

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2017 年 2 月 23 日 (23.02.2017)



(10) 国际公布号
WO 2017/028341 A1

- (51) 国际专利分类号:
G01N 27/447 (2006.01) G06T 17/00 (2006.01)
C12Q 1/02 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2015/088945
- (22) 国际申请日: 2015 年 9 月 6 日 (06.09.2015)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510500965.1 2015 年 8 月 14 日 (14.08.2015) CN
- (71) 申请人: 深圳大学 (SHENZHEN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。
- (72) 发明人: 李志 (LI, Zhi); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 张光烈 (ZHANG, Guanglie); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。 李文荣 (LI,

Wen Jung); 中国广东省深圳市南山区南海大道 3688 号, Guangdong 518060 (CN)。

- (74) 代理人: 深圳市君胜知识产权代理事务所 (JOHNSON INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY (SHENZHEN)); 中国广东省深圳市南山区麒麟路 1 号南山科技创业服务中心 308、309, Guangdong 518052 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

[见续页]

(54) Title: METHOD FOR GENERATING SINGLE-CELL THREE-DIMENSIONAL IMAGE BASED ON OPTICAL FLOW ANALYSIS

(54) 发明名称: 一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法

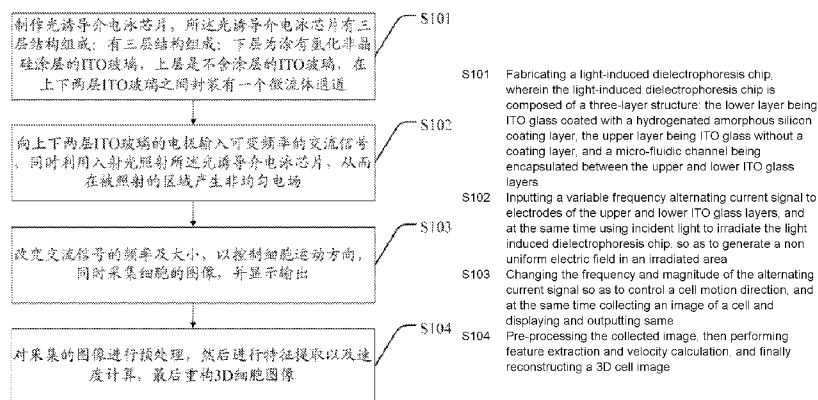


图 1

(57) Abstract: A method for generating a single-cell three-dimensional image based on an optical flow analysis, comprising the steps: A. fabricating a light-induced dielectrophoresis chip (20), wherein the light-induced dielectrophoresis chip (20) is composed of a three-layer structure: the lower layer being ITO glass coated with a hydrogenated amorphous silicon coating layer, the upper layer being ITO glass without a coating layer, and a micro-fluidic channel being encapsulated between the upper and lower ITO glass layers for injecting a solution required for operations; B. injecting a cell and the solution into the micro-fluidic channel, and inputting a variable frequency alternating current signal to electrodes of the upper and lower ITO glass layers, and at the same time using incident light to irradiate the light-induced dielectrophoresis chip, so as to generate a non-uniform electric field in an irradiated area; C. changing the frequency and magnitude of the alternating current signal so as to control a cell motion direction, and at the same time collecting an image of the cell; and D. pre-processing the collected image, then performing feature extraction and velocity calculation, and finally reconstructing a 3D cell image. In the method, a cell two-dimensional image sequence is acquired by controlling the rotation of a single cell, and a maximum likelihood estimation method is used to realize a cell three-dimensional image generation technique based on a two-dimensional image sequence of a controllable single cell. The device used in the method is simple and low in cost, does not bring about a phototoxic function and has a relatively low requirement for a sample, thereby improving the operability.

(57) 摘要:

[见续页]

WO 2017/028341 A1



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

CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第 21 条(3))。

一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法, 包括步骤: A、制作光诱导介电泳芯片(20), 所述光诱导介电泳芯片(20)由三层结构组成, 下层为涂有氢化非晶硅涂层的 ITO 玻璃, 上层是不含涂层的 ITO 玻璃, 在上下两层 ITO 玻璃之间封装有一个微流体通道, 用于注射所需操作的溶液; B、将细胞和溶液注射到微流体通道, 并向上下两层 ITO 玻璃的电极输入可变频率的交流信号, 同时利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片, 从而在被照射的区域产生非均匀电场; C、改变交流信号的频率及大小, 以控制细胞运动方向, 同时采集细胞的图像; D、对采集的图像进行预处理, 然后进行特征提取以及速度计算, 最后重构 3D 细胞图像。该方法通过控制单个细胞的旋转, 获取细胞二维图像序列, 利用最大似然估计方法实现基于可控单细胞的二维图像序列的细胞的三维图像生成技术。该方法所用设备简单, 成本低, 不会产生光毒作用, 对样本的要求较低, 提高了可操作性。

一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法

技术领域

本发明涉及细胞成像领域，尤其涉及一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法。

背景技术

与早期的成像系统相比，活细胞的 3D 成像呈现了细胞及其组分的更详细、也更准确的空间视图。技术进步让 3D 成像成为许多应用的重要工具，如细胞生物学、发育生物学、神经科学以及癌症研究。当前的技术比以往更加准确，能实时给出数据，几乎不需要细胞制备。现有技术的单细胞三维方法主要有以下几种：

- 1、激光扫描共聚焦显微镜：利用激光束经照明针孔形成点光源对细胞内焦平面的每一点扫描，细胞上的被照射点，在探测针孔处成像，由探测针孔后的光电倍增管（PMT）或冷电耦器件（cCCD）逐点或逐线接收，迅速在计算机监视器屏幕上形成荧光图像。照明针孔与探测针孔相对于物镜焦平面是共轭的，焦平面上的点同时聚焦于照明针孔和发射针孔，焦平面以外的点不会在探测针孔处成像，这样得到的共聚焦图像是细胞的光学横断面。激光扫描共聚焦显微镜通过对同一细胞不同层面的实时扫描成像，进行图像叠加可构成细胞的三维结构图像。

2、白色光衍射断层扫描成像技术：该技术能够为透明样本如活细胞和未标记的细胞成像，基于传统显微镜和白光，在细胞的自然状态下提供高分辨率的 3D 渲染图像。物镜镜头扫描细胞的整个轴向焦面，产生一叠相位分辨图像，然后通过 sparse 反卷积算法重建物体的三维结构。能得到 350nm 的侧向分辨率以及 900nm 的轴向分辨率。

3、晶格光片显微镜：晶格光片显微镜有两个正交的镜头；一个镜头将光聚焦产生一条非常细的笔状光源，照射在有荧光分子的生物样品，产生荧光；另一个采用宽场成像收集荧光，由面扫描以快速取得 3D 高清晰度生物影像。依靠空间光调制器同时形成 100 多条笔状的光束，来增加扫描速度，降低对生物样品的伤害；而且能控制每条光束的距离及形状。

但上述方法均存在不足：

第一种方式需要专用的设备，成本太高；且会产生光毒作用：在激光照射下，许多荧光染料分子会产生单态氧或自由基等细胞毒素，限制扫描时间、激发光强度，以保持样品的活性；标记染料的光漂白：为了获得足够的信噪比必须提高激光的强度；而高强度的激光会使染料在连续扫描过程中迅速褪色。

第二种方式不适用于非半透明样本，对于样本的要求比较高；需要专用设备，成本过高；成像灵活度低。

第三种方式设备成本过高；需要对样本进行荧光处理，降低了可操作性；光毒作用依然存在。

因此，现有技术还有待于改进和发展。

发明内容

鉴于上述现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，旨在解决现有的细胞三维图像生成方法成本高、有光毒作用、条件苛刻等问题。

本发明的技术方案如下：

一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中，包括步骤：

A、制作光诱导介电泳芯片，所述光诱导介电泳芯片有三层结构组成：有三层结构组成：下层为涂有氢化非晶硅涂层的 ITO 玻璃，上层是不含涂层的 ITO 玻璃，在上下两层 ITO 玻璃之间封装有一个微流体通道，用于注射所需操作的溶液；

B、将细胞和溶液注射到微流体通道，并向上下两层 ITO 玻璃的电极输入可变频率的交流信号，同时利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片，从而在被照射的区域产生非均匀电场；

C、改变交流信号的频率及大小，以控制细胞运动方向，同时采集细胞的图像；

D、对采集的图像进行预处理，然后进行特征提取以及速度计算，最后重构 3D 细胞图像。

所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中，所述步骤 A 中，制作光诱导介电泳芯片的步骤具体包括：

A1、清理 ITO 玻璃基质；

A2、在 ITO 玻璃基质上沉积氢化非晶硅涂层；

A3、在氢化非晶硅涂层上涂光刻胶；

A4、在光刻胶上进行板印；

A5、接触腐蚀至 ITO 玻璃基质；

A6、去除光刻胶；

A7、在 ITO 玻璃基质上未覆盖氢化非晶硅涂层的区域涂导电粘合剂。

所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中，所述细胞在非均匀电场中的所受到的平均介电泳力用如下公式描述：

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi R^3 \epsilon_m \operatorname{Re}[f_{CM}] \vec{\nabla}(E_{rms}^2)$$

其中 F_{DEP} 是作用到细胞上的平均介电泳力， R 是细胞的半径， ϵ_m 是细胞所在溶液的介电常数， E_{rms} 为所施加交流信号的均方根值， f_{CM} 为 Clausius-Mossotti 因子，在计算平均介电泳力时取该因子的实部 $\operatorname{Re}[f_{CM}]$ 。

所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中， f_{CM} 因子定义如下：

$$f_{CM} = \frac{\epsilon_p^* - \epsilon_m^*}{\epsilon_p^* + 2\epsilon_m^*}$$

ϵ_p^* 和 ϵ_m^* 分别是细胞和溶液的复介电常数。

所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中，所述复介电常数可表示为：

$$\epsilon^* = \epsilon - j \frac{\sigma}{\omega}$$

其中， ϵ 是溶液的介电常数， σ 是导电率， ω 是所施加交流信号

的频率。

所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中，细胞旋转速度为：

$$R(\Omega) = -\frac{\varepsilon_m \operatorname{Im}[f_{CM}] |E|^2}{2\eta} K$$

其中 E 是电场强度， η 是溶液的黏稠度， $\operatorname{Im}[f_{CM}]$ 是 Clausius-Mossotti 因子的虚部， K 为系数。

所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中，所述预处理包括：高斯滤波处理、亮度调整及模板匹配。

所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其中，所述步骤 D 中，使用机器学习算法对模型参数进行最大似然估计，按下式最小化的参数取值：

$$P = \arg \min_p \sum_i || I_{i+1} - f(R_i M_i + T_i) ||^2 ;$$

其中 I_{i+1} 是细胞旋转图像序列 $I = \{I_i, i=1, \dots, n\}$ 中的一帧， M 代表细胞上所有点的集合， R_i 和 T_i 分别是旋转矩阵和平移向量， $R_i m_i + T_i$ 是细胞上一点 m 从 i 时刻到 $i+1$ 时刻的三维旋转运动模型，即 m_{i+1} ，映射 $f = \{f(M), M \in \mathbb{R}^3\}$ 是将细胞在 i 时刻的三维信息投影到细胞旋转图像的某一帧 I_i 。

有益效果：本发明的方法具有如下优点：1) 通过显微视觉算法实现的增强光诱导介电泳可操控平台的反馈控制功能；2) 采用基于光流场的运动检测方法实现对细胞三维运动的跟踪，从而完成细胞动力学模型的参数估计；3) 通过控制单个细胞的旋转，获取细胞二维

图像序列，利用最大似然估计方法实现基于可控单细胞的二维图像序列的细胞的三维图像生成技术。本发明的方法，其所用设备简单，成本低，不会产生光毒作用，对样本的要求也较低，提高了可操作性。

附图说明

图 1 为本发明一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法较佳实施例的流程图。

图 2 为本发明中光诱导介电泳平台的结构示意图。

具体实施方式

本发明提供一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，为使本发明的目的、技术方案及效果更加清楚、明确，以下对本发明进一步详细说明。应当理解，此处所描述的具体实施例仅仅用以解释本发明，并不用于限定本发明。

请参阅图 1，图 1 为本发明一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法较佳实施例的流程图，如图所示，其包括步骤：

S100、制作光诱导介电泳芯片（ODEP 芯片），所述光诱导介电泳芯片有三层结构组成：下层为涂有氢化非晶硅涂层的 ITO 玻璃，上层是不含涂层（即不含氢化非晶硅涂层）的 ITO 玻璃，在上下两层 ITO 玻璃之间封装有一个微流体通道，用于注射所需操作的溶液；

S200、向上下两层 ITO 玻璃的电极输入可变频率的交流信号，同时利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片，从而在被照射的区域产

生非均匀电场；可先向微流体通道注入细胞和介质（介质即所需操作的溶液，也即细胞所在溶液）。然后输入交流信号。

S300、改变交流信号的频率及大小，以控制细胞运动方向，同时采集细胞的图像；

S400、对采集的图像进行预处理，然后进行特征提取以及速度计算，最后重构 3D 细胞图像。

进一步，所述的步骤 S100 中，制作光诱导介电泳芯片的步骤具体包括：

S101、清理 ITO 玻璃基质；

清理 ITO 玻璃基质的表面，保证接触面的洁净度。

S102、在 ITO 玻璃基质上沉积氢化非晶硅涂层（a-Si:H）；

在 ITO 玻璃基质表面沉积一层氢化非晶硅，厚度为 1 微米。

S103、在氢化非晶硅涂层上涂光刻胶；

S104、在光刻胶上进行板印；

板印是按照指定图形制作遮盖物，将遮盖物放在光刻胶表面，用紫外线照射遮盖物，没有被遮盖的光刻胶在紫外线作用下溶解，最终得到与遮盖物形状相同的光刻胶层。

S105、接触腐蚀至 ITO 玻璃基质；具体是用草酸腐蚀制作的芯片表层，以去除没有覆盖光刻胶的氢化非晶硅涂层。

S106、去除光刻胶；即将光刻胶从氢化非晶硅涂层表面去除。

S107、在 ITO 玻璃基质上未覆盖氢化非晶硅涂层的区域涂导电粘合剂。即在 ITO 玻璃的表面没有覆盖氢化非晶硅涂层的位置添加一

个导电触点。

而上层的 ITO 玻璃清理干净之后，涂导电粘合剂即可。

在上下两层 ITO 玻璃之间封装有一个微流体通道(100 微米高)，具体是通过 PDMS 或是双面胶封装出一个微流体通道。

在步骤 S200 中，如图 2 所示，首先搭建光诱导介电泳平台。除了步骤 S100 制作的 ODEP 芯片 20，平台还需要一台光学显微镜 10、一台光学投影仪(高分辨率)、一个可编程信号发生电路和主机系统。所述主机系统包括：图像采集模块、显微视觉算法处理模块、生物芯片驱动控制器、虚拟电极生成模块以及显示输出模块。所述图像采集模块用来采集光学显微镜 20 的图像，并交由显微视觉算法处理模块来进行处理并通过显示输出模块来显示，所述显微视觉算法处理模块还向生物芯片驱动控制器及虚拟电极生成模块发出信号用来控制二者工作。所述生物芯片驱动控制器连接所述可编程信号发生电路来改变信号频率和大小。所述可编程信号发生电路通过电极连接所述 ODEP 芯片 20。所述光学投影仪设置在 ODEP 芯片 20 下方，用来对其进行入射光照射。所述虚拟电极生成模块连接所述光学投影仪。

其中光学显微镜参数如下：

尼康 CFI60 无限远光学系统；

电动对焦，可上下移动（上 13mm/下 2mm）；

三目镜筒，光分布：目镜/相机 100%/0，20%/100%，0/100%；

目镜放大倍率：10x；

聚光器：防水，工作距离：7.2mm；

物镜: 20x, 高度消色透镜, 纳米结晶涂层;

载物台: 电动 X 轴和 Y 轴, 分辨率: 0.1 微米;

紫外线截止滤光块;

荧光滤波套装: FITC / GFP。

在平台搭建好后, 可通过生物芯片驱动控制器向可编程信号发生电路发出信号, 然后可编程信号发生电路向上下两层 ITO 玻璃的电极输入可变频率的交流信号, 同时光学投影仪利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片, 从而在被照射的区域产生非均匀电场。

在所述步骤 S300 中, 通过改变交流信号的频率及大小, 来改变细胞所受到的介电泳力的方向与大小, 以控制细胞运动方向, 同时采集细胞的图像 (2D 细胞图像), 实现高速操纵微纳米实体。

最后在步骤 S400 中, 对采集的图像进行预处理, 然后进行特征提取以及速度计算, 最后重构 3D 细胞图像。

下面先着重介绍下, 如何实现由改变交流信号的频率及大小来控制细胞运动方向。

细胞在非均匀电场中的所受到的平均介电泳力可以用如下公式描述:

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi R^3 \epsilon_m \text{Re}[f_{CM}] \vec{\nabla}(E_{rms}^2) \quad (1)$$

其中 F_{DEP} 是作用到细胞上的平均介电泳力, R 是细胞的半径, ϵ_m 是细胞所在溶液的介电常数, E_{rms} 为所施加电场 (交流信号) 的均方根值, f_{CM} 为 Clausius-Mossotti 因子, 在计算平均介电泳力时取该因子的实部 $\text{Re}[f_{CM}]$, 该因子定义如下:

$$f_{CM} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*} \quad (2)$$

ε_p^* 和 ε_m^* 分别是细胞和溶液的复介电常数,公式2中的复介电常数(包括 ε_p^* 和 ε_m^*)可表示为:

$$\varepsilon^* = \varepsilon - j\frac{\sigma}{\omega} \quad (3)$$

其中, ε 是溶液的介电常数, σ 是导电率, ω 是所加电场(交流信号)的频率。

可以看出 f_{CM} 是一个和频率相关的可变因子。考虑在施加不同频率的交变电场下,当介电泳力与电场强度变化方向相同时,称为正介电泳现象;当所受到的介电泳力与电场强度变化方向相反,称为负介电泳现象。因而可以通过改变所施加的电场的频率,来改变细胞所受到的介电泳力的方向,达到控制细胞运动方向的目的。

由于生物细胞受到非均匀电场的极化作用而产生偶极矩,根据其介电泳力所产生的转矩与所在介质中受到的摩擦力矩达到平衡,细胞旋转速度为:

$$R(\Omega) = -\frac{\varepsilon_m \operatorname{Im}[f_{CM}] |E|^2}{2\eta} K \quad (4)$$

其中 E 是电场强度, η 是溶液的黏稠度, $\operatorname{Im}[f_{CM}]$ 是Clausius-Mossotti因子的虚部, K 为系数。根据细胞的旋转速度与细胞的介电常数的关系可以对细胞的介电特性进行估算。

细胞受到的介电泳力强度与方向主要取决于介质与细胞的介电特性,如形状、尺寸与电场频率。本发明利用光诱导介电泳力(ODEP)(当施加某频段,电液动力学的一种主导力)以识别与操纵生物

细胞。ODEP 芯片由可变频率的交流信号驱动，交流信号通过上下两层 ITO 玻璃的导电触点输入，此时在溶液层只有一小部分分压，并在溶液层中产生均匀电场。当入射光照射 ODEP 芯片，a-Si: H 的光导率由于电子空穴对数的增多而增加几个数量级。由于入射光区域电阻减小，在溶液层中的分压会大大增大，于是入射光区域的 a:Si:H 将成为一个有效的虚拟电极产生非均匀电场。这种光诱导的非均匀电场会极化区域内的颗粒产生介电泳力，也就是光诱导介电泳力（ODEP）。通过光学显微镜与主机系统可实现程序化的动态运动，且不需要任何手工界面而实现微纳米实体的自动化捕获、操纵、分离与组装。

对于步骤 S400 中，细胞三维图像生成的原理如下：当一个极化的物体置于非均匀电场时，在偶极矩的作用下物体会向电场最强或者最弱处运动，方向取决于物体相对于介质的极性。根据细胞在介电泳力场下的动力学模型，通过改变驱动光诱导介电泳生物芯片的交流信号的大小与频率，并配合相应的投射到 ODEP 芯片上的入射光，控制细胞在光诱导介电泳力的作用下的旋转运动。细胞旋转至不同位置的图像序列 $I = \{I_i, i=1, \dots, n\}$ ， n 为时刻点，细胞的三维图像是从二维图像序列重构细胞的三维结构。重构过程包括：

一、在获得二维图像后，先进行预处理：

1、先对图像进行高斯滤波处理，滤除掉图像中噪声。高斯滤波的核心公式如下：

$$f(x, y) = \frac{1}{2\pi\sigma^2} \exp\left(-\frac{x^2 + y^2}{2\sigma^2}\right) \quad (5)$$

其中 σ 为函数的宽度参数，控制了函数的径向作用范围。

2、然后进行亮度调整处理。滤除噪声后，以背景色为基准，对图像整体亮度作线性变换：

$$g(x, y) = c + k(f(x, y) - a) \quad (6)$$

其中， $f(x, y)$ 和 $g(x, y)$ 分别为图像中某点 (x, y) 的原始亮度和变换后的亮度， a 为背景亮度， k 为变换系数， c 为亮度补偿。

3、再进行模板匹配处理。对图像中的细胞进行模板匹配，比对同一窗口中的块在上下两帧的差异，计算相关系数 ρ_{XY} 。

$$\rho_{XY} = \frac{\text{Cov}(X, Y)}{\sqrt{D(X)}\sqrt{D(Y)}} \quad (7)$$

其中 X 和 Y 分别为上下两帧中的块， $\text{Cov}(X, Y)$ 为 X 和 Y 的协方差， $D(X)$ 和 $D(Y)$ 分别为 X 和 Y 的方差。

二、然后进行特征提取。

1、找到相关系数的局部最大值以跟踪峰点，从一个峰点到下一个峰点即代表旋转一圈，根据峰点的索引估算出旋转的圈数。

2、光流法分析像素的运动向量。对于图像上的一个像素点 $X(x, y)$ 在 t 时刻的亮度值为 $I(x, y, t)$ ， $u(x, y)$ 和 $v(x, y)$ 表示 (x, y) 处光流在 x 和 y 方向的运动分量。根据图像序列，计算 $I_x = \frac{\partial I}{\partial x}$ 和 $I_y = \frac{\partial I}{\partial y}$ 。令

$$\nabla I(X) = (I_x, I_y)^T, \quad A = (\nabla I(X_1), \dots, \nabla I(X_n))^T,$$

$$W = \text{diag}(W(X_1), \dots, W(X_n)), \quad b = -(\frac{\partial I(X_1)}{\partial t}, \dots, \frac{\partial I(X_n)}{\partial t}),$$

其中 n 为点的个数， $\text{diag}()$ 为构造对角矩阵， W 为高斯函数：

$$W(x) = ae^{-(x-b)/c^2} \quad (8)$$

令 $V = (u, v)^T$ ，那么其计算公式如下：

$$V = (A^T W^2 A)^{-1} A^T W^2 b \quad (9)$$

三、再进行速度计算。

1、根据得到的自转圈数以及相邻两个图像序列的拍摄间隔计算细胞的自转速度 ω ，结合细胞的旋转模型，即可得到细胞自转的旋转矩阵 K 。因此旋转后的细胞上所有点的集合 $M' = MK$ ，其中 M 为细胞上所有点的原始坐标。每个点的运动速度 $v_x = \frac{dx}{dt}$, $v_y = \frac{dy}{dt}$, $v_z = \frac{dz}{dt}$ 。

2、利用光流法得到的细胞二维运动速度，修正上一步得到的三维运动速度。对于某一点 a ，其三维运动速度为 $v_{3D} = (x_{3D}, y_{3D}, z_{3D})$ ，二维运动速度为 $v_{2D} = (x_{2D}, y_{2D})$ ，计算修正系数 $k = a \frac{x_{2D}}{x_{3D}} + b \frac{y_{2D}}{y_{3D}}$ ，其中 a 和 b 分别为 x 轴和 y 轴修正系数。最终得到的三维运动速度 $V = K v_{3D}$ 。

四、最后进行细胞重构。

具体的，根据细胞的刚体模型，细胞上一点 m 从时刻 t_k 的位置 (x_k, y_k, z_k) 经过旋转和平移，运动到时刻 t_{k+1} 的位置 $(x_{k+1}, y_{k+1}, z_{k+1})$ 。设旋转矩阵和平移向量分别是 R_k 和 T_k ，则细胞三维旋转运动模型为：

$$m_{k+1} = R_k m_k + T_k \quad (10)$$

定义映射 $f = \{f(M), M \in \mathbb{R}^3\}$ ，其中 M 代表细胞上所有点的集合，将细胞在 i 时刻的三维信息投影到细胞旋转图像的某一帧 I_i 。因此，细胞的三维图像生成归结为模型参数的最大似然估计，使用机器学习算法对模型产生进行最大似然估计，按下式最小化的参数取值。

$$P = \arg \min_p \sum_i \|I_{i+1} - f(R_i M_i + T_i)\|^2 \quad (11)$$

其中 I_{i+1} 是细胞旋转图像序列 $I = \{I_i, i=1, \dots, n\}$ 中的一帧, M 代表细胞上所有点的集合, R_i 和 T_i 分别是旋转矩阵和平移向量, $R_i m_i + T_i$ 是细胞上一点 m 从 i 时刻到 $i+1$ 时刻的三维旋转运动模型, 即 m_{i+1} 。映射 $f = \{f(M), M \in \mathbb{R}^3\}$ 是将细胞在 i 时刻的三维信息投影到细胞旋转图像的某一帧 I_i 。

利用训练好的参数, 即可根据细胞旋转的二维图像重构映射为当前帧的 3D 细胞模型。本发明通过光流的方法获得的细胞旋转运动信息将更准确的估计旋转矩阵 R_k , 进而优化细胞旋转的三维模型。

本发明的方法具有如下优点: 1) 通过显微视觉算法实现的增强光诱导介电泳可操控平台的反馈控制功能; 2) 采用基于光流场的运动检测方法实现对细胞三维运动的跟踪, 从而完成细胞动力学模型参数估计; 3) 通过控制单个细胞的旋转, 获取细胞二维图像序列, 利用最大似然估计方法实现基于可控单细胞的二维图像序列的细胞的三维图像生成技术。本发明的方法, 其所用设备简单, 成本低, 不会产生光毒作用, 对样本的要求也较低, 提高了可操作性。

应当理解的是, 本发明的应用不限于上述的举例, 对本领域普通技术人员来说, 可以根据上述说明加以改进或变换, 所有这些改进和变换都应属于本发明所附权利要求的保护范围。

权 利 要 求 书

1、一种基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其特征在于，包括步骤：

A、制作光诱导介电泳芯片，所述光诱导介电泳芯片有三层结构组成：有三层结构组成：下层为涂有氢化非晶硅涂层的 ITO 玻璃，上层是不含涂层的 ITO 玻璃，在上下两层 ITO 玻璃之间封装有一个微流体通道，用于注射所需操作的溶液；

B、将细胞和溶液注射到微流体通道，并向上下两层 ITO 玻璃的电极输入可变频率的交流信号，同时利用入射光照射所述光诱导介电泳芯片，从而在被照射的区域产生非均匀电场；

C、改变交流信号的频率及大小，以控制细胞运动方向，同时采集细胞的图像；

D、对采集的图像进行预处理，然后进行特征提取以及速度计算，最后重构 3D 细胞图像。

2、根据权利要求 1 所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其特征在于，所述步骤 A 中，制作光诱导介电泳芯片的步骤具体包括：

A1、清理 ITO 玻璃基质；

A2、在 ITO 玻璃基质上沉积氢化非晶硅涂层；

A3、在氢化非晶硅涂层上涂光刻胶；

A4、在光刻胶上进行板印；

A5、接触腐蚀至 ITO 玻璃基质；

A6、去除光刻胶;

A7、在 ITO 玻璃基质上未覆盖氢化非晶硅涂层的区域涂导电粘合剂。

3、根据权利要求 1 所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其特征在于，所述细胞在非均匀电场中的所受到的平均介电泳力用如下公式描述：

$$\vec{F}_{DEP} = 2\pi R^3 \varepsilon_m \operatorname{Re}[f_{CM}] \vec{\nabla}(E_{rms}^2)$$

其中 F_{DEP} 是作用到细胞上的平均介电泳力， R 是细胞的半径， ε_m 是细胞所在溶液的介电常数， E_{rms} 为所施加交流信号的均方根值， f_{CM} 为 Clausius-Mossotti 因子，在计算平均介电泳力时取该因子的实部 $\operatorname{Re}[f_{CM}]$ 。

4、根据权利要求 1 所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其特征在于， f_{CM} 因子定义如下：

$$f_{CM} = \frac{\varepsilon_p^* - \varepsilon_m^*}{\varepsilon_p^* + 2\varepsilon_m^*}$$

ε_p^* 和 ε_m^* 分别是细胞和溶液的复介电常数。

5、根据权利要求 1 所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其特征在于，所述复介电常数可表示为：

$$\varepsilon^* = \varepsilon - j \frac{\sigma}{\omega}$$

其中， ε 是溶液的介电常数， σ 是导电率， ω 是所施加交流信号的频率。

6、根据权利要求 1 所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成

方法，其特征在于，细胞旋转速度为：

$$R(\Omega) = -\frac{\varepsilon_m \operatorname{Im}[f_{CM}] |E|^2}{2\eta} K$$

其中 E 是电场强度， η 是溶液的黏稠度， $\operatorname{Im}[f_{CM}]$ 是 Clausius-Mossotti 因子的虚部， K 为系数。

7、根据权利要求 1 所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其特征在于，所述预处理包括：高斯滤波处理、亮度调整及模板匹配。

8、根据权利要求 1 所述的基于光流分析的单细胞三维图像生成方法，其特征在于，所述步骤 D 中，使用机器学习算法对模型参数进行最大似然估计，按下式最小化的参数取值：

$$P = \arg \min_p \sum_i || I_{i+1} - f(R_i M_i + T_i) ||^2 ;$$

其中 I_{i+1} 是细胞旋转图像序列 $I = \{I_i, i=1, \dots, n\}$ 中的一帧， M 代表细胞上所有点的集合， R_i 和 T_i 分别是旋转矩阵和平移向量， $R_i m_i + T_i$ 是细胞上一点 m 从 i 时刻到 $i+1$ 时刻的三维旋转运动模型，即 m_{i+1} ，映射 $f = \{f(M), M \in \mathbb{R}^3\}$ 是将细胞在 i 时刻的三维信息投影到细胞旋转图像的某一帧 I_i 。

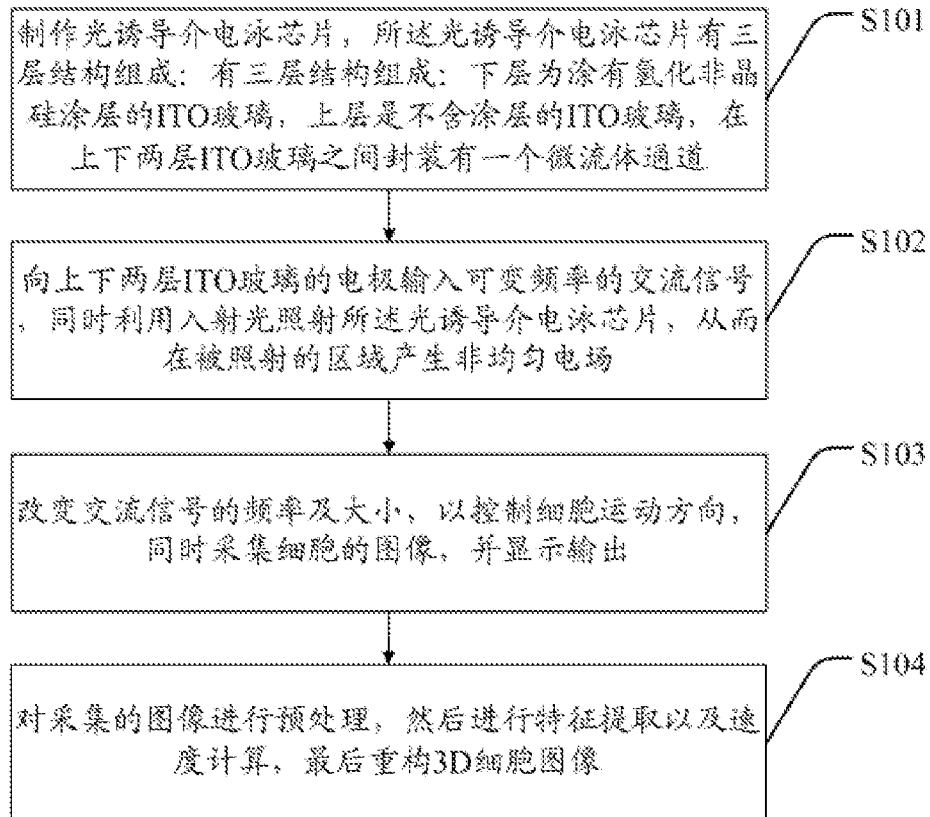


图 1

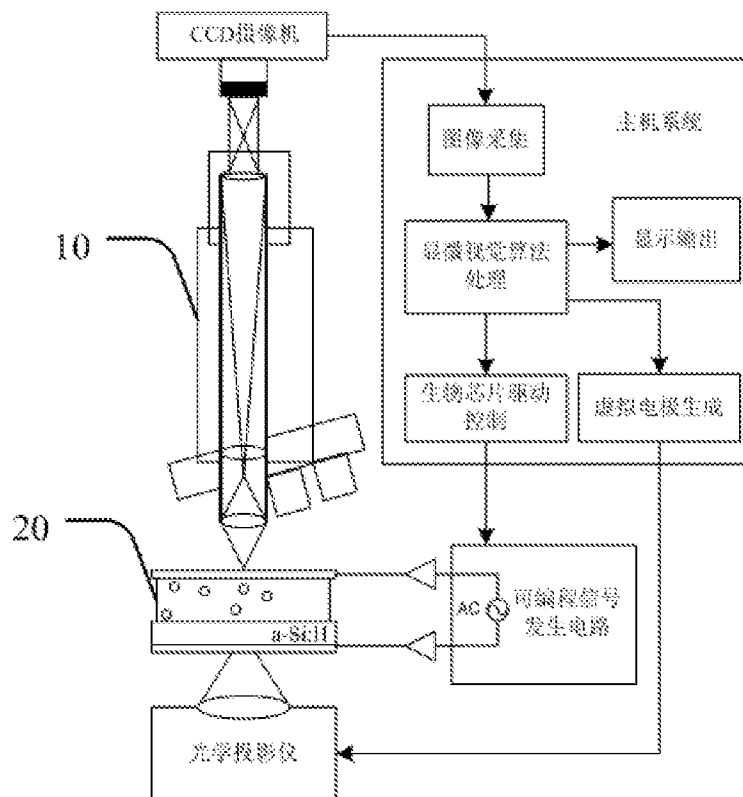


图 2

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2015/088945

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

G01N 27/447 (2006.01) i; C12Q 1/02 (2006.01) i; G06T 17/00 (2006.01) i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

G01N 27/- C12Q 1/- G06T 17/- G01N 33/-

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

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

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT: optical flow, two-dimensional, three-dimensional, electrophoresis, reconstruction, induced, chip, amorphous silicon, conductive, channel, electrode, alternating, frequency, illumination, electric field, feature extraction, optical, flow, image, three, dimension+, cell, blood, dielectroph+, silicon, coat+, glass, chunnel?, voltage, current, light, field, alter+, chang+, adjust+, speed, DEP, ODEP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 101135680 A (SOUTHEAST UNIVERSITY), 05 March 2008 (05.03.2008), description, page 7, last paragraph to page 9, paragraph 2, page 9, last paragraph to page 10, paragraph 1 and page 10, last paragraph to page 12, paragraph 1, and figures 1-3	1-8
A	US 2007187248 A1 (HODKO, D. et al.), 16 August 2007 (16.08.2007), the whole document	1-8
A	CN 102539484 A (SONY CORPORATION), 04 July 2012 (04.07.2012), the whole document	1-8
A	CN 101697236 A (NANCHANG HANGKONG UNIVERSITY), 21 April 2010 (21.04.2010), the whole document	1-8
A	CN 102449163 A (THE REGENTS OF THE UNIVERSITY OF CALIFORNIA), 09 May 2012 (09.05.2012), the whole document	1-8
A	US 2008289965 A1 (ENGHETA, N. et al.), 27 November 2008 (27.11.2008), the whole document	1-8

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family annex.

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

Date of the actual completion of the international search 13 April 2016 (13.04.2016)	Date of mailing of the international search report 25 April 2016 (25.04.2016)
Name and mailing address of the ISA/CN: State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No.: (86-10) 62019451	Authorized officer WANG, Tianhua Telephone No.: (86-10) 010-61648143

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2015/088945

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WANG, Shu'e et al., "Automatic Manipulation of Polystyrene Beads via Optically-Induced Dielectrophoresis", MICRONANOELECTRONIC TECHNOLOGY, volume 48, number 2, 28 February 2011 (28.02.2011), ISSN: 1671-4776, pages 133-136	1-8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2015/088945

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101135680 A	05 March 2008	CN 101135680 B	20 April 2011
US 2007187248 A1	16 August 2007	WO 2007070592 A9	16 August 2007
		WO 2007070592 A3	24 April 2008
		WO 2007070592 A2	21 June 2007
		US 7686934 B2	30 March 2010
CN 102539484 A	04 July 2012	US 2012103817 A1	03 May 2012
		JP 5617532 B2	05 November 2014
		CN 102539484 B	09 September 2015
		EP 2447703 A3	29 May 2013
		EP 2447703 A2	02 May 2012
		US 8828212 B2	09 September 2014
		JP 2012098063 A	24 May 2012
CN 101697236 A	21 April 2010	CN 101697236 B	19 September 2012
CN 102449163 A	09 May 2012	EP 2414539 A2	08 February 2012
		US 2012118740 A1	17 May 2012
		WO 2010115167 A8	17 November 2011
		JP 2012522518 A	27 September 2012
		US 2015360236 A1	17 December 2015
		WO 2010115167 A3	31 March 2011
		US 9079189 B2	14 July 2015
		WO 2010115167 A2	07 October 2010
US 2008289965 A1	27 November 2008	US 8293087 B2	23 October 2012
		WO 2008051248 A3	07 May 2009
		WO 2008051248 A2	02 May 2008

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2015/088945

A. 主题的分类

G01N 27/447(2006.01)i; C12Q 1/02(2006.01)i; G06T 17/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

G01N27/- C12Q1/- G06T17/- G01N33/-

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI, EPODOC, CNKI, CNPAT; 光流, 细胞, 二维, 三维, 电泳, 重构, 诱导, 芯片, 非晶硅, 涂层, 导电, 玻璃, 通道, 电极, 电压, 电流, 交流, 频率, 光, 照, 电场, 改变, 调节, 图像, 特征提取, 速度, optical, flow, image, three, dimension+, cell, blood, dielectroph+, silicon, coat+, glass, chunnel?, voltage, current, light, field, alter+, chang+, adjust+, speed, DEP, ODEP

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 101135680 A (东南大学) 2008年 3月 5日 (2008 - 03 - 05) 说明书第7页末段-第9页第2段、第9页末段-第10页第1段、第10页末段-第12页第1段, 图1-3	1-8
A	US 2007187248 A1 (HODKO, DALIBOR ET AL.) 2007年 8月 16日 (2007 - 08 - 16) 全文	1-8
A	CN 102539484 A (索尼公司) 2012年 7月 4日 (2012 - 07 - 04) 全文	1-8
A	CN 101697236 A (南昌航空大学) 2010年 4月 21日 (2010 - 04 - 21) 全文	1-8
A	CN 102449163 A (加利福尼亚大学董事会) 2012年 5月 9日 (2012 - 05 - 09) 全文	1-8
A	US 2008289965 A1 (ENGHETA, NADER ET AL.) 2008年 11月 27日 (2008 - 11 - 27) 全文	1-8

☒ 其余文件在C栏的续页中列出。☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

2016年 4月 13日

国际检索报告邮寄日期

2016年 4月 25日

ISA/CN的名称和邮寄地址

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088

传真号 (86-10)62019451

授权官员

王天华

电话号码 (86-10)010-61648143

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	王淑娥 等. “基于光诱导介电泳的微粒自动化操作实验研究” 微纳电子技术, 第48卷, 第2期, 2011年 2月 28日 (2011 - 02 - 28), ISSN: 1671-4776, 第133-136页	1-8

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2015/088945

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	101135680	A	2008年 3月 5日	CN	101135680	B	2011年 4月 20日
US	2007187248	A1	2007年 8月 16日	WO	2007070592	A9	2007年 8月 16日
				WO	2007070592	A3	2008年 4月 24日
				WO	2007070592	A2	2007年 6月 21日
				US	7686934	B2	2010年 3月 30日
CN	102539484	A	2012年 7月 4日	US	2012103817	A1	2012年 5月 3日
				JP	5617532	B2	2014年 11月 5日
				CN	102539484	B	2015年 9月 9日
				EP	2447703	A3	2013年 5月 29日
				EP	2447703	A2	2012年 5月 2日
				US	8828212	B2	2014年 9月 9日
				JP	2012098063	A	2012年 5月 24日
CN	101697236	A	2010年 4月 21日	CN	101697236	B	2012年 9月 19日
CN	102449163	A	2012年 5月 9日	EP	2414539	A2	2012年 2月 8日
				US	2012118740	A1	2012年 5月 17日
				WO	2010115167	A8	2011年 11月 17日
				JP	2012522518	A	2012年 9月 27日
				US	2015360236	A1	2015年 12月 17日
				WO	2010115167	A3	2011年 3月 31日
				US	9079189	B2	2015年 7月 14日
				WO	2010115167	A2	2010年 10月 7日
US	2008289965	A1	2008年 11月 27日	US	8293087	B2	2012年 10月 23日
				WO	2008051248	A3	2009年 5月 7日
				WO	2008051248	A2	2008年 5月 2日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)