和讨论

[0216] 材料和方法

[0217] 从来自屠宰场的卵巢吸出牛的未成熟丘 - 卵母细胞复合体 (COC)，选择，并在 4 孔板 (Nunc，Roskilde，Denmark) 中成熟 24 小时。每个孔装有 400μL 碳酸氢盐缓冲的 TCM-199 培养基 (Gibco BRL1 Paisley，UK)，添加 15％牛血清 (CS；Danish Veterinary Institute，Frederiksberg，Denmark)、10IU/mL eCG 和 5IU/mLhCG(Suigonan Vet；Intervet Scandinavia，Skovlunde，Denmark)。将胚胎在矿物油下、于 38.5℃、在 5％ CO_2 中、在潮湿空气中成熟。在改良的 Tyrode 氏培养基中使用冻融的、Percoll 选择的精子进行受精。22 小时后，通过旋涡震荡除去丘细胞，并将假定的合子转移至 400μL 培养基，培养基组成为含有氨基酸、柠檬酸盐和肌醇的合成输卵管液培养基 (SOFaaci)，补充抗生素 (硫酸庆大霉素，10mg/ml) 和 5％ CS，并于 38.5℃在 5％ CO_2、5％ O_2、90％ N_2 气氛中以最大湿度温育。

[0218] 培养箱系统以前就有详细描述，而且已经证明适于体外胚胎培养 (Holm et al.1998)。简而言之，将 4 孔培养板放置在 Nikon TMD 倒置显微镜 (Diaphot，DFA A/S，Copenhagen，Denmark) 的显微镜载物台 (MultiControl 2000 Scanning stage，Marzhauser，Germany) 上。将受空气温度控制器 (Air-Therm™，World PrecisionInstruments，Aston，UK) 调节的黑色聚甲基丙烯酸甲酯有机玻璃培养盒安置在载物台周围。将开底的塑料盖子放置在培养皿上，并将潮湿的混合空气在通过置于培养盒内的空气清洗瓶后通入此半闭培养室。

[0219] 此培养箱体先前已经证明了可用于体外胚胎培养 (Holm et al.1998，2003)，提供稳定的温度和湿度条件。以实验期间我们每周例行的体外胚胎制备作为基础培养系统的完整性对照。

[0220] 照相机系统

[0221] 时移记录由图像分析软件 (ImagePro™，Unit One，Birkerød，Denmark) 管理，该软件所控制的有：扫描平台沿 x、y 和 z 轴的移动，相连的高光敏视频摄像机 (WAT-902H，Watec，DFAA/S，Copenhagen，Denmark) 的操作，及时移序列在计算机硬盘上的记录和存储。在整个 7 天培养期间以 30 分钟为间隔在最小光照下中顺序记录每个胚胎的时移图像 (总放大倍数：x265)。在各次记录之间将胚胎移出光场。

[0222] 时移系列图像的人工分析包括记录第一次出现以下分裂 / 胚胎阶段的时间：2 细胞、4 细胞、8 细胞、16 细胞，而且对于有可见的粘结细胞团的桑椹胚和胚泡，记录最大紧密

化桑椹胚、胚泡的第一次扩大、胚泡的瓦解、和胚泡的孵化。

[0223] 自动化的基于计算机的分析包括计算作为两幅之间的差异计算得出的差异图像的标准偏差。为了避免配准假像和其它问题，使用如下所述的详尽程序：

[0224] 1) 图像获取（见上文描述）；

[0225] 2) 消除固定位置假像（照相机尘埃），通过从系列中的每幅照片减去假像的散焦参比图像；

[0226] 3) 易位以补偿不精确的载物台移动。一种非常简单的配准照片的方法是比较原始差异图像与将原始图像之一沿指定方向移动一个像素后算出的差异图像。若易位后计算得出的差异图像的方差小于原始差异图像的方差，则该易位产生了更好的配准。通过系统地尝试所有可能的易位方向和所有相关的易位大小 / 程度 (magnitude)，有可能得到配准的时间系列。然而，在本案中我们使用 Thevenaz et al.，1998. 开发的高级 ImageJ 宏进行图像配准。

[0227] 4) 鉴定关注区 (ROI) 和外部参比区域。比较胚胎内的细胞运动与胚胎外的“运动”（因布朗运动配准问题等所致）是有利的。这是通过描绘胚胎轮廓并比较胚胎内的差异图像与胚胎外类似区域中计算得到的差异来实现的。描绘胚胎轮廓是人工进行的。我们所选择的参比区域是图像是不含任何胚胎的区域；

[0228] 5) 计算亮度差异；

[0229] 6) 计算每幅差异图像的导出参数。计算了数项差异参数，但被证明是最具信息性的一项参数是差异图像中所有像素的亮度的标准偏差。此参数在下文及后续实施例中称为“卵裂球活动”；

[0230] 7) 鉴定并确定卵裂球活动的峰的形状；

[0231] 8) 计算卵裂球活动在具有诊断相关性的时间间隔中的标准偏差和平均值。

[0232] 见实施例 3d。

[0233] 实验设计

[0234] 将大约 20 枚牛胚胎在 4 孔 Nunc Ⅲ的一个孔中一起温育 7 天，每 30 分钟获取图像。此实验总共重复 5 次，得到了 99 枚牛胚胎的时移系列图像。

[0235] 结果

[0236] 基于发育中的胚胎的时移图像系列的定性评估（主要是通过观看，播放录相多次，注意变化），我们观察到：高质量胚胎的指示现象之一是突然的细胞分裂，其中细胞质快速地发生实际分裂，随之其它卵裂球位置发生快速的重排，接着是一段细胞位置重排很少的“静止”期，直到突然发生下一次细胞质分裂。低质量胚胎常常在细胞质分裂后和细胞质细胞分裂之间显示长时间的卵裂球位置重排。为了定量和记录观察结果，我们根据时移系列图像计算了卵裂球活动。

[0237] 图 7 分别显示了一个“好”胚胎和一个“差”胚胎的代表性卵裂球活动。被视为“好”的胚胎发育成孵化中的胚泡，而被视为“差”的胚胎从未发育成胚泡。

[0238] 有些观察到的活动是由于不同步的细胞分裂（例如 2 → 3 → 4 → 5 → 6 → 7 → 8）和碎裂，而非对高质量胚胎观察到的同步细胞分裂（例如 2 → 4、4 → 8）所致。在图 8 中，以假凝胶图像的形式展示了 41 枚胚胎的卵裂球活动，其中运动性峰以暗带表示，而无活动为白色，每条道对应于一个胚胎。暗带图样或拖尾反映胚胎内的细胞运动期。正在发育成

胚泡的“好”胚胎显示在未发育到胚泡阶段的“差”胚胎的上面。好胚胎显示更尖的起始带（通常是三条）。

[0239] 实施例 3b :实验、观察结果、分析和讨论

[0240] 材料和方法

[0241] 与实施例 3a 相同。

[0242] 结果

[0243] 哺乳动物胚胎中的初始蛋白质合成是利用来自卵母细胞的母体 mRNA，但经过少数几次细胞分裂后，胚胎基因组被激活、转录和翻译。由母体基因组转向胚胎基因组是胚胎发育中的关键步骤。对于牛，该时期发生在 8 细胞阶段，而且持续时间较长 ；对于人类胚胎，该转换发生得更早，在 4 至 8 细胞阶段，而且持续时间较短。

[0244] 对于大多数哺乳动物，在胚胎基因组激活且蛋白质合成由母体基因转向胚胎基因时，观察到一个细胞运动极少的静止期。若此时期 :i) 开始早 ；ii) 活动很低（＝细胞运动少＝静止）；且 iii) 终止早，则强有力地指示高质量胚胎。在低质量胚胎中，静止期常常被延迟，有时被细胞运动打断。图 9 显示了一个这样的例子，其中 13 枚不同胚胎显示实施例 3a 定义的卵裂球活动。暗带图样或拖尾反映胚胎内的细胞运动期。正在发育成胚泡的“好”胚胎显示在未发育到胚泡阶段的“差”胚胎的上面。好胚胎显示更尖的起始带（通常是三条）。

[0245] 实施例 3c :实验、观察结果、分析和讨论

[0246] 材料和方法

[0247] 与实施例 3a 相同。

[0248] 结果

[0249] 在随后停止发育的低质量胚胎中，常常观察到独特且持续静止的区域，它们持续存在且最终导致发育停滞。此类静止区域可能与广泛碎裂或卵裂球死亡和溶解相关联。如果这些区域在给定的发育阶段大于给定的百分比，那么胚胎存活的可能性极低。。在高质量胚胎中，在每次细胞质分裂事件后不久继发的细胞运动性最初分布在整个胚胎表面上（即所有卵裂球均轻微运动），只有在桑椹胚阶段中的紧密化后才见到局部化的运动。

[0250] 发育成胚泡的胚胎，如图 10 的左图，具有均匀的卵裂球活动分布（实施例 3a 限定的）。卵裂球活动分布不均匀的胚胎，如图 10 的右图，从未发育成胚泡。

[0251] 实施例 3d :实验、观察结果、分析和讨论

[0252] 材料和方法

[0253] 与实施例 3a 相同。

[0254] 结果

[0255] 不同时间间隔中细胞运动的量是胚胎质量的良好指示物。可以从不同时间 - 分区中平均运动的比率和 / 或不同时间 - 分区中标准偏差的比率计算得出质量相关参数。可以基于这些参数的值来建立胚胎选择程序。不同分区（＝部分）的例子见图 11 和图 12。在本案中，第 1 部分是受精后 32-60 小时，第二部分是受精后 60-75 小时，第 3 部分是受精后 75-96 小时的时间区段。

[0256] 基于不同部分中的平均卵裂球活动和 / 或卵裂球活动的标准偏差（实施例 3a 定义的），有可能将胚胎归类。

[0257] 在本案中，我们使用了基于以下各项的选择标准：

[0258] •R1 ＝给定胚胎的胚泡活动模式的第 1 部分中的平均胚泡活动与第 3 部分中平均胚泡活动之间的比率

[0259] •R2 ＝给定胚胎的胚泡活动模式的第 2 部分与第 3 部分的胚泡活动的标准偏差之间的比率

[0260] 计算见图 13。

[0261] 若 R1 ＜ 1.15 且 R2 ＜ 0.50，则它是“好的”胚胎，否则，它是“差的”胚胎。根据后续发育情况，39 枚胚胎中有 36 枚使用这些标准得到了正确的归类。

[0262] 实施例 3e：实验、观察结果、分析和讨论

[0263] 材料和方法

[0264] 与实施例 3a 相同。

[0265] 结果

[0266] 图 14 显示了对细胞分裂起始的自动确定与人工确定之间优良的相应性。

[0267] 第一次细胞分裂的很早开始指示高胚胎质量。第一次（和后续）细胞分裂很晚开始指示低质量胚胎。然而，对于大多数胚胎，然而，对于大多数胚胎而言，确切的第一次细胞分裂的开始并不能单独提供胚胎质量的清楚指示，见图 15。

[0268] 尽管差胚胎细胞分裂的平均开始延迟，但巨大的固有标准偏差使得绝对值作为选择标准是较差的，除了极值情况下之外。例如第一次分裂在 30 小时内指示好胚胎，第一次分裂在 35 小时后指示差胚胎，但是所研究的绝大多数牛胚胎的分裂时间处于中间，不易判读。

[0269] 文献

[0270] 论文

[0271] Belien JAM, Baak JPA, Van Diest PJ and Van Ginkel AHM(1997)Counting mitoses by image processing in fe υ lgen stained breast cancer sections:The influence of resolu-tion.Cytometry 28:135-140

[0272] Bhattacharya S and Templeton A(2004).What is the most relevant standard of success in assisted reproduction? Redefining success in the context of elective single embryo transfer:evidence,intuition and financial reality.Human reproduction page 1-4

[0273] Bos-Mikich A, Mattos ALG and Ferrari AN(2001)Early cleavage of human embryos;an effective method for predicting successful IVF/ICSI outcome.Hum Reprod 16,2658-2661.

[0274] Curl CL, Harris T, Harris PJ, Allman BE, Bellair CJ, Stewart AG and Delbridge LMD(2004)Quantitative phase microscopy:a new tool for measurement of cellculture growth and confluency in situ.Pflugers Arch-Eur J Physiol 448:462-468

[0275] Eccles BA and Klevecz RR(1986)Automatic digital image analysis foridentification of mitotic cells in synchronous mammalian cell cultures. Pubmed,anal quant cytol histol 8:138-47

[0276] Fenwick J, Platteau P, Mucdoch AP and Herbert M(2002)Time from insemination to first cleavage predicts developmental competence of humanpreimplantation embryos in vitro.Hum reprod 17,407-412

[0277] Grisart B,Massip a and Dessy F(1994)Cinematographic analysis of bovine embryo development in serum-free oviduct-conditioned medium.Pubmed, J.Reprod fertile 101(2) :257-64

[0278] Haney S.M,Thompson PM,Cloughesy TF,Alger JR and Toga AW(2001)Tracking tumor growth rates in Patients with Malignant gliomas:A test of two algorithms. AJNR An J Neuroradiol 22 :73-82

[0279] Christina Hnida(2004)Computer-assisted,multilevel,morphometry analysis of bio-markers of embryonic quality.PhD thesis,University of Copenhagen Holm P, Booth PJ and Callesen H(2002)Kinetics of early in vitro development of bovine in vivo-and in vitro-derived zygotes produced and/or cultured in chemically defined or serum-containing media.Reproduction 123 :553-565

[0280] Holm P, Booth PJ and Callesen H(2003)Developmental kinetics of bovine nuclear transfer and parthenogenetic embryos.Cloning and stem cell Vol 5number 2

[0281] Holm P, Shukri NN, Vajta G, Booth P, Bendixen C and Callesen H(1998) Developmental kinetics of the first cell cycles of bovine in vitro producedembryos in relation to their in vitro viability and sex.Theriogenology 50 :1285-1299

[0282] Lundin K,Bergh C and Harderson T(2001)Early embryo cleavage is a strong indicator of embryo quality in human IVF.Hum Reprod 16,2652-2657

[0283] Majerus V, Lequarre AS, Ferguson EM, Kaidi S, Massip A, Dessy F and Donnay I(2000)Characterization of embryos derived from calf oocytes:Kinetics of cleavage, cell allocation to Inner cell mass, and trophectoderm and lipid metabolism.Molecular reproduction and development 57 :346-352

[0284] Motosugi N, Bauer T, Polanski Zbigniew, Solter D and Hiiragi T(2005) Polarity of the mouse embryo is established at blastocyst and is not prepatterned.Genes &development 19 :1081-1092-

[0285] Oberholzer M, Ostreicher M, Christen H and Bruhlmann M(1996)Methods in quantitative image analysis.Pubmed,histochem cell boil 105 :333-55

[0286] Petersen CG,Mauri AL,Ferreira R,Baruffi RLR and Franco Jr JG(2001).

[0287] Embryo selection by the first cleavage parameter between 25 and 27 hours after ICSI.J Assist Reprod Genet 18,209-212

[0288] Sakkas D, Percival G, D′ arcy Y, Sharif K and Af nan M(2001)Assessment of early cleaving in vitro fertilized human embryos at the 2-cell stage before transfer improves embryo selection.Fertil Steril 76,1150-1156

[0289] Sakkas D, Shoukir Y, Chardonnens D, Bianchi PG and Campana A(1998)Early cleavage of human embryos to the two-cell stage after intracytoplasmic sperm

injection as an indicator of embryo viability.Hum Reprod 13,182-187

[0290] Salumets A,Hyden-Granskog C,Suikkari A-M,Tiitinen A and Tuuri T(2002) The predictive value of pronuclear morphology of zygotes in the assessment of human embryo quality.Hum Reprod 16,2177-2181

[0291] Shoukir Y,Campana A,Farley T and Sakkas D(1997)Early cleavage of in-vitro fertil-ized embryos to the 2-cell stage:a novel indicator of embryo quality and viability.Hum Reprod 12,1531-1536

[0292] Vayena E,Rowe PJ and Griffin PD(2001)Current practices and controversies in assisted reproduction:Report of a meeting on" Medical,Ethical and Social aspects of assisted reproduction " held at WHO headquarters in Geneva,Switzerland.

[0293] Windt M-L,Krueger TF,Coetzee K and Lombard CJ(2004)Comparative analysis of pregnancy rates after the transfer of early dividing embryos versus slower dividing embryos.Hum Reprod Vol 19 No 5 pp 1155-1162

[0294] 书籍

[0295] John C Russ(2002J The Image Processing Handbook,CRC press,4 ′ th Edition

[0296] ISBN:084931142X

[0297] 专利

[0298] Bongiovanni Kevin Paul,Audi Paul Patrick,Forth Christophers,McPhillips Kenneth(24/02/2005)Automatic target detection and motion analysis form image data.US2005041102

[0299] Cecchi Michael D,Mezezi Monica(24/07/2003)Biological specimen-culturing system and method with onboard specimen development sensors.US2003138942Garankani Arman M.,Hack,Andrew A.,Roberts Peter,Walter,Sean(13/02/2003)

[0300] Method and apparatus for acquisition,compression,and characterization of spatiotem-poral signals.US20030185450

[0301] Iwasaki Masahiro,Imagawa Taro(28/04/2005)Monitoring device. WO2005039181

[0302] Myers James Carrol(25/06/2004)A method of searching recorded digital video for areas of activity MXA03003268,US6434320(B1)

[0303] Klevecz Robert R.,Eccles Beverly A.(09/02/1988)Method and apparatus for automatic digital image analysis.US4724543

[0304] Tago Akira,Tsujii Osamu(18/05/2005)Radiographic image processing method and apparatus.EP1531422

[0305] 产品

[0306] EmbryoGuard:显微时移质量保证(Microscopic Time-Lapse and qualityassurance)。IMT international,Chester(England) 所 售 产 品 (http://www.cryo-imt.com/

embryoguard.htm)FertiMorph. 胚胎形态学分析软件。使用从胚胎的不同位置记录的3D图像堆进行定量胚胎形态学测量和评分。Image House Medical(Copenhagen,Denmark) 所售产品 (http://www.ihmedical.com/products.aspx？ id ＝ fmorph-po)

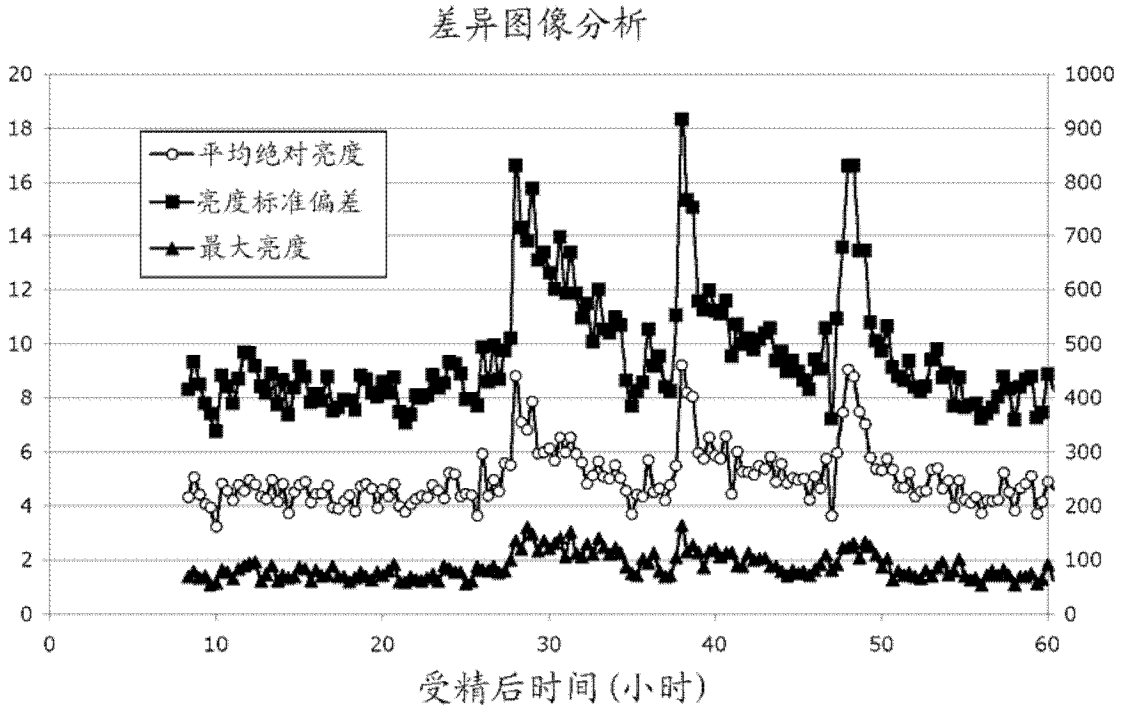

差异图像分析
平均绝对亮度
亮度标准偏差
最大亮度
20
18
16
14
12
10
8
6
4
2
0
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0
10
20
30
40
50
60
受精后时间(小时)

图 1

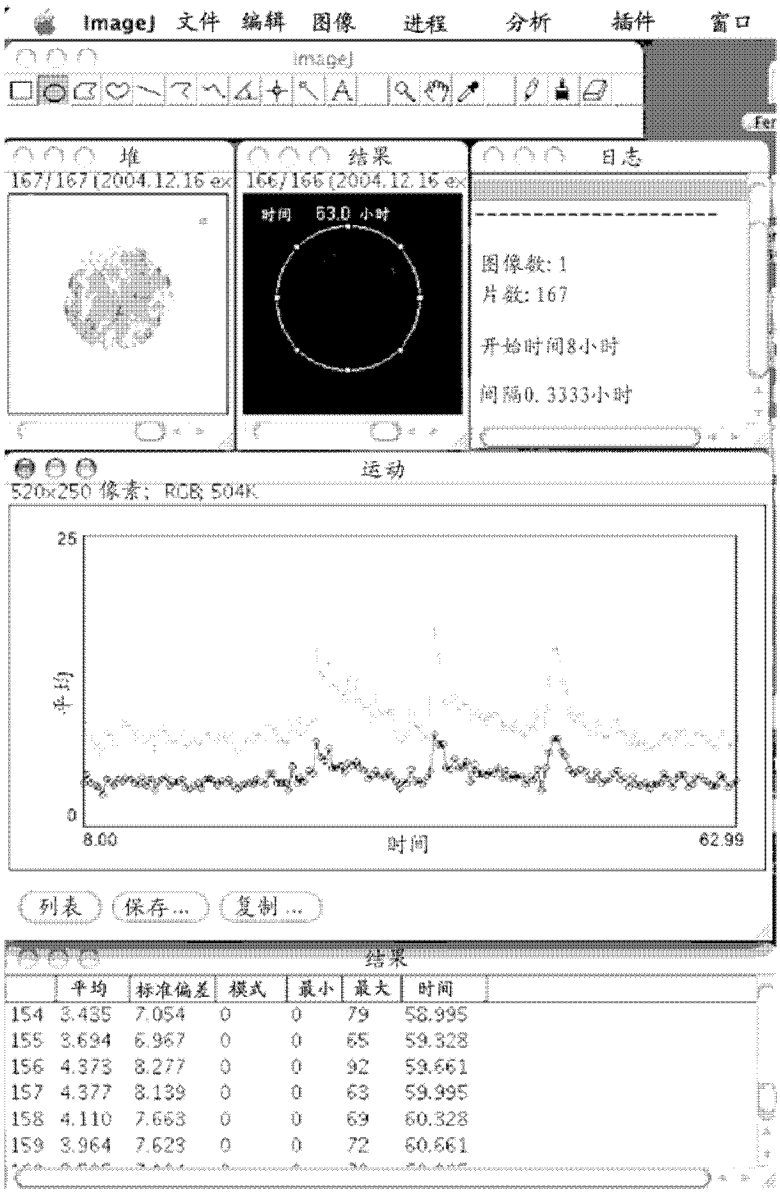

ImageJ 文件 编辑 图像 进程 分析 插件 窗口
ImageJ
堆
167/167 (2004.12.16 ex
结果
166/166 (2004.12.16 ex
时间 63.0 小时
日志
图像数: 1
片数: 167
开始时间8小时
间隔0.3333小时
运动
520x250 像素; RGB; 504K
25
平均
0
8.00
时间
62.99
列表
保存...
复制...
结果
平均 标准偏差 模式 最小 最大 时间
154 3.435 7.054 0 0 79 58.995
155 3.694 6.967 0 0 65 59.328
156 4.373 8.277 0 0 92 59.661
157 4.377 8.139 0 0 63 59.995
158 4.110 7.663 0 0 69 60.328
159 3.964 7.623 0 0 72 60.661

图 2

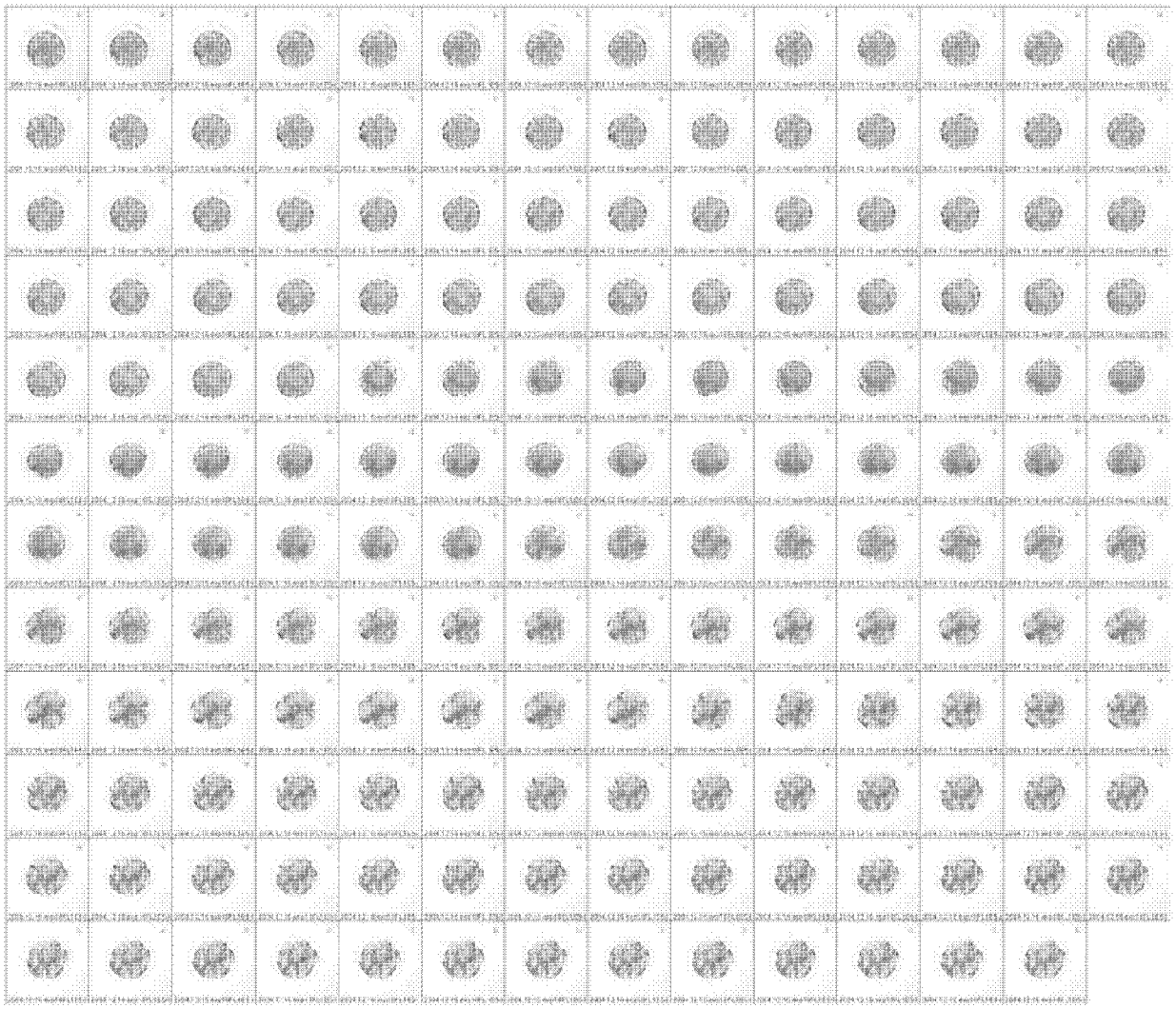


图 3

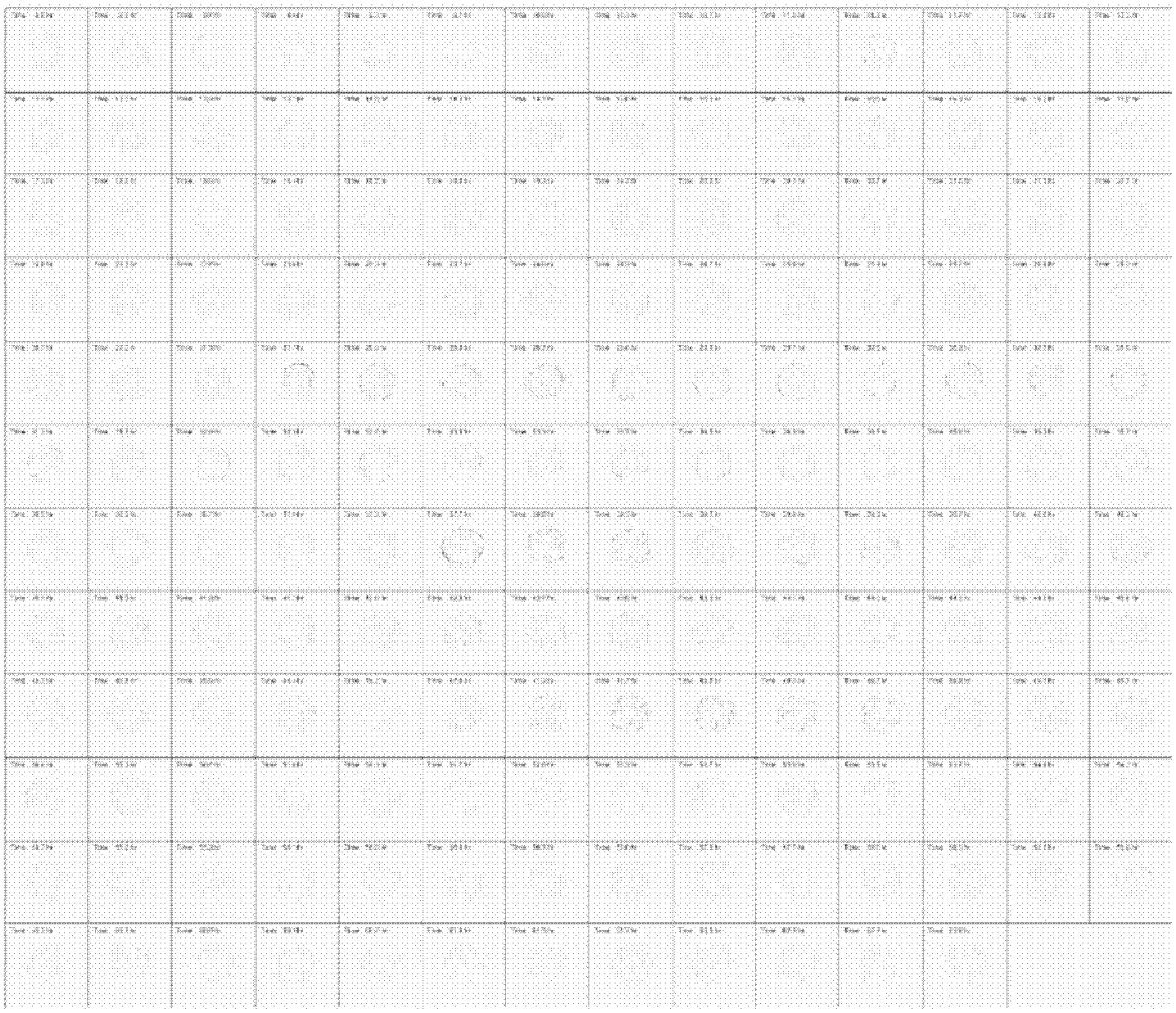


图 4

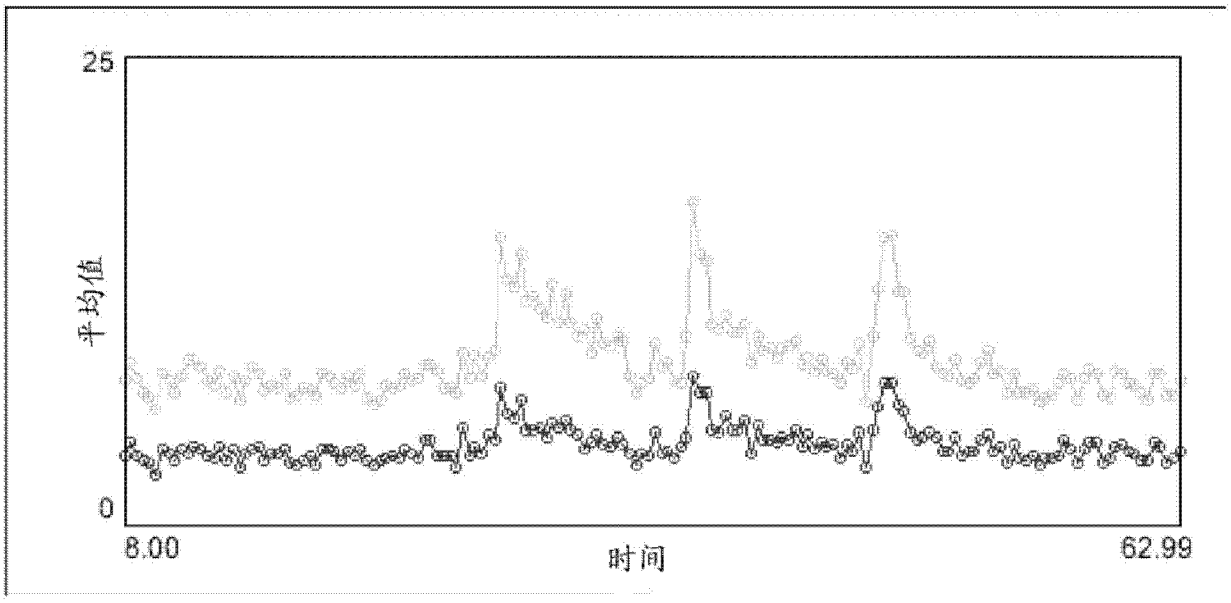
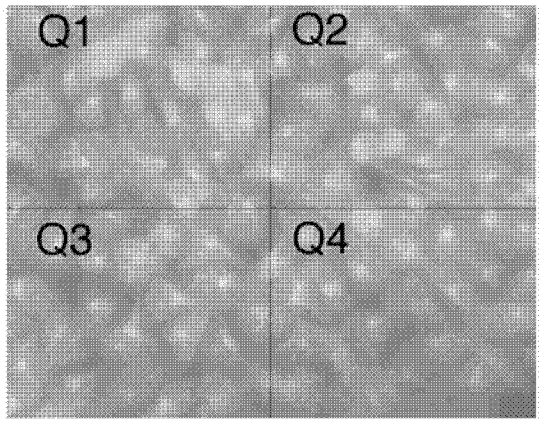


图 5


Q1
Q2
Q3
Q4

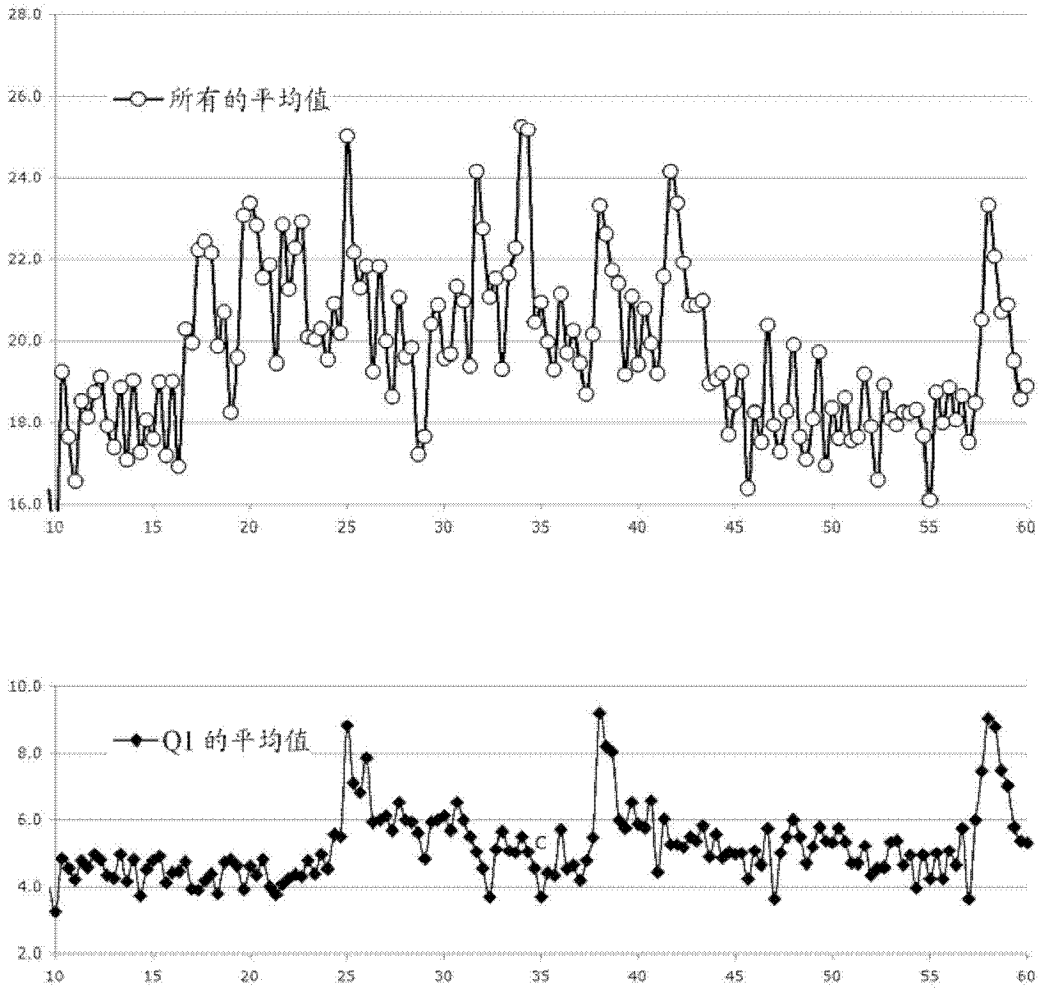

所有的平均值
Q1 的平均值
28.0
26.0
24.0
22.0
20.0
18.0
16.0
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

图 6

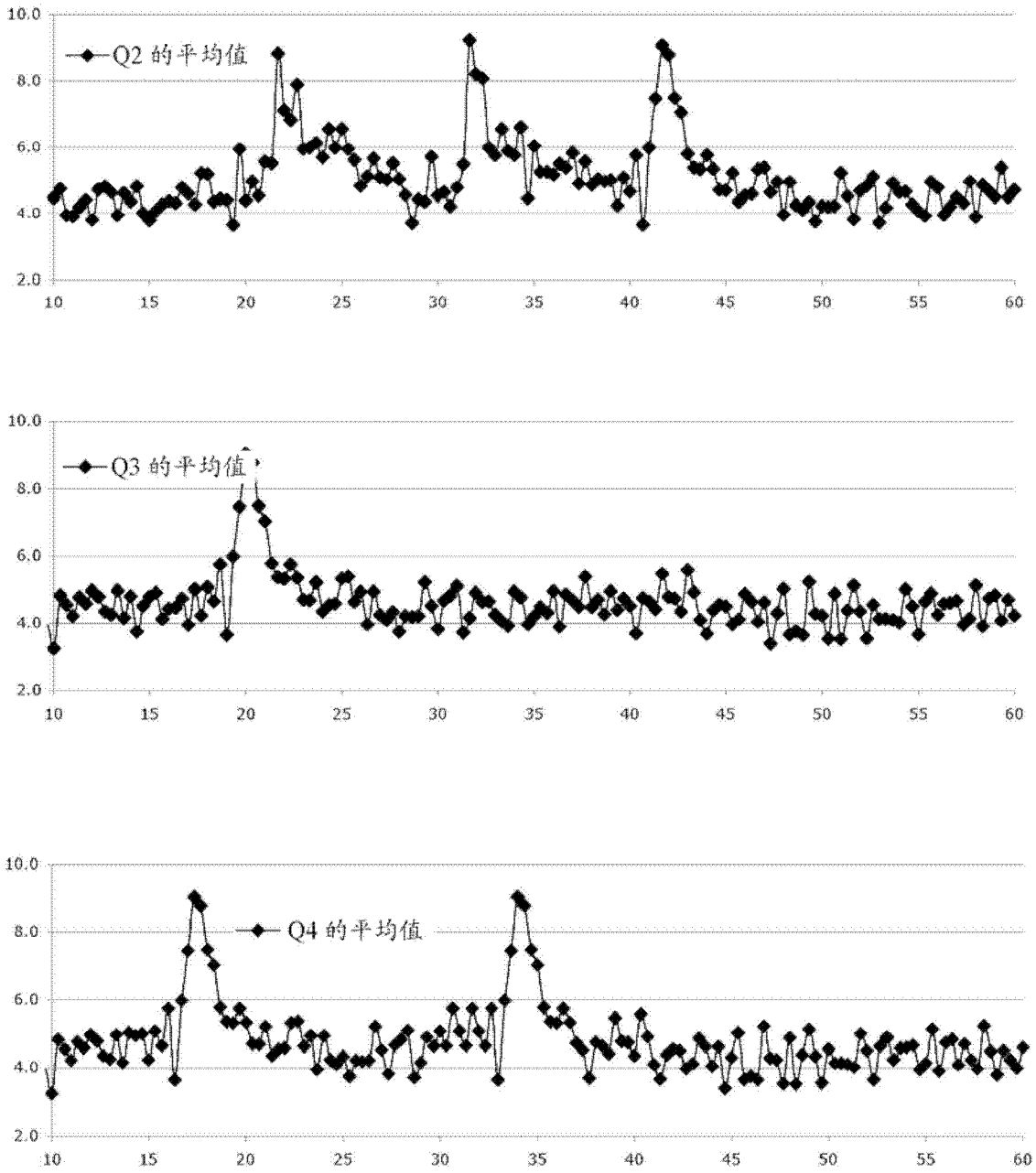

Q2 的平均值
Q3 的平均值
Q4 的平均值
10.0
8.0
6.0
4.0
2.0
10
15
20
25
30
35
40
45
50
55
60

图 6（续）

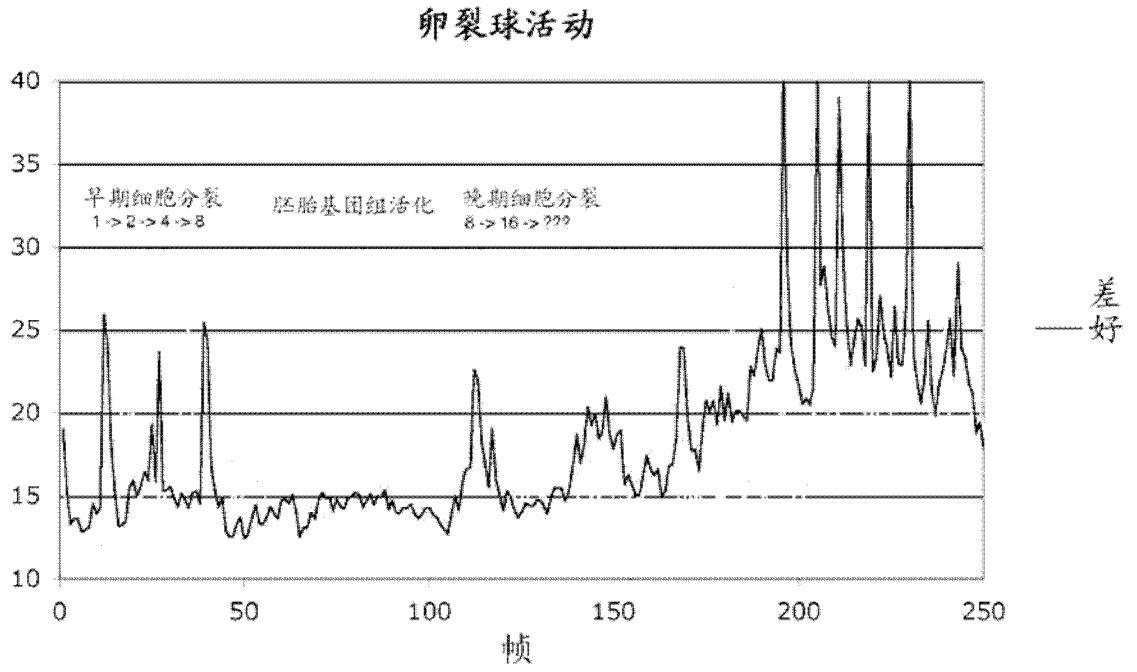

卵裂球活动
40
35
30
25
20
15
10
0
50
100
150
200
250
帧
早期细胞分裂
1->2->4->8
胚胎基因组活化
晚期细胞分裂
8->16->???
差
好

图 7

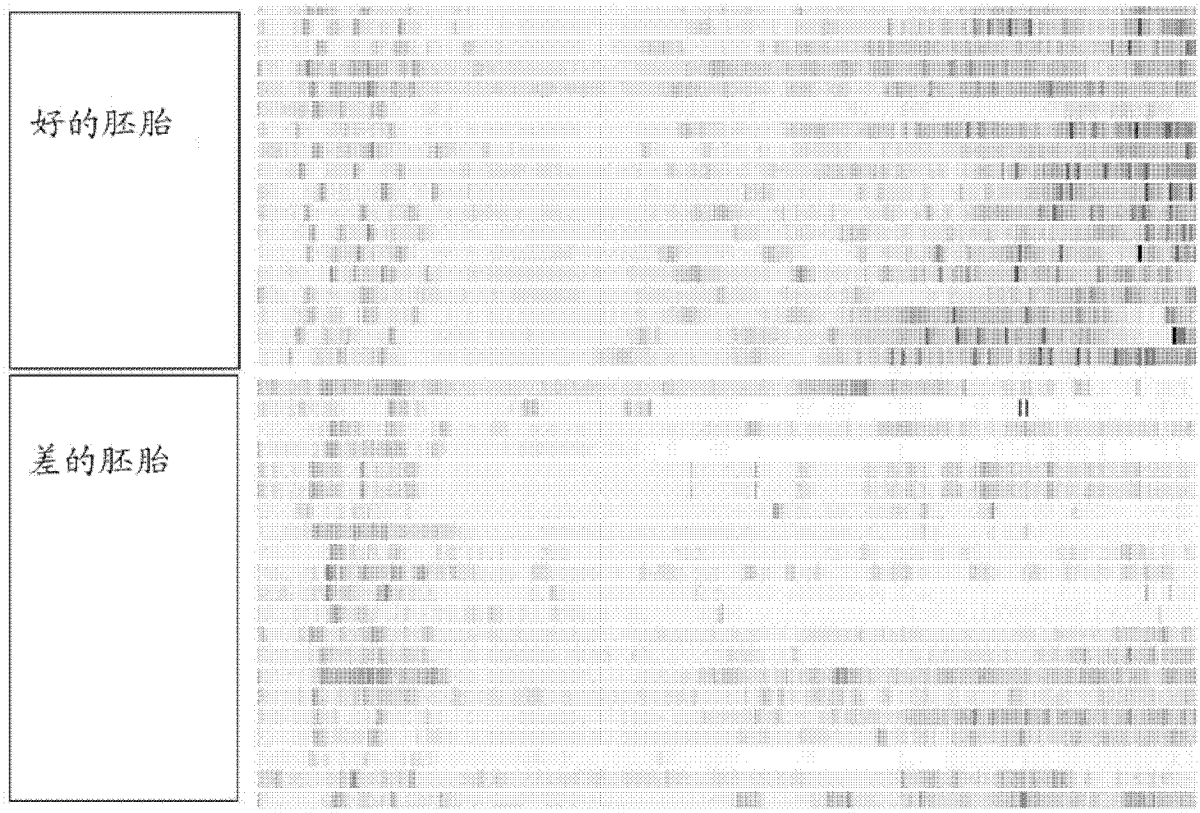

好的胚胎
差的胚胎

图 8

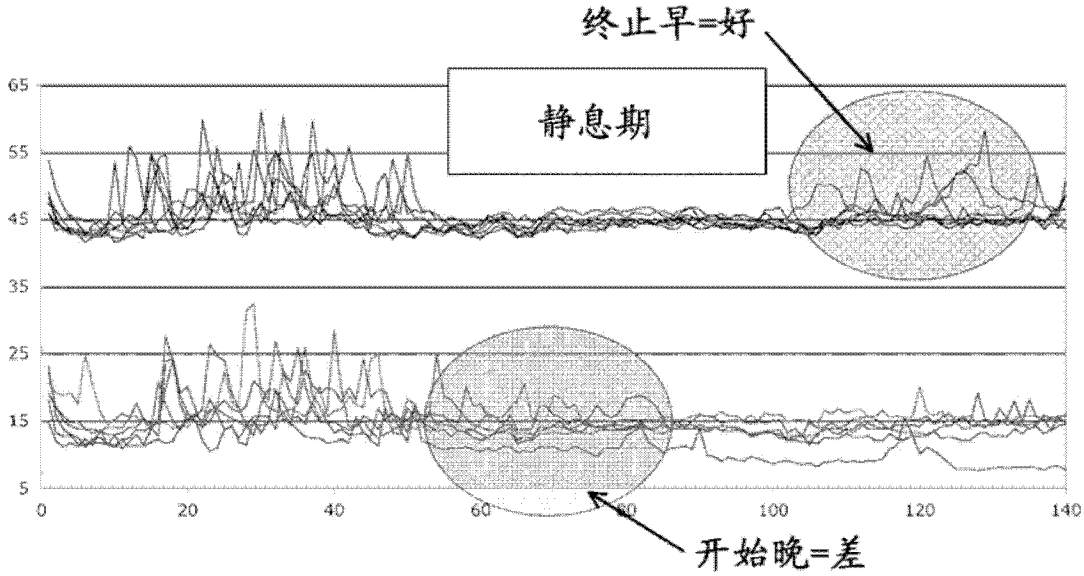


图 9

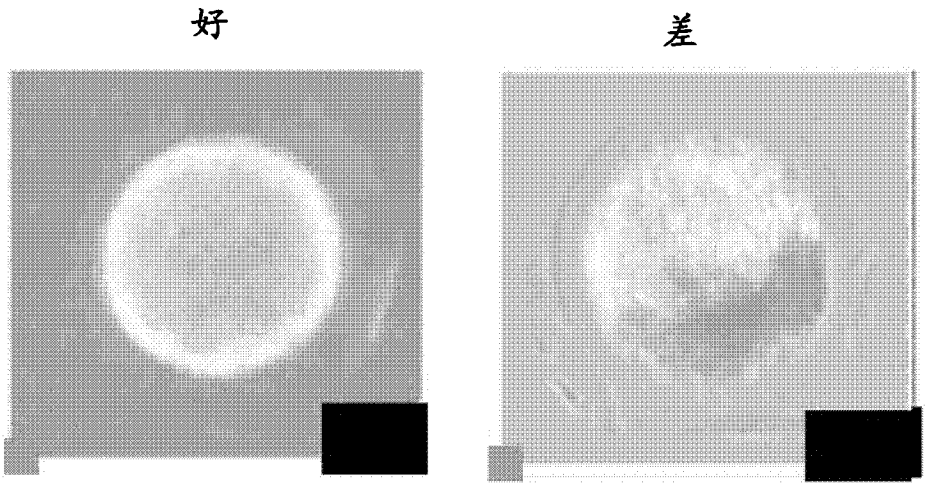


图 10

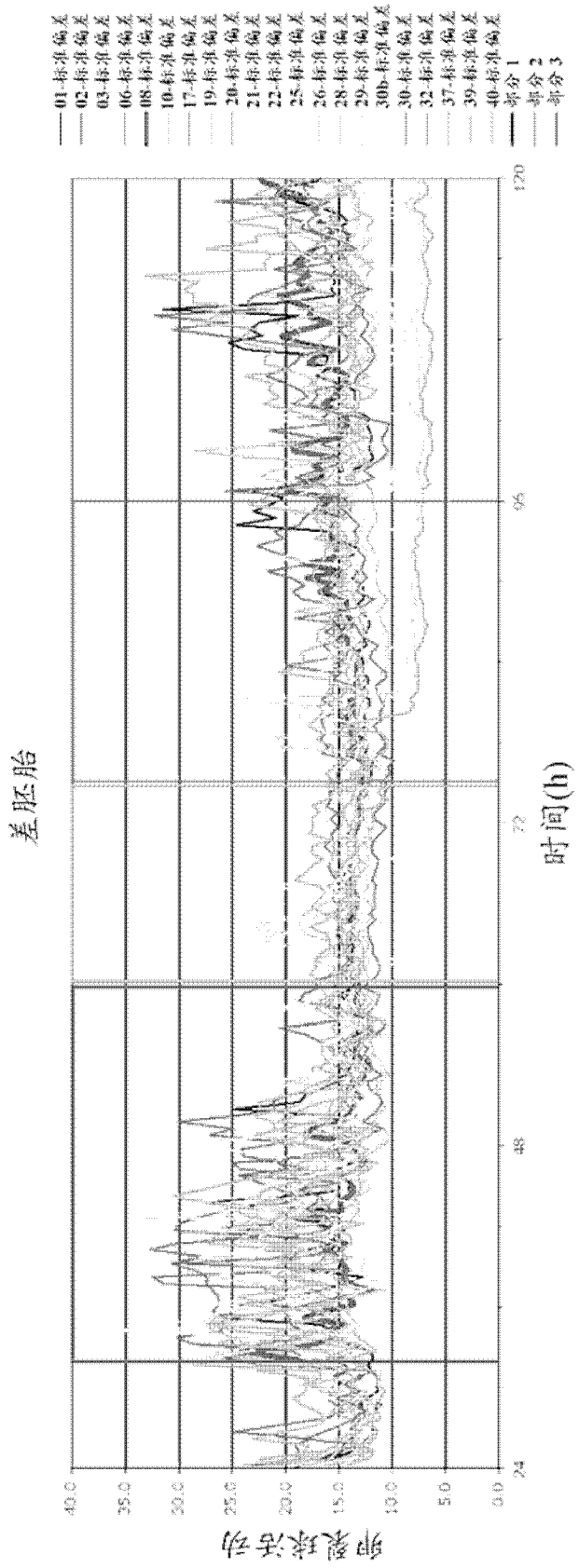

01-标准偏差
02-标准偏差
03-标准偏差
06-标准偏差
08-标准偏差
10-标准偏差
17-标准偏差
19-标准偏差
20-标准偏差
21-标准偏差
22-标准偏差
25-标准偏差
26-标准偏差
28-标准偏差
29-标准偏差
30b-标准偏差
30-标准偏差
32-标准偏差
37-标准偏差
39-标准偏差
40-标准偏差
部分1
部分2
部分3
差胚胎
卵裂球活动
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
24
48
72
96
120
时间(h)

图 11

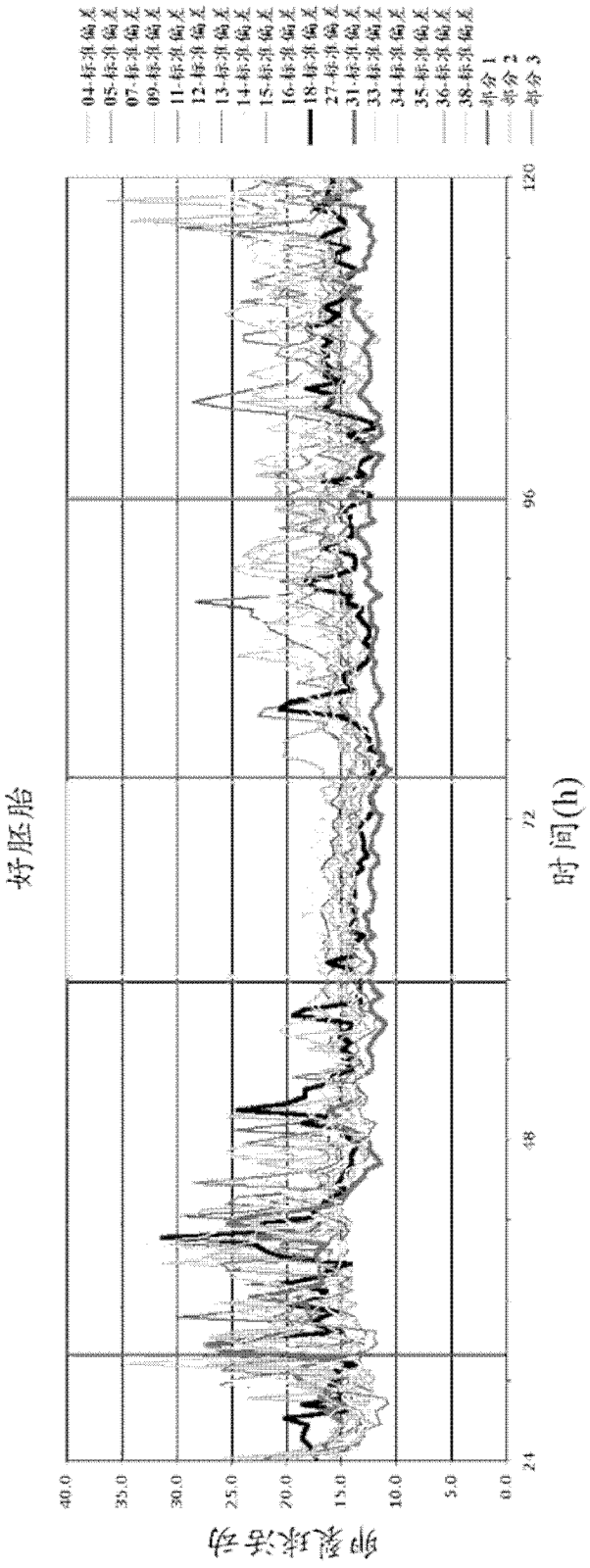
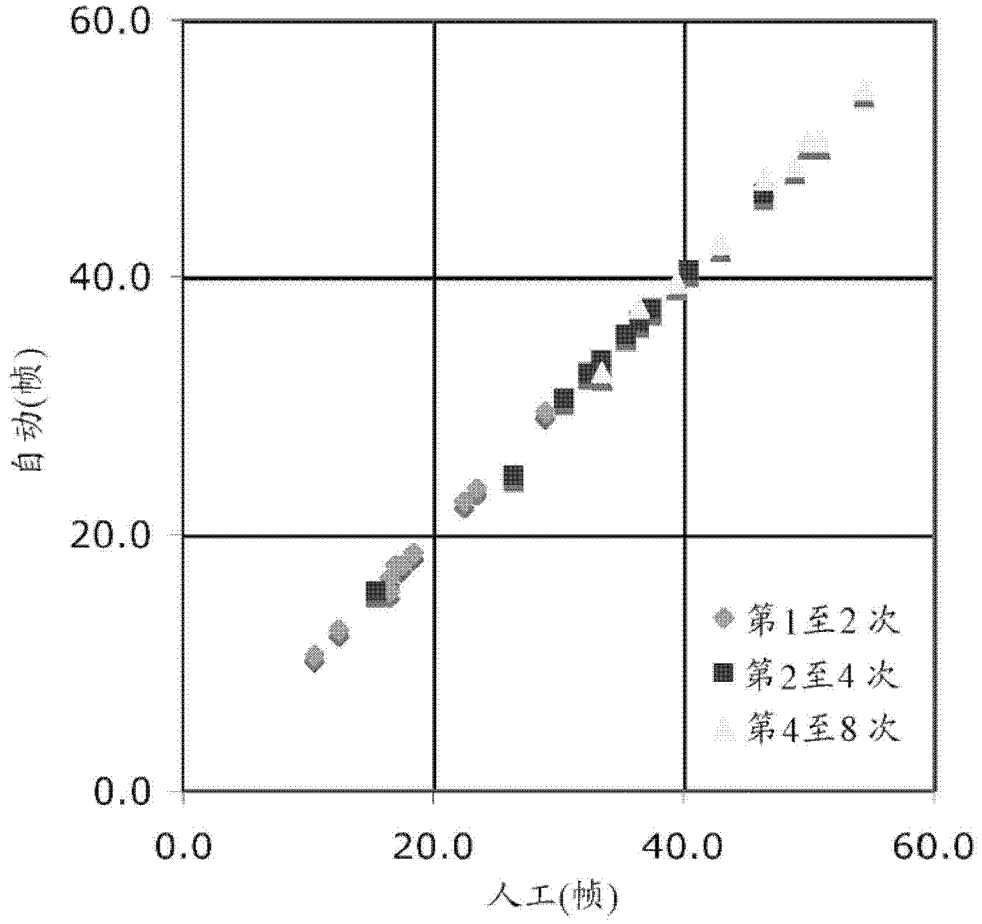

04-标准偏差
05-标准偏差
07-标准偏差
09-标准偏差
11-标准偏差
12-标准偏差
13-标准偏差
14-标准偏差
15-标准偏差
16-标准偏差
18-标准偏差
27-标准偏差
31-标准偏差
33-标准偏差
34-标准偏差
35-标准偏差
36-标准偏差
38-标准偏差
部分 1
部分 2
部分 3
好胚胎
卵裂球活动
40.0
35.0
30.0
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
24
48
72
96
120
时间(h)

图 12

基于不同分区中卵裂球活动的平均值比率和标准偏差比率的胚胎选择

图 13



	人工分析			自动化分析		
	第1至2次	第2至4次	第4至8次	第1至2次	第2至4次	第4至8次
1	23.5	40.5	54.5	23.5	40.5	54.5
2	29.0	46.5	66.5	29.5	46.5	
3	16.5	32.5		16.5	32.5	
4	10.5	26.5	36.5	10.5	24.5	37.5
5	12.5	27.5	39.5	12.5		39.5
6	18.5	35.5	50.0	18.5	35.5	
7	16.5	32.5	46.5	16.5	32.5	47.5
8	18.5	36.5	50.0	18.5	36.5	50.5
9	1.5	15.5	33.5		15.5	32.5
10	17.5	32.5	48.5	17.5	32.5	
11	22.5	37.5	51.0	22.5	37.5	50.5
12	16.5	30.5	43.0	15.5	30.5	42.5
13	17.0	33.5	49.0	17.5	33.5	48.5

图 14

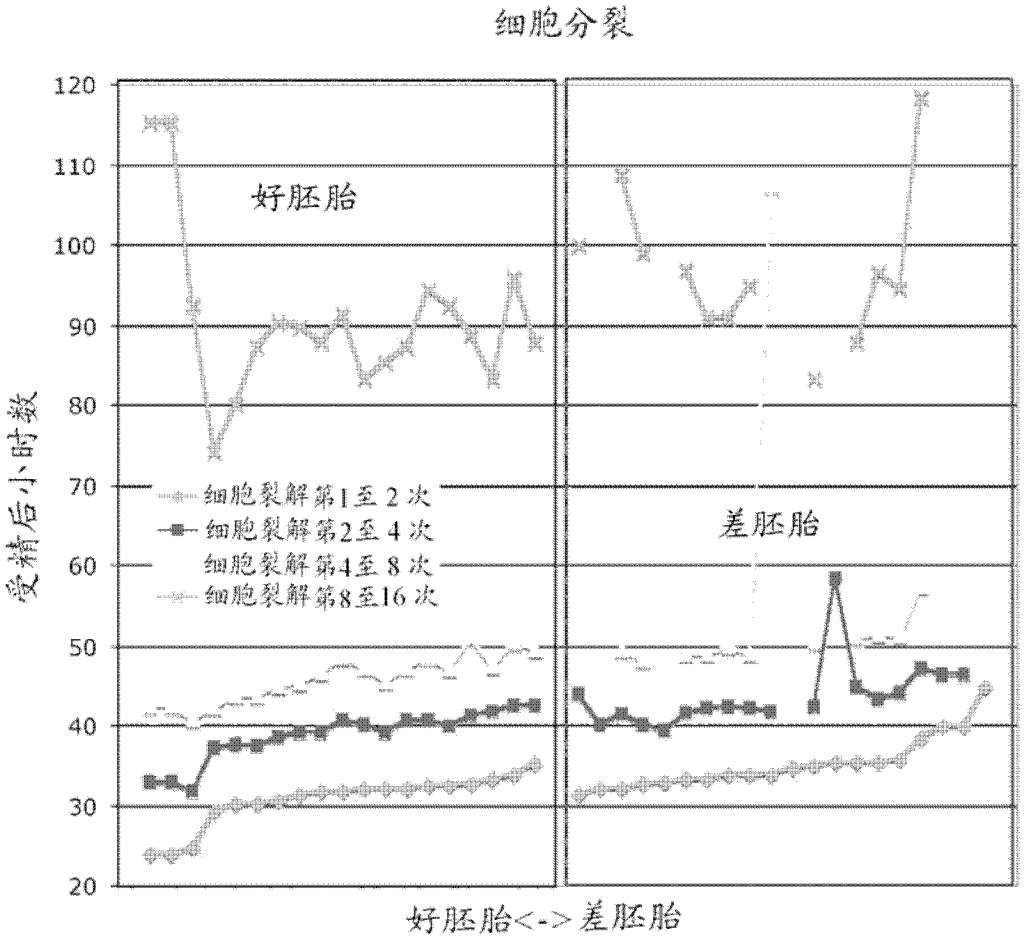

细胞分裂
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
受精后小时数
好胚胎
差胚胎
细胞裂解第1至2次
细胞裂解第2至4次
细胞裂解第4至8次
细胞裂解第8至16次
好胚胎<->差胚胎

图 15