



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110785654 A

(43)申请公布日 2020.02.11

(21)申请号 201880040173.2

(22)申请日 2018.06.26

(30)优先权数据

62/525,818 2017.06.28 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.12.17

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/067095 2018.06.26

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/002281 EN 2019.01.03

(71)申请人 文塔纳医疗系统公司

地址 美国亚利桑那州

(72)发明人 K·E·加尔沙 D·K·哈什曼

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

G01N 21/27(2006.01)

G01N 21/64(2006.01)

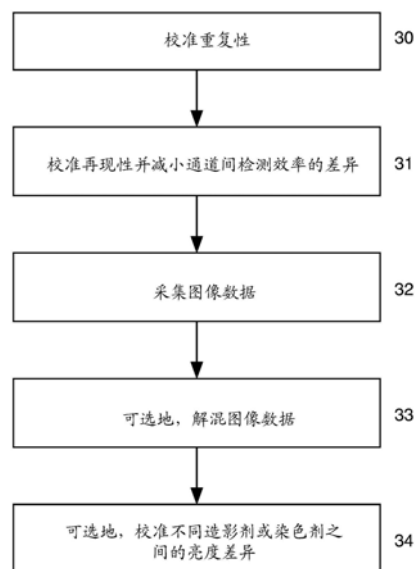
权利要求书5页 说明书25页 附图14页

(54)发明名称

系统级校准

(57)摘要

本文公开了在采集样品图像数据之前校准显微镜或成像系统的系统和方法。在一些实施方案中,公开了一种方法,包括以下步骤:(a)运行功率输出校准模块(603),以校准成像装置的重复性(30);(b)运行图像强度校准模块(604),以校准成像装置的再现性,并减轻通道之间检测效率的差异31;(c)从显微镜或成像系统收集图像数据(32);(d)可选地运行解混模块607,以将收集的图像数据解混成单独的图像通道图像(33);以及(e)可选地运行造影剂强度校正模块(605),以校准不同造影剂之间的亮度差异(34)。



1. 一种对被一种或多种染色剂染色的生物样品成像的方法, 每种染色剂标识所述生物样品中的特定目标, 所述方法包括:

为第一通道设置光源的第一功率输出, 使得达到第一预定功率值;

调整相机的第一曝光时间, 以在所述第一预定功率值下为所述第一通道产生第一目标强度;

基于所述调整后的第一曝光时间在第一通道中采集所述生物样品的第一图像; 以及

基于特定于所述第一通道内的所述一种或多种染色剂之一的第一导出图像校正因子来调整所述第一采集图像中的像素数据。

2. 根据权利要求1所述的方法, 其中所述光源的所述第一功率输出水平从所述第一通道的预先存在的校准数据中导出。

3. 根据权利要求2所述的方法, 其中所述预先存在的校准数据是功率输出对测量功率的校准曲线。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第一预定功率值特定于特定测定。

5. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述第一预定功率值对于所有通道都是相同的。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中所述第一目标强度是所述第一通道的校准样品的标准化目标强度的预定百分比。

7. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述预定百分比在所述第一通道的标准化目标强度的约20%到约500%的范围内。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其中通过以下步骤导出所述第一通道的标准化目标强度: (i) 确定多个图像通道中每一个的校准标准的校准强度值; (ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的所述校准强度值归一化到每个所述归一化校准强度值的最高强度值; (iii) 导出所述多个图像通道上归一化强度的比率; (iv) 为所述多个图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值; 以及 (v) 计算剩余图像通道的标准强度值。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中通过以下步骤来计算所述第一导出图像校正因子: (i) 归一化多种染色剂的亮度值; 以及 (ii) 从整数1中减去第一染色剂的所述归一化亮度值。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其中通过将所述第一图像中的每个像素值乘以所述第一图像校正因子来调整所述第一图像中的所述像素数据。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的方法, 其进一步包括在调整所述像素数据之前解混所述第一采集图像。

12. 一种对被一种或多种染色剂染色的生物样品成像的方法, 每种染色剂标识所述生物样品中的特定生物标记, 所述方法包括:

为多个图像通道中的每一个设置光源的功率输出, 使得达到预定功率值, 其中所述预定功率值对于每个通道基本相同, 并且其中所述功率输出对于所述多个图像通道中的每一个独立设置;

调节相机的曝光时间以产生预定功率值的目标强度, 其中独立调节所述多个图像通道中的每一个的曝光时间以产生该特定图像通道的目标强度;

基于所述调整后的曝光时间, 在所述多个图像通道的每一个中采集所述生物样品的一

系列图像;以及

基于特定于所述一种或多种染色剂中的每一个的导出图像校正因子,调整所述一系列采集图像的每一个图像中的像素数据。

13.根据权利要求12所述的方法,其中所述光源的功率输出水平从所述多个图像通道中的每一个的预先存在的校准数据中导出。

14.根据权利要求13所述的方法,其中所述预先存在的校准数据是功率输出对测量功率的校准曲线。

15.根据权利要求12至14中任一项所述的方法,其中所述预定功率值特定于特定测定。

16.根据权利要求15所述的方法,其中对于所述多个图像通道中的每个图像通道,所述预定功率值是相同的。

17.根据权利要求12至16中任一项所述的方法,其中特定通道的目标强度是该通道的校准样品的标准化目标强度的预定百分比。

18.根据权利要求17所述的方法,其中所述预定百分比的范围从该通道的标准化目标强度的大约20%到大约500%。

19.根据权利要求17所述的方法,其中通过以下步骤导出所述第一通道的标准化目标强度:(i)确定多个图像通道中每一个的校准标准的校准强度值;(ii)将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的所述校准强度值归一化到每个所述归一化校准强度值的最高强度值;(iii)导出所述多个图像通道上归一化强度的比率;(iv)为所述多个图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值;以及(v)计算剩余图像通道的标准强度值。

20.根据权利要求12至19中任一项所述的方法,其中通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子:(i)归一化多种染色剂的亮度值;以及(ii)从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。

21.根据权利要求12至20中任一项所述的方法,其中通过将每个采集图像中的每个像素值乘以相应的图像校正因子来调整每个采集图像中的所述像素数据。

22.根据权利要求12至21中任一项所述的方法,其进一步包括在调整像素数据之前解混所述采集图像。

23.一种对被一种或多种染色剂染色的生物样品成像的方法,每种染色剂选择性地对所述生物样品中的特定生物标记染色,所述方法包括:

导出多个图像通道的每个图像通道的功率值,其中每个图像通道图像的每个功率值基本相同,通过基于每个所述图像通道的功率输出校准数据调整所述多个图像通道的每个图像通道的光源的功率输出来导出所述功率值;

使用图像强度校准数据调整所述多个图像通道中的每个图像通道的曝光时间,使得所述多个图像通道中的每个图像通道上的图像强度基本相同;

基于所述调整后的曝光时间,在每个图像通道采集生物样品的多个图像,以提供一系列采集通道图像;

解混每个所述采集图像,以提供一系列解混图像通道图像;以及

基于导出的特定于所述一种或多种染色剂中的每一个的图像校正因子,调整每个解混图像通道图像中的像素数据。

24.根据权利要求23所述的方法,其中所述功率输出校准数据是光源功率输出相对于

在所述样品平面测量的功率值的查找值表。

25. 根据权利要求23至24中任一项所述的方法, 其中所述图像强度校准数据选自: (i) 所述多个图像通道中每个通道的目标强度比率, 和 (ii) 所述多个图像通道中每个通道的曝光时间相对于待成像的最长曝光时间的比率。

26. 根据权利要求23至25中任一项所述的方法, 其中通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子: (i) 归一化多种染色剂的亮度值; 以及 (ii) 从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。

27. 根据权利要求23至26中任一项所述的方法, 其进一步包括基于每个解混通道图像中的所述调整后的像素数据来量化所述生物样品中的所述一种或多种染色剂的量。

28. 一种存储计算机可执行指令的非暂时性计算机可读介质, 当所述指令被一个或多个处理器执行时, 使得所述一个或多个处理器:

使用每个通道的预先存在的功率输出校准数据为多个图像通道中的每一个设置光源的功率输出, 使得达到每个通道的预定功率值, 其中所述预定功率值对于每个通道是相同的, 并且其中所述预定功率值对于特定测定是特定的;

使用预先存在的图像强度校准数据调整每个通道的曝光时间, 使得多个图像通道中的每个通道上的图像强度基本相同;

基于所述调整后的曝光时间在每个图像通道采集生物样品的图像, 以提供一系列采集图像通道图像, 其中所述生物样品被一种或多种染色剂染色, 每种染色剂选择性地标识所述生物样品内的特定目标; 以及

基于导出的特定于所述一种或多种染色剂中的每一个的图像校正因子, 调整每个单独采集的图像通道图像中的像素数据。

29. 根据权利要求28所述的非暂时性计算机可用介质, 其中所述功率输出校准数据是与在所述样品平面测量的功率值相关的功率输出值表。

30. 根据权利要求29所述的非暂时性计算机可用介质, 其中所述图像强度校准数据是每个待成像的通道的目标强度的比率。

31. 根据权利要求30所述的非暂时性计算机可用介质, 其中通过以下步骤来导出每个待成像通道的所述目标强度的比率: (i) 确定多个图像通道的所述校准标准的强度值; (ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的强度值归一化到最高强度值; 以及 (iii) 导出所述一系列图像通道上归一化强度的比率。

32. 根据权利要求28至31中任一项所述的非暂时性计算机可用介质, 其中通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子: (i) 归一化多种染色剂的亮度值; 以及 (ii) 从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。

33. 根据权利要求28至32中任一项所述的非暂时性计算机可用介质, 其进一步包括使所述处理器在调整像素数据之前解混所述一系列采集通道图像的指令。

34. 根据权利要求28至33中任一项所述的非暂时性计算机可用介质, 其中所述染色剂是荧光团。

35. 一种成像系统, 其包括: 照明源、一个或多个透镜、相机、控制系统或计算机中的至少一者、以及权利要求28-34中任一项的非暂时性计算机可用介质。

36. 根据权利要求35所述的成像系统, 其进一步包括载玻片处理机构。

37. 根据权利要求36所述的成像系统,其中所述载玻片处理机构适于将载玻片传送到样本平面。

38. 根据权利要求36所述的成像系统,其中所述载玻片处理机构适于将功率计或校准样本之一传送到样本平面。

39. 根据权利要求38所述的成像系统,其进一步包括存储计算机可执行指令的非暂时性计算机可用介质,当所述指令被所述一个或多个处理器执行时,使得所述一个或多个处理器生成新的或修改的功率输出校准数据或图像强度校准数据。

40. 一种数字病理学系统,其包括:成像装置、和控制系统或计算机中的至少一者、以及权利要求28-34中任一项的非暂时性计算机可用介质。

41. 根据权利要求40所述的数字病理学系统,其中所述成像装置是多光谱成像装置。

42. 一种系统,其包括一个或多个处理器和联接到所述一个或多个处理器的存储器,所述存储器存储计算机可执行指令,当所述指令被所述一个或多个处理器执行时,使得所述一个或多个处理器执行操作,所述操作包括:为第一通道设置光源的第一功率输出,使得达到预定功率值;调整相机的第一曝光时间,以在所述预定功率值下为所述第一通道产生第一目标强度;基于所述调整后的曝光时间在所述第一通道采集生物样品的第一图像,其中所述生物样品被一种或多种染色剂染色,每种染色剂选择性地标识所述生物样品内的特定目标;以及基于特定于所述第一通道内的所述一种或多种染色剂之一的第一导出图像校正因子来调整所述第一采集图像中的像素数据。

43. 根据权利要求42所述的系统,其中所述光源的所述第一功率输出水平从所述第一通道的预先存在的校准数据中导出。

44. 根据权利要求43所述的系统,其中所述预先存在的校准数据是功率输出对测量功率的校准曲线。

45. 根据权利要求42至44中任一项所述的系统,其中所述第一预定功率值特定于特定测定。

46. 根据权利要求42至45中任一项所述的系统,其中所述第一预定功率值对于所有通道都是相同的。

47. 根据权利要求42至46中任一项所述的系统,其中所述第一目标强度是所述第一通道的校准样品的标准化目标强度的预定百分比。

48. 根据权利要求47所述的系统,其中所述预定百分比在所述第一通道的标准化目标强度的约20%到约500%的范围内。

49. 根据权利要求48所述的系统,其中通过以下步骤导出所述第一通道的标准化目标强度:(i) 确定多个图像通道中每一个的校准标准的校准强度值;(ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的所述校准强度值归一化到每个所述归一化校准强度值的最高强度值;(iii) 导出所述多个图像通道上归一化强度的比率;(iv) 为所述多个图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值;以及(v) 计算剩余图像通道的标准强度值。

50. 根据权利要求42至49中任一项所述的系统,其中通过以下步骤来计算所述第一导出图像校正因子:(i) 归一化多种染色剂的亮度值;以及(ii) 从整数1中减去第一染色剂的所述归一化亮度值。

51. 根据权利要求42至50中任一项所述的系统,其中通过将所述第一图像中的每个像

素值乘以所述第一图像校正因子来调整所述第一图像中的所述像素数据。

52. 根据权利要求42至51中任一项所述的系统,其进一步包括用于在调整所述像素数据之前解混所述第一采集图像的指令。

系统级校准

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2017年6月28日提交的美国临时专利申请No.62/525,818的申请日的权益,该申请的公开内容通过引用整体结合于此。

背景技术

[0003] 荧光被用作生物学研究中的工具,在成像应用中提供对比度形成。荧光信号的量化已经成为分析细胞结构和功能的重要工具。除了包括荧光蛋白在内的标记物的优异可用性之外,荧光成像在细胞生物学中成功的一个原因在于设备的成本效益。标准荧光显微镜配有许多滤波器组,通常包括激发器、发射器和二向色滤波器、以及用于激发的灯。然而,光源的功率输出随时间而变化,传递给样本的总能量可能取决于显微镜的光路、所使用的滤波器组和物镜以及它们的对准。环境的变化、滤波器组的光损伤和光源的运行时间可能导致显微镜透射特性的恶化,增加结果的可变性,并使实验的比较变得困难。

发明内容

[0004] 随着多重组织测定(例如使用荧光团的那些)变得越来越复杂,可变性的来源继续积累。同时,与基于人类的评分相比,基于计算机的评分方法需要更严格的测定容差,而且荧光测定对照明偏差特别敏感。例如,在荧光显微术中,信号是由染色剂与成像过程中暴露的光的相互作用产生的,因此,信号与图像的采集方式有着内在的联系。为了测量载玻片上的染色,必须考虑成像仪器中的任何变化和偏差,以免将成像设备中的偏差与染色特性混淆。一些校准选项,例如使用长通滤波器立方体的选项,允许成像仪器系统之间和校准周期之间的可变性大于20%。不希望受任何特定理论的束缚,相信这种大的可变性抑制了下游进行图像分析的能力。

[0005] 申请人已经开发了一种高级数字病理学系统,该系统结合了校准过程,与已知方法相比,该校准过程减少了可变性,允许在样品中存在的染色剂的测量中具有更高的准确性和再现性。申请人提出,所公开的方法的优势在于校准中考虑了来自所有系统部件的可变性。

[0006] 此外,申请人提出,本文公开的校准方法在校准过程中考虑了整个光路,并且所有部件都按照它们将在图像采集过程中被配置的那样留在“适当的位置”。这被认为能够校准整个系统,使得来自不同系统(例如仪器)的结果是可再现的,并且可以有意义地比较所采集的数据。这也允许在重新校准之间有更长的时间间隔(例如至少大约50小时的灯使用);并且相信本文概述的过程能够将灯强度保持在校准之间相机计数设定点的 $\pm 2.5\%$ 以内。申请人认为,与仅使用长通滤波器的已知校准过程相比,这能够实现一个数量级的改进。

[0007] 申请人还提出,采用该校准过程(和获取的校准数据)的系统便于标准化图像采集。例如,本文公开的系统被配置为基于导出的校准数据在仪器初始化时自动设置功率输出和曝光时间。申请人认为,这进一步减少了用户在设置校准功率时出错以及在实验过程中忘记使用校准光水平的可能性。本文描述了这些和其他优点。

[0008] 本公开的一个方面是一种对具有一种或多种染色剂的生物样品(例如组织样品)成像的方法,每个染色剂标识生物样品内的特定目标,所述方法包括:为第一通道设置光源的第一功率输出,使得达到第一预定功率值;调整成像传感器的第一曝光时间,以在所述第一预定功率值下为所述第一通道产生第一目标强度;基于所述调整后的第一曝光时间在所述第一通道中采集所述生物样品的第一图像;以及可选地,基于特定于所述第一通道内的所述一种或多种染色剂之一的第一导出图像校正因子来调整所述第一采集图像中的像素数据。在一些实施方案中,所述方法进一步包括基于每个采集图像中的调整后的像素数据量化组织样品中的一种或多种染色剂的量。

[0009] 在一些实施方案中,光源的第一功率输出或功率输出水平(在本文中可互换使用)是从第一通道的预先存在的校准数据(例如,存储在非暂时性计算机可读介质或数据库中的校准数据)中导出的。在一些实施方案中,预先存在的校准数据是如本文所述的“查找”值的表格。在一些实施方案中,预先存在的校准数据是将功率输出水平与测量功率相关联的校准曲线,即功率输出对测量功率的校准曲线。在一些实施方案中,所述第一预定功率值特定于特定测定。在一些实施方案中,所述第一预定功率值对于所有通道都是相同的(例如,PDL1测定可能要求在所有待成像通道上使用100mW的功率值)。

[0010] 在一些实施方案中,所述第一目标强度是所述第一通道的校准样品的标准化目标强度的预定百分比。在一些实施方案中,所述预定百分比在所述第一通道的标准化目标强度的约10%到约1000%的范围内。在一些实施方案中,所述预定百分比在所述第一通道的标准化目标强度的约20%到约500%的范围内。在一些实施方案中,所述预定百分比在所述第一通道的标准化目标强度的约50%到约250%的范围内。

[0011] 在一些实施方案中,通过以下步骤导出所述第一通道的标准化目标强度:(i) 确定多个图像通道中每一个的校准标准(在本文中可与术语“校准样品”互换使用)的校准强度值;(ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的所述校准强度值归一化到每个所述归一化校准强度值的最高强度值;(iii) 导出所述多个图像通道上归一化强度的比率;(iv) 为所述多个图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值;以及(v) 计算剩余图像通道的标准强度值。

[0012] 在一些实施方案中,通过以下步骤来计算所述第一导出图像校正因子:(i) 归一化多种染色剂的亮度值;以及(ii) 从整数1中减去第一染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中,通过将所述第一图像中的每个像素值乘以所述第一图像校正因子来调整所述第一图像中的所述像素数据。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在调整像素数据之前解混第一采集图像。在一些实施方案中,可以针对待成像的每个附加通道,包括第2、第3和第n通道,重复上述(或在本文中描述的)每个步骤。

[0013] 在本公开的另一个方面,提供了一种对被一种或多种染色剂染色的生物样品成像的方法,其中每种染色剂标识生物样品中的特定生物标记,所述方法包括:为多个图像通道中的每一个设置光源的功率输出,使得达到预定功率值,其中对于多个图像通道中的每一个,预定功率值基本相同,并且其中为待成像的每个通道独立设置功率输出;调节相机的曝光时间以产生预定功率值的目标强度,其中独立调节所述多个图像通道中的每一个的曝光时间以产生该特定图像通道的目标强度;基于所述调整后的曝光时间,在多个图像通道的每一个中采集所述生物样品的一系列图像;以及可选地基于特定于所述一种或多种染色剂

中的每一个的导出图像校正因子,调整所述一系列采集图像的每一个图像中的像素数据。在一些实施方案中,所述方法进一步包括基于每个采集图像中的调整后的像素数据量化组织样品中的一种或多种染色剂的量。在一些实施方案中,所述光源的功率输出水平从所述多个图像通道中的每一个的预先存在的校准数据中导出。在一些实施方案中,所述预先存在的校准数据是功率输出对测量功率的校准曲线。在一些实施方案中,所述预定功率值特定于特定测定。在一些实施方案中,对于多个图像通道中的每一个,预定功率值是相同的。

[0014] 在一些实施方案中,特定通道的目标强度是该通道的校准样品的标准化目标强度的预定百分比。在一些实施方案中,所述预定百分比在该通道的标准化目标强度的约20%到约500%的范围内。在一些实施方案中,通过以下步骤导出所述第一通道的标准化目标强度:(i) 确定多个图像通道中每一个的校准标准的校准强度值;(ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的所述校准强度值归一化到每个所述归一化校准强度值的最高强度值;(iii) 导出所述多个图像通道上归一化强度的比率;(iv) 为所述多个图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值;以及(v) 计算剩余图像通道的标准强度值。

[0015] 在一些实施方案中,通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子:(i) 归一化多种染色剂的亮度值;以及(ii) 从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中,通过将每个采集图像中的每个像素值乘以相应的图像校正因子来调整每个采集图像中的所述像素数据。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在调整像素数据之前解混所采集的图像。

[0016] 本公开的另一个方面是一种对用一种或多种造影剂染色的生物样品成像的方法,其中造影剂标记生物样品内的目标,所述方法包括以下步骤:使用每个通道的功率输出校准数据来调节待成像的每个通道的光源的功率输出,使得每个通道的功率值基本相同;使用图像强度校准数据调整每个通道的曝光时间,使得待成像的每个通道上的图像强度基本相同;基于所述调整后的曝光时间在每个通道采集生物样品的图像,以提供一系列采集通道图像;解混每个所述采集图像,以提供一系列解混图像;以及基于导出的特定于所述一种或多种染色剂中的每一个的图像校正因子,调整每个解混图像中的像素数据。在一些实施方案中,所述方法进一步包括基于每个解混图像中的所述调整后的像素数据来量化所述生物样品中的所述一种或多种染色剂的量。在一些实施方案中,所述功率输出校准数据、图像强度校准数据和图像校正因子存储在非暂时性计算机可读介质中。在一些实施方案中,实时确定功率输出校准数据、图像强度校准数据和图像校正因子。

[0017] 在一些实施方案中,所述功率输出校准数据是光源功率输出相对于在所述样品平面测量的功率值的查找值表。在一些实施方案中,所述图像强度校准数据选自:(i) 多个图像通道中每个通道的目标强度比率,和(ii) 多个图像通道中每个通道的曝光时间相对于待成像的最长曝光时间的比率。在一些实施方案中,通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子:(i) 归一化多种染色剂的亮度值;以及(ii) 从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在调整像素数据之前解混所采集的图像。

[0018] 在本公开的另一方面,是一种对被一种或多种染色剂染色的生物样品成像的方法,每种染色剂选择性地对所述生物样品中的特定生物标记染色,所述方法包括:导出多个图像通道的每个图像通道的功率值,其中每个图像通道图像的每个功率值基本相同,通过

基于每个所述图像通道的功率输出校准数据调整所述多个图像通道的每个图像通道的光源的功率输出来导出所述功率值；使用图像强度校准数据调整所述多个图像通道中的每个图像通道的曝光时间，使得所述多个图像通道中的每个图像通道上的图像强度基本相同；基于所述调整后的曝光时间在每个图像通道采集生物样品的多个图像，以提供一系列采集通道图像；解混每个所述采集图像，以提供一系列解混图像通道图像；以及基于导出的特定于所述一种或多种染色剂中的每一个的图像校正因子，调整每个解混图像通道图像中的像素数据。

[0019] 在一些实施方案中，所述功率输出校准数据是光源功率输出相对于在所述样品平面测量的功率值的查找值表。在一些实施方案中，所述图像强度校准数据选自：(i) 所述多个图像通道中每个通道的目标强度比率，和(ii) 所述多个图像通道中每个通道的曝光时间相对于待成像的最长曝光时间的比率。在一些实施方案中，通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子：(i) 归一化多种染色剂的亮度值；以及(ii) 从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中，所述方法进一步包括基于每个解混通道图像中的所述调整后的像素数据来量化所述生物样品中的所述一种或多种染色剂的量。

[0020] 在本公开的另一个方面，提供了一种存储计算机可执行指令的非暂时性计算机可读介质，当所述指令被一个或多个处理器执行时，使得所述一个或多个处理器：使用每个通道的预先存在的功率输出校准数据为多个图像通道中的每一个设置光源的功率输出，使得达到每个通道的预定功率值，其中所述预定功率值对于每个通道是相同的，并且其中所述预定功率值对于特定测定是特定的；使用预先存在的图像强度校准数据调整每个通道的曝光时间，使得多个图像通道中的每个通道上的图像强度基本相同；基于所述调整后的曝光时间在每个图像通道采集生物样品的图像，以提供一系列采集图像通道图像，其中所述生物样品被一种或多种染色剂染色，每种染色剂选择性地标识所述生物样品内的特定目标；以及基于导出的特定于所述一种或多种染色剂中的每一个的图像校正因子，调整每个单独采集的图像通道图像中的像素数据。

[0021] 在一些实施方案中，所述功率输出校准数据是与在所述样品平面测量的功率值相关的功率输出值表。在一些实施方案中，所述图像强度校准数据是每个待成像的通道的目标强度的比率。在一些实施方案中，通过以下步骤来导出每个待成像通道的所述目标强度的比率：(i) 确定多个图像通道的所述校准标准的强度值；(ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的强度值归一化到最高强度值；以及(iii) 导出所述一系列图像通道上归一化强度的比率。

[0022] 在一些实施方案中，通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子：(i) 归一化多种染色剂的亮度值；以及(ii) 从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中，所述非暂时性计算机可用介质进一步包括使所述处理器在调整像素数据之前解混所述一系列采集通道图像的指令。在一些实施方案中，所述染色剂是荧光团。在一些实施方案中，所述染色剂是发色团。

[0023] 本公开的另一方面是一种成像系统，包括：照明源(在本文中可与术语“光源”互换使用)、一个或多个透镜、相机、具有一个或多个处理器的控制系统或计算机中的至少一个、以及上述非暂时性计算机可用介质。在一些实施方案中，所述成像系统进一步包括载玻片处理机构。在一些实施方案中，所述载玻片处理机构适于将载玻片传送到样本平面。在一些

实施方案中,所述载玻片处理机构适于将功率计或校准样本之一传送到样本平面,由此功率计和/或校准样本可用于校准或重新校准仪器,或者验证存储的校准数据是准确的或在指定的公差内。在一些实施方案中,所述成像系统进一步包括存储计算机可执行指令的非暂时性计算机可用介质,当所述指令被所述一个或多个处理器执行时,使得所述一个或多个处理器生成新的或修改的功率输出校准数据或图像强度校准数据。

[0024] 在本公开的另一方面,提供了一种数字病理学系统,该数字病理学系统包括:(i) 成像装置,(ii) 控制系统或计算机中的至少一个,以及(iii) 上述非暂时性计算机可用介质。在一些实施方案中,所述成像装置是多光谱成像装置。

[0025] 在本公开的另一方面,是一种系统,其包括一个或多个处理器和联接到所述一个或多个处理器的存储器,所述存储器存储计算机可执行指令,当所述指令被所述一个或多个处理器执行时,使得所述一个或多个处理器执行操作,所述操作包括:为第一通道设置光源的第一功率输出,使得达到预定功率值;调整相机的第一曝光时间,以在所述预定功率值下为所述第一通道产生第一目标强度;基于所述调整后的曝光时间在所述第一通道采集生物样品的第一图像,其中所述生物样品被一种或多种染色剂染色,每种染色剂选择性地标识所述生物样品内的特定目标;以及基于特定于所述第一通道内的所述一种或多种染色剂之一的所述第一导出图像校正因子来调整所述第一采集图像中的像素数据。在一些实施方案中,所述光源的所述第一功率输出水平从所述第一通道的预先存在的校准数据中导出。在一些实施方案中,所述预先存在的校准数据是功率输出对测量功率的校准曲线。在一些实施方案中,所述第一预定功率值特定于特定测定。在一些实施方案中,所述第一预定功率值对于所有通道都是相同的。在一些实施方案中,所述第一目标强度是所述第一通道的校准样品的标准化目标强度的预定百分比。在一些实施方案中,所述预定百分比在所述第一通道的标准化目标强度的约20%到约500%的范围内。在一些实施方案中,通过以下步骤导出所述第一通道的标准化目标强度:(i) 确定多个图像通道中每一个的校准标准的校准强度值;(ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的所述校准强度值归一化到每个所述归一化校准强度值的最高强度值;(iii) 导出所述多个图像通道上归一化强度的比率;(iv) 为所述多个图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值;以及(v) 计算剩余图像通道的标准强度值。在一些实施方案中,通过以下步骤来计算所述第一导出图像校正因子:(i) 归一化多种染色剂的亮度值;以及(ii) 从整数1中减去第一染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中,通过将所述第一图像中的每个像素值乘以所述第一图像校正因子来调整所述第一图像中的所述像素数据。在一些实施方案中,所述系统进一步包括用于在调整所述像素数据之前解混所述第一采集图像的指令。

附图说明

[0026] 为了全面理解本公开的特征,参考了附图。在附图中,相同的附图标记始终用于标识相同的元件。

[0027] 图1A示出了包括成像装置和计算机系统的代表性数字病理学系统。

[0028] 图1B示出了包括成像装置和计算机系统的替代数字病理学系统。

[0029] 图1C示出了包括成像装置和计算机系统的另一替代数字病理学系统。

[0030] 图2阐述了可用于数字病理学系统或数字病理学工作流程中的各种模块。

- [0031] 图3阐述了可用于采集校准图像数据的一般步骤的示例。
- [0032] 图4提供了对成像系统进行校准的步骤的实施方案的概述。
- [0033] 图5A提供了用于重复性的校准过程的实施方案的概述。
- [0034] 图5B阐述了对成像系统的可重复性进行校准的代表性过程。
- [0035] 图6提供了再现性的代表性校准过程的概述。
- [0036] 图7A示出了用于导出标准目标强度值的步骤的示例。
- [0037] 图7B示出了用于计算曝光时间的步骤的示例。
- [0038] 图8示出了用于确定标准目标强度值的曝光时间的替代过程。
- [0039] 图9A阐述了使用图像校正因子调整像素值的一般步骤的实施方案。
- [0040] 图9B提供了可用于导出和应用图像校正因子的步骤的实施方案的概述。
- [0041] 图10示出了使用校准数据采集图像的步骤的实施方案。

具体实施方式

[0042] 还应该理解,除非明确指出相反的情况,否则在这里要求保护的包括多于一个步骤或动作的任何方法中,所述方法的步骤或动作的顺序不一定限于所述方法的步骤或动作被叙述的顺序。

[0043] 如本文所使用的,单数术语“一个”、“一种”以及“该”包括复数个指示物,除非上下文中另外明确指示。类似地,词语“或”旨在包括“和”,除非上下文中另外明确指示。术语“包括”被定义为包含性的,使得“包括A或B”是指包括A、B或A和B。

[0044] 如本说明书和权利要求书中所用的,“或”应被理解为与如上所定义的“和/或”具有相同含义。例如,当分隔列表中的项目时,“或”或“和/或”应被解释为包含性的,即,包括至少一个,但是也包括许多元件或元件列表中的一个以上元件以及(可选地)附加的未列出项目。只有明确指示相互矛盾,否则诸如“只有一个”或“恰好一个”或者在权利要求中使用“由...组成”将指代恰好包括许多元件或元件列表中的一个元件。一般而言,如本文中所使用的术语“或”之后有诸如“两者之一”、“中的一个”、“中的仅一个”或“中的恰好一个”之类的排他性术语时仅应被解释为指示排他性备选方案(即,“一个或另一个但不是两个”)。“基本上由...组成”在权利要求中使用时的普通意义如同在专利法领域中使用的那样。

[0045] 术语“包括(comprising)”、“包含(including)”、“具有(having)”等可互换地使用并且具有相同的意思。类似地,术语“包括”、“包含”、“具有”等可互换地使用并且具有相同的意思。具体而言,每个术语的定义与美国专利法中“包括”的一般定义一致,因此被解释为一个开放式术语,意思是“至少以下”,并且也被解释为不排除附加的特征、限制、方面等。因此,例如,“具有组件a、b和c的设备”意味着该设备至少包括组件a、b和c。类似地,短语“涉及步骤a、b和c的方法”意味着所述方法至少包括步骤a、b和c。此外,虽然步骤和过程可以在本文中以特定的顺序概述,但是本领域技术人员将认识到顺序步骤和过程可以变化。

[0046] 如本说明书和权利要求书中所使用的,关于一个或多个元件的列表,短语“至少一个”应被理解为表示选自元件列表中的任何一个或多个元件的至少一个元件,但不一定包括元件列表中具体列出的每个元件中的至少一个元件,并且不排除元件列表中元件的任何组合。该定义还允许可选地存在除在短语“至少一个”所指代的元件列表内具体表示的元件之外的元件,而无论是与具体表示的那些元件相关还是不相关。因此,作为非限制性例子,

“A和B中的至少一者”(或等同地,“A或B中的至少一者”,或等效地“A和/或B中的至少一者”)在一个实施方案中可以指代至少一个A,可选地包括一个以上A,而不存在B(并且可选地包括除B之外的元件);在另一个实施方案中,指代至少一个B,可选地包括一个以上B,而不存在A(并且可选地包括除A之外的元件);在又一个实施方案中,指代至少一个A,可选地包括一个以上A和至少一个B,可选地包括一个以上B(和可选地包括其他元件);等等。

[0047] 如本文所用,术语“生物样品”或“组织样品”指从包括病毒在内的任何生物体获取的包括生物分子(如蛋白质、肽、核酸、脂质、碳水化合物或其组合)的任何样品。生物体的其他例子包括哺乳动物(如人类;兽医动物,如猫、狗、马、牛和猪;和实验动物,如小鼠、大鼠和灵长类动物)、昆虫、环节动物、蜘蛛、有袋动物、爬行动物、两栖动物、细菌和真菌。生物样品包括组织样品(例如组织切片和组织的针活检),细胞样品(例如细胞学涂片,例如巴氏涂片或血液涂片或通过显微切割获取的细胞样品),或细胞组分、片段或细胞器(例如通过裂解细胞并通过离心或其他方式分离它们的组分获取的)。生物样品的其他例子包括血液、血清、尿液、精液、粪便、脑脊液、间质液、粘液、泪液、汗液、脓、活检组织(例如,通过外科活组织检查或针活组织检查获取的)、乳头抽吸物、耳垢、乳汁、阴道液、唾液、拭子(例如口腔拭子),或任何包含来自第一生物样品的生物分子的材料。在某些实施方案中,本文使用的术语“生物样品”指从肿瘤制备的样品(例如均质或液化样品)或从受试者获取的肿瘤的一部分。

[0048] 如本文所用,术语“生物标记”是指在血液、其他体液或组织中发现的生物分子,其是正常或异常过程的标志,或者是病症或疾病(例如癌症)的标志。生物标记可用于确定身体对疾病或病症的治疗反应如何,或者受试者是否易患疾病或病症。在癌症的情况下,生物标记是指指示体内癌症存在的生物物质。生物标记可以是肿瘤分泌的分子或机体对癌症存在的特定反应。遗传、表观遗传学、蛋白质组学、糖组学和成像生物标记可用于癌症诊断、预后和流行病学。这种生物标记可以在非侵入性收集的生物流体如血液或血清中进行测定。几种基于基因和蛋白质的生物标记已经用于患者护理,包括但不限于甲胎蛋白(肝癌)、BCR-ABL(慢性髓系白血病)、BRCA1/BRCA2(乳腺癌/卵巢癌)、BRAF V600E(黑色素瘤/结直肠癌)、CA-125(卵巢癌)、CA19.9(胰腺癌)、CEA(结直肠癌)、EGFR(非小细胞肺癌)、HER-2(乳腺癌)、KIT(胃肠间质瘤)、PSA(前列腺特异性抗原)、S100(黑色素瘤)和许多其他生物标记。生物标记可用作诊断(标识早期癌症)和/或预测(预测癌症的侵袭性和/或预测受试者对特定治疗的反应和/或癌症复发的可能性)。

[0049] 如本文所用,术语“造影剂”、“标记物”或“染色剂”是指能够结合到分析物上、被内化或以其他方式吸收并被检测到的试剂,例如通过形状、形态、颜色、荧光、发光、磷光、吸光度、磁性或放射性发射。

[0050] 如本文所用,术语“图像”、“图像扫描”或“扫描图像”包括从生物组织样品采集的原始图像数据,例如通过光学传感器或传感器阵列、或预处理图像数据。特别地,图像数据可以包括像素矩阵。

[0051] 如本文所用,术语“多通道图像”或“多重图像”包括从生物组织样品获取的数字图像,其中不同的生物结构,例如细胞核和组织结构,同时用特定的荧光染料、量子点、发色剂等染色,其每一个都发出荧光或者在不同的光谱带中可检测到,从而构成多通道图像的通道之一。

[0052] 如本文所用,术语“探针”或“寡核苷酸探针”指用于检测互补核酸靶基因的核酸分子或核酸类似物分子(例如肽核酸)。

[0053] 如本文所用,术语“载玻片”指任何合适尺寸的任何基底(例如,全部或部分由玻璃、石英、塑料、硅等制成的基底),更具体地涉及“显微镜载玻片”,例如标准的3英寸×1英寸显微镜载玻片或标准的75毫米×25毫米显微镜载玻片。可以放置在载玻片上的生物样本的例子包括但不限于细胞学涂片、薄组织切片(例如来自活组织检查)和生物样本阵列,例如组织阵列、细胞阵列、DNA阵列、RNA阵列、蛋白质阵列或其任意组合。因此,在一个实施方案中,组织切片、DNA样品、RNA样品和/或蛋白质被放置在载玻片上的特定位置。在一些实施方案中,术语载玻片可以指SELDI和MALDI芯片,以及硅晶片。

[0054] 如本文所用,术语“特异性结合实体”指特异性结合对的成员。特异性结合对是分子对,其特征在于它们相互结合,基本上排除了与其他分子的结合(例如,特异性结合对的结合常数至少比生物样品中结合对的两个成员中的任一个与其他分子的结合常数大 10^3M^{-1} 、 10^4M^{-1} 或 10^5M^{-1})。特异性结合部分的具体例子包括特异性结合蛋白(例如,抗体、适体、凝集素、抗生物素蛋白如链霉抗生物素蛋白和蛋白A)。特异性结合部分还可以包括被这种特异性结合蛋白特异性结合的分子(或其部分)。

[0055] 本文使用的术语“染色”、“染色”等通常指检测和/或区分生物样本中特定分子(如脂质、蛋白质或核酸)或特定结构(如正常或恶性细胞、胞液、细胞核、高尔基体或细胞骨架)的存在、位置和/或数量(如浓度)的生物样本的任何处理。例如,染色可以提供特定分子或特定细胞结构与生物样本周围部分之间的对比,染色的强度可以提供对样本中特定分子的量的度量。染色不仅可以用明场显微镜,也可以用其他观察工具,如相差显微镜、电子显微镜和荧光显微镜,来帮助观察分子、细胞结构和生物体。系统进行的一些染色可用于可视化细胞轮廓。系统进行的其他染色可能依赖于某些细胞成分(如分子或结构)被染色,而不会或几乎不会对其他细胞成分进行染色。由系统执行的染色方法类型的例子包括但不限于组织化学方法、免疫组织化学方法和基于分子间反应(包括非共价结合相互作用)的其他方法,例如核酸分子间的杂交反应。特定的染色方法包括但不限于初级染色方法(例如,H&E染色、巴氏染色等),酶联免疫组织化学方法,以及原位RNA和DNA杂交方法,如荧光原位杂交(FISH)和显色原位杂交(ISH)。

[0056] 如本文所用,术语“基本上”是指表现出感兴趣的特征或性质的全部或接近全部程度或程度的定性条件。本领域普通技术人员将理解,生物和化学现象很少(如果有的话)完成和/或继续完成或达到绝对结果。在一些实施方案中,“基本上”是指在大约20%以内。在一些实施方案中,“基本上”是指在大约15%以内。在一些实施方案中,“基本上”是指在大约10%以内。在一些实施方案中,“基本上”是指在大约5%以内。

[0057] 如本文所用,术语“靶”是指已经或能够确定其存在、位置和/或浓度的任何分子。靶的例子包括核酸序列和蛋白质,如本文公开的那些。

[0058] 数字病理学系统

[0059] 本公开涉及用于减少来自显微镜或成像系统的定性和/或定量结果的可变性的系统和方法,该显微镜或成像系统具有照明源、光学部分(例如一个或多个物镜)和检测部分(例如相机),该检测部分协作地设置用于获取样品(例如生物样品)的图像。如本文进一步描述的,申请人开发了一种系统级校准过程,包括至少两个校准步骤,该系统级校准过程集

成到数字病理学系统中时能够收集标准化的定量分析结果。

[0060] 用于分析样本的基于计算机的样本分析器10在图1A中示出。基于计算机的样本分析器10可以包括成像装置12(例如,具有用于扫描承载样本的显微镜载玻片的装置的设备)和计算机14,由此成像装置12和计算机14可以通信地联接在一起(例如,直接地或间接地通过网络20)。本领域技术人员将理解的是,可以利用计算机设备或系统并且本文所描述的计算机系统可以通信地耦合至附加部件,例如,样本分析器、显微镜或程序系统、自动载玻片准备装置等。这里将进一步描述这些附加部件中的一些以及可以使用的各种计算机。

[0061] 通常,成像装置12(或包括存储在存储器中的预扫描图像的其他图像源)可以包括但不限于一个或多个图像捕获设备。图像捕获设备可以包括但不限于相机(例如,模拟相机、数字相机等)、光学器件(例如,一个或多个透镜、传感器聚焦透镜组,显微镜物镜等)、成像传感器(例如,电荷耦合设备(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器等)、胶片等。在数字实施方案中,图像捕获设备可以包括协作以证明即时聚集的多个透镜。图像传感器(例如,CCD传感器)可以捕获样本的数字图像。在一些实施方案中,成像装置12是明场成像系统、多光谱成像(MSI)系统或荧光显微镜系统。

[0062] 图像或图像数据(在本文中可互换使用)可以使用扫描设备12采集,例如实时采集。在一些实施方案中,图像是从显微镜或能够捕获承载样本的显微镜载玻片的图像数据的其他仪器采集的,如本文所述。在一些实施方案中,图像是使用2D扫描仪采集的,例如能够扫描图像块的扫描仪,或者能够以逐行方式扫描图像的行扫描仪,例如VENTANA iScan HT扫描仪或VENTANA DP 200扫描仪(Ventana Medical Systems,Tucson,AZ)。或者,图像可以是先前已经采集(例如扫描)并存储在存储器602中(或者,就此而言,通过网络从服务器检索)的图像。

[0063] 本领域技术人员将理解,由成像装置12采集的数字彩色图像可以传统地由基本彩色像素组成。每个彩色像素可以在三个数字分量上编码,每个数字分量包括相同数量的位,每个分量对应于原色,通常是红色、绿色或蓝色,也由术语“RGB”分量表示。

[0064] 在一些实施方案中,作为输入接收的图像是完整的载玻片图像。在其他实施方案中,作为输入接收的图像是整个载玻片图像的一部分。在一些实施方案中,整个载玻片图像被分解成几个部分,例如瓦片,并且每个部分或瓦片可以被独立地分析。

[0065] 图1B提供了根据一个实施方案的用于对位于承载样本的显微镜载玻片134上的样本进行成像的成像系统100。成像系统100包括显微镜110、计算机14和图像捕获设备120(例如相机或成像传感器)。图像捕获设备120安装在显微镜110上,并与计算机14通信。目镜128、130可用于直接观察生物样本,或者样本可在计算机14上观察。如本文所述,生物样本可以包括一个或多个感兴趣的特征,包括靶(例如,核酸、抗原等)、标签(例如,发色标签、荧光标签、发光标签、辐射标签等)、或细胞成分(如细胞核)或结构。

[0066] 图1C提供了另一种替代的成像系统150,包括多光谱成像装置151和客户端计算机系统162。承载样本的显微镜载玻片可以被装载到成像装置152中,所述成像装置可以提供承载样本的显微镜载玻片的窄波段或波长成像、明场成像和/或荧光成像。成像装置151还可以是全载玻片扫描仪。例如,全载玻片扫描仪是VENTANA iScan HT或Ventana DP 200扫描仪,均可从Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, Arizona) 获得。成像系统150可以包括载玻片处理器机构157,其可移动以将一个或多个显微镜载玻片传送到多光谱成像装置,

并且可移动以从多光谱成像装置151移除一个或多个显微镜载玻片。载玻片处理器机构157还可用于放置或移除校准样本和/或功率传感器,以实现自动校准和/或重新校准(例如在灯使用的预定时间段之后,例如50小时、100小时等)。载玻片处理器机构157可以包括一个或多个机械臂,在x、y、z坐标轴上操作的载玻片处理器,夹持机构,传输设备等,其能够在不同位置之间传输显微镜载玻片、校准样品和/或功率计。图像可以通过直接连接(未示出)或网络161发送到客户端计算机系统162。客户端计算机系统162可以被配置成在显示器163上显示图像。

[0067] 成像装置151可以包括但不限于一个或多个图像捕获设备153和一个或多个透镜154。图像捕获设备153可以包括但不限于具有光学系统成像传感器(例如,电荷耦合器件(CCD)、互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器等)的数字成像器(例如,数字相机)等。透镜154可以合作提供聚焦(例如自动聚焦)。在一些实施方案中,图像捕获设备153具有用于产生多光谱彩色图像的红色、绿色和蓝色通道。光学系统154可以包括多个和/或可调滤波器,并且通过使用不同的滤波器和/或滤波器设置采集多个图像来创建多光谱或彩色图像通道。成像装置151还可以包括检修门158。在成像装置中也可以包括控制器。载玻片可以通过检修门158装载到成像系统151中,并且控制器可以用于控制成像装置152的操作。如本文所述,控制器可以包括一个或多个可编程处理器、存储设备等。

[0068] 参考图1A和图2,计算机系统14(或609)可以包括台式计算机、膝上型计算机、平板电脑等,数字电子电路、固件、硬件、存储器602、计算机存储介质602、计算机程序(例如,其中程序存储在存储器或存储介质中)、处理器608(包括编程处理器)等。图1所示的计算系统14可以包括具有显示设备16和外壳18的计算机。计算机系统可以以二进制形式存储数字图像(本地地存储在服务器或其他网络连接设备上)。还可以将数字图像分成像素矩阵。像素可以包括由位深来定义的具有一个或多个位的数字值。

[0069] 再次参考图1A,在一些实施方案中,网络20将成像装置12和计算机系统14互连。网络20可以包括但不限于一个或多个网关、路由器、电桥、其组合等。网络20可以包括用户可访问的、并且可以用于发送和接收计算机系统14可以利用的信息的一个或多个服务器和一个或多个网站。服务器可以包括但不限于用于存储信息(例如,数字图像、算法、染色方案、用于比较评估的截断值等)的一个或多个相关联数据库。网络20可以包括但不限于使用传输控制协议(TCP)、用户数据报协议(UDP)、互联网协议(IP)和其他数据协议的数据网络。在一些实施方案中,计算机设备或系统进一步包括显示输出或向用户、运营商或下游仪器或过程提供数据/输出的其他装置。

[0070] 图2提供了当前公开的数字病理学系统中使用的各种模块的概述。在一些实施方案中,数字病理学系统采用具有一个或多个处理器608和至少一个存储器602的计算机设备或计算机实现的方法,至少一个存储器602存储由一个或多个处理器执行的非暂时性计算机可读指令,以使一个或多个处理器执行一个或多个模块(例如,模块603至607)中的指令。替代性地,可以将这些指令存储在非暂态计算机可读介质(602)或计算机可用介质中。

[0071] 参考图2和图3,本公开提供了用于对被一种或多种染色剂染色的生物样品成像的系统和方法,每种染色剂标识生物样品中的特定目标。在一些实施方案中,所述方法包括以下步骤:(a)运行功率输出校准模块603,以校准成像装置的可重复性(步骤30);(b)运行图像强度校准模块604,以校准成像装置的再现性,并减轻通道之间检测效率的差异(步骤

31); (c) 从显微镜或成像系统601收集图像数据,并运行图像处理模块606来处理图像数据(步骤32); (d) 可选地运行解混模块607,以将收集的图像数据解混成单独的图像通道图像(步骤33); 以及(e) 可选地运行造影剂强度校正模块605,以校准不同造影剂之间的亮度差异(步骤34)。在一些实施方案中,各种模块可以使用预先存在的校准数据来设置或调整成像系统部件(例如,光源或相机)。在其他实施方案中,各种模块可以基于实时收集的校准数据来设置或调整成像系统部件(例如,光源或相机)。当然,本领域技术人员将认识到,描述用于每个模块中的任何指令、算法和滤波器都可以基于采集的图像类型和/或正在研究的样本类型进行调整或改变。本领域技术人员还将理解,额外的模块可以被结合到工作流程中。例如,可以运行图像处理模块606来将某些滤波器应用于所采集的图像,或者标识组织样品内的某些组织和/或形态结构。

[0072] 校准概述

[0073] 本公开的一个方面是在采集样品的图像数据之前校准显微镜或成像系统601的系统和方法。在一些实施方案中,样品是生物样品,其已经在测定中被染色以识别样品中的一个或多个目标(例如蛋白质、核酸等)。

[0074] 例如,生物样品可以通过应用一种或多种染色剂被染色,并且所得图像或图像数据包括对应于一种或多种染色剂中每一种的信号。在一些实施方案中,可以在多重测定中对生物样品进行两种或多种染色(从而提供多重图像)。在一些实施方案中,对生物样品进行至少两种生物标记的染色。在其他实施方案中,生物样品被染色以寻找至少两种生物标记的存在,并且还被初染剂(例如苏木精)染色。在一些实施方案中,生物标记是蛋白质生物标记和/或核酸生物标记(例如,DNA、RNA、微小RNA等)。

[0075] 在一些实施方案中,生物样品或组织样品在自动染色/测定平台中处理,该平台对样品进行染色。市场上有各种适合用作染色/检测平台的商业产品,其中一个例子是Ventana Medical Systems, Inc. (Tucson, AZ) 的Discovery™。如本文所述,相机平台还可以包括明视场显微镜,例如Ventana Medical Systems, Inc. 的VENTANA iScan HT或VENTANA DP 200扫描仪,或者具有一个或多个物镜和数字成像器的任何显微镜。可以使用用于捕获不同波长图像的其他技术。适用于对染色生物样本成像的其他相机平台在本领域是已知的,并且可从诸如Zeiss、Canon、Applied Spectral Imaging等公司购得,并且这种平台易于适用于本主题公开的系统、方法和装置。

[0076] 在一些实施方案中,本公开提供了包括至少两个校准步骤的系统级校准过程。参考图4,在一些实施方案中,第一校准步骤用于校准重复性(步骤21)并减轻通道之间照明功率的差异。该步骤允许将样品照明标准化为一个测量单位,以便可以在给定仪器上重复或在其他仪器上再现。第二校准步骤可用于校准再现性并减轻通道间检测效率的差异(步骤22)。可选的第三校准步骤校准不同造影剂之间的亮度差异(步骤23)。这里描述了这些校准步骤中的每一个以及它们如何在成像系统中实现。

[0077] 这里描述的校准过程解决了与多光谱仪器相关的四个问题。首先,是重复性的问题,即从校准标准中重复采集数据并使结果一致的能力。不希望受任何特定理论的限制,相信除非照明被校准以能够在样品平面上再现精确值,否则数据将是不可重复的。例如,来自照明源的X%功率输出一天可提供约50mW的功率,一周后可提供约48mW的功率。通过校准到测量单位(毫瓦),通过使用校准数据“拨入(dial-in)”光源的功率输出百分比,仪器可以被

设置为相同的照明功率(例如,基于特定测定中要求的功率水平的预定光源功率输出)。

[0078] 第二个问题是再现性,即在不同(配置相同)的仪器上再现标准数据并使结果可再现的能力。不希望受任何特定理论的约束,相信除非在整个系统中光学元件中存在小公差差异的校正因子,否则不同仪器的结果会有可测量的不同。例如,仪器A上的X%输出可能不同于仪器B上的X%输出。但是,通过使用绝对单位,例如毫瓦,操作员可以在仪器A和仪器B上“拨入”大约50mW。

[0079] 校准解决的第三个问题是不同通道之间的检测效率差异。第三个问题与“再现性”方面概述的情况有些相似,但是是针对照明路径而不是检测路径。第三个问题源于以下各方面的差异:(i)不同波长下相机芯片的效率,(ii)每个通道的带宽,和/或(iii)不同波长下光学器件的传输。据信,本文所述的校准过程通过对每个通道使用不同的校准曝光时间来校正差异以补偿这些差异。还认为通道之间的照明传递将有差异,并且为每个通道创建输出与功率百分比的“查找表”有助于能够在通道之间产生相等的照明。

[0080] 解决的第四个工作问题是仪器操作者倾向于错误地解释相对强度以反映存在的造影剂(或染料)的相对量。通过使用染色剂或造影剂性质的知识,可以校正数据以产生图像,该图像可以被直接解释为指示样品中染色剂或造影剂的相对量,这在表征新酶和染色技术的早期研究过程中特别有用。

[0081] 重复性/功率输出校准模块的校准

[0082] 本公开的系统级校准采用了可重复性的第一校准,即,对于调节范围内的每个功率增量和每个通道,光源或照明源输出被校准到在样品平面处测量的已知功率(步骤21和30)。更具体地,在步骤21和30执行的校准(a)确保仪器内的可重复性;(b)确保仪器之间照明的再现性(测量单位允许操作者或仪器在第一和第二仪器上再现“X”毫瓦);以及(c)确保通道之间的照明相等。

[0083] 在一些实施方案中,由功率输出校准模块603计算的功率输出校准数据被用于能够调节显微镜或成像系统601的光源,以在样品平面上为每个成像通道提供等量的已知功率。在一些实施方案中,功率输出校准数据包括功率输出水平表,因为它们对应于在样品平面处测量(或插值)的功率值。在其他实施方案中,功率输出校准数据是将功率输出水平与测量的功率值相关联的校准曲线。在一些实施方案中,功率输出校准数据存储在非暂时性计算机可用介质602中,并且可以用于在采集图像数据之前设置或调整光源的照明输出。

[0084] 为了补偿两个相同成像系统之间的光传输效率的差异和/或单个系统上该效率随时间的变化,执行成像系统的样品平面处的照明输出的校准,使得光传输路径中的所有光学元件都被考虑在内。据信,该校准过程能够将样品照明输出标准化为测量单位(例如毫瓦),而不是输出百分比。这样,照明输出可以在给定的仪器上重复和/或在其他仪器上再现。同样,据信以标准化测量单位报告样品平面处的照明水平的能力对于能够执行弱图像的根本原因分析和/或隔离照明传递子系统内的潜在缺陷(例如,光导劣化、滤波器劣化和/或中继透镜破裂)是重要的。

[0085] 在一些实施方案中,重复性校准包括将光源校准到相对于样品平面的绝对光功率单位。这是通过导出光源功率输出相对于实际记录功率值的百分比校准数据(例如,记录值表(“查找”表)或校准曲线)来实现的。参考图5A,在输出范围内调节光源(步骤210),并且使用功率计或样品平面上的其他传感器来测量实际功率值(例如毫瓦)(步骤220)。记录功率

输出相对于实际测量功率的值或百分比。在一些实施方案中,缺失值被插值(步骤230)以提供功率输出校准数据(例如,查找值表)。

[0086] 更具体地,参照图5B,显微镜和光源首先被配置为照亮第一通道(步骤240)。这可以通过选择例如光源上的特定波段或改变显微镜(或相机)上的滤波器来实现。在一些实施方案中,光源是可调节的,以允许离散输出水平覆盖从零输出到100%输出的范围。

[0087] 在一些实施方案中,为了将照明子系统与检测子系统隔离,将小传感器(例如功率计或照明计)放置在样品平面上(步骤241)。在一些实施方案中,功率计用于测量光源在样品平面处的功率输出,即通过光学器件(例如物镜和/或管透镜)和校准样品。在一些实施方案中,功率计用于测量样本级的光功率输出(瓦特)。一种合适的功率计是Excelitas Technologies公司提供的**X-Cite®**光功率测量系统。

[0088] 接下来,调整功率计以校正第一通道的中心波长的读数(步骤242)。在一些实施方案中,这是通过将中心波长信息输入商业校准功率计的接口来实现的。在其他实施方案中,特别是在使用现代功率计的情况下,待测量的波长被简单地“拨入”或“选择”。

[0089] 随后,在从零到大约100%输出的输出范围内调节光源,并且以可追踪单位(例如毫瓦)的增量记录物平面上的功率值(步骤243)。在一些实施例,以预定的规则增量(例如,5%、10%、15%增量等)测量样本平面处的光输出。然后,在每个输出水平确定的功率值被用作功率输出校准数据,例如作为光源输出水平的函数的样品平面上记录的测量值的表。该值表可用于(例如在自动成像系统中)“查找”适当的输出水平,以在特定成像通道的样品平面上产生(或达到)适当的功率值。在一些实施方案中,适当的功率值可以是特定测定或方案所需的功率值。本领域技术人员将意识到,如果输出百分比和功率之间的关系不是线性的,则可以例如使用线性插值或三次样条插值来插值测量值之间的值(步骤244)。线性插值是一种曲线拟合方法,使用线性多项式在一组离散的已知数据点的范围内构造新的数据点。样条插值基于划分为小子区间的插值区间。使用三次多项式对这些子区间中的每一个进行插值。选择多项式系数以满足某些条件(这些条件取决于插值方法)。一般要求是所有给定点的功能连续性。还可能有其他要求:节点之间的函数线性、高阶导数的连续性等等。为构造样条而求解的线性方程组通常条件非常好,因此多项式系数可以精确计算。

[0090] 如图5B所示,步骤240至244可以针对每个通道重复,例如第二、第三、第四等等,直到第n个通道(由步骤247的虚线指示)。可以为每个通道生成适当的查找值表,即应该为每个照明波长通道确定测量功率和输出设置的表值。利用该信息,所有通道可以被配置为以相同的功率(例如由测定或方案建立的预定功率值)照射样品,即,光源的功率输出可以基于该图像通道的现有校准数据针对待成像的每个通道进行调整。据信,这可能有助于促进更好的通道分离和更好的定量。

[0091] 一旦产生功率输出校准数据,它可以用于自动设置成像系统的光源的照明水平,使得照明水平匹配特定测定或方案所要求的预定功率值。例如,操作过程可能需要在所有通道上使用特定的预定成像功率值(例如100mW),并且可以使用由功率输出校准模块603导出并存储在存储器602中的功率输出校准数据来达到这样的预定功率值。例如,特定的测定可能需要在所有通道上使用特定的功率值。通过参考功率相对于输出百分比的存储值并将输出百分比调整到适当的值,可以达到特定通道的目标功率(步骤245)。在一些实施方案中,校准数据可以存储在非暂时性计算机存储器602中,并用于在每次使用成像仪器时自动

调节计算机控制的照明源,以在每个成像通道的样品平面上产生标准化功率。

[0092] 本领域技术人员还将理解,校准数据(即校准曲线或数值表)可能需要定期更新,以在照明源随时间变化时确认或重新填充照明源的特性(步骤246)。这样,图5B的步骤可以基于照明源或其他显微镜部件的操作时间以设定的时间间隔或设定的间隔重复。本领域技术人员将理解,重新建立查找表的规律性取决于光源技术和期望的精度(例如,弧光灯可能需要比发光二极管光源更频繁的重新校准)。

[0093] 用于提高再现性并减小通道/图像强度校准模块之间检测效率差异的校准

[0094] 为了标准化通道之间和系统之间的成像性能,可以采用隔离和/或补偿成像系统检测路径差异的第二级校准(步骤22和31)。更具体地,在步骤22和31执行的第二校准有助于确保仪器之间(例如,第一和第二仪器之间)的可重复性,并且有助于补偿不同通道之间的检测效率差异。

[0095] 据信,第二级校准有助于确保:(i) 校准仪器之间光学元件的微小差异;以及(ii) 校准通道之间波长通道检测效率的差异,使得在跨通道收集的数据中准确地表示已知发光的标准。因此,相信在校准(步骤22或31)之后获得的数据代表来自每个成像通道的样品的实际信号。不希望受任何特定理论的限制,相信尽管用于将光传送校准到样品平面上的标准化水平的系统和过程(步骤21或30)很重要,但它并不考虑通向相机的成像光学序列。因此,简单地确保将标准化量的光传送到样品可能不能确保在两个(或多个)相似的显微镜系统之间或者在同一系统上的两个或多个通道之间捕获的图像是等效的。

[0096] 在一些实施方案中,来自该步骤的图像强度校准数据(即,校准的曝光时间和通道之间的比率)可以存储在非暂时性计算机可读存储器602中,并且在运行时,图像强度校准数据可以用于自动调整通道曝光时间,以保持基于校准样品的标准目标强度值的设定比率,如本文所述。在一些实施方案中,图像强度校准数据包括:(i) 目标强度的比率;(ii) 相机/传感器的目标强度值;和/或(iii) 曝光时间的比率。

[0097] 参照图6,再现性校准包括两个步骤。首先,为每个通道导出标准化目标强度(STI)(步骤300)。据信,由于具有不同的(i) 滤波器带宽、(ii) 透镜透射中的波长依赖性、和/或(iii) 相机检测器的波长依赖性,成像系统中不同的成像通道对于检测来自荧光团或发色团的信号将具有不同的效率。为了对此进行补偿,使用每个照明波长下校准样品的已知相对亮度来确定每个通道的STI。随后,基于导出的STI值确定曝光时间(步骤310)。

[0098] 校准样品(例如不会光漂白的标准化光致发光样品)可以用于该第二校准过程。一般来说,这种类型的校准样品允许在每个通道中使用用于成像的实际滤波器和反射镜。在一些实施方案中,校准样品具有大的均匀区域来成像,使得可以对许多像素上的均匀特征的平均强度进行平均。在一些实施方案中,校准样品是稳定的荧光标准样品和/或成像滤光立方体。在一些实施方案中,稳定的荧光标准是可从Argolight (Pessac,法国)获得的Argo-M载玻片。其他例子包括新制备的浓度受到仔细控制的荧光染料标准溶液、放射性样品如氩基发光标准、荧光磷光体载玻片、量子点制剂和/或在可见光谱中具有已知反射率的反射镜或部分反射镜载玻片。

[0099] 在一些实施方案中,校准样品被放置在显微镜台上。在一些实施方案中,显微镜相机的像素组合(binching)和曝光时间被设置成使得校准样品能够被实时观察,例如在“实时观察”模式下。在一些实施方案中,选择物镜,使得校准标准内的特征(例如荧光特征)填充

整个相机视图(例如20倍物镜、1.6倍管透镜)。然后,选定的特征被聚焦到视图中。聚焦后,以标准功率照射样品,并调整曝光以产生预定的图像强度。

[0100] 参考图7A,为第一波长通道频带确定中心照明波长(步骤320)。然后根据给定波长下的吸收系数乘以相同给定波长下标准的量子产率来计算校准标准的亮度(步骤321),并记录该值(步骤322)。为待成像的每个图像通道计算亮度值(步骤323),即,可以为待成像的每个图像通道重复步骤320、321和322(步骤323的虚线)。

[0101] 随后,如此确定的亮度值通过除以最亮值被归一化为最亮值(步骤324)。因此,波长不产生最亮值的亮度值将是最亮值的小数部分。归一化之后,记录所有通道的亮度值的比率(步骤325)。最后,为具有最高亮度值的通道选择填充成像系统可用动态范围的预定百分比的STI值(步骤326)。在一些实施方案中,可用动态范围的预定百分比约为50%。在其他实施方案中,可用动态范围的预定百分比约为60%。在一些实施方案中,可用动态范围的预定百分比约为70%。在一些实施方案中,可用动态范围的预定百分比约为80%。在一些实施方案中,可用动态范围的预定百分比约为85%。在一些实施方案中,可用动态范围的预定百分比约为90%。在一些实施方案中,可用动态范围的预定百分比约为95%。

[0102] 导出每个图像通道的STI值(步骤327)可以包括为产生最亮值的波长选择期望的强度值,然后将该值乘以为其他通道计算的小数部分。例如,可以通过将来自步骤325的特定通道的比值乘以在步骤326确定的STI来计算其他通道的STI值。以这种方式,每个通道的STI代表在每个照明波长下样品实际亮度的估计。

[0103] 在导出每个通道的STI值之后(步骤327),这些值可用于确定每个通道的曝光时间(步骤310)。参考图7B,首先调整曝光时间,使得达到目标STI值(例如,将在传感器处提供1000个计数的曝光时间)(步骤330)。接下来,曝光时间被记录(例如在存储器中),并且与该特定通道的导出标准目标强度值的100%的值相关联(步骤331)。记录每个通道上的每个曝光时间的比率(步骤332),并用作图像强度校准数据。

[0104] 图8阐述了说明第二校准过程的步骤的另一流程图。在步骤350,确定每个图像通道处校准标准的亮度值。在一些实施方案中,亮度值可以通过吸收系数乘以量子产率来确定。荧光量子产率定义为发射的光子数除以吸收的光子数,效率为1.0是最大可能值。由于没有专门的仪器很难知道吸收的光子的精确数量,测量量子产率的典型实践依赖于将未知的和已知的标准进行比较。

[0105] 在亮度值被确定之后,可以导出归一化亮度的比率(步骤351)。例如,假设在给定照明功率水平下,三个图像通道(通道1(“CH1”)、通道2(“CH2”)和通道3(“CH3”))的亮度是已知的,则每个亮度值可以除以最高亮度值来归一化这些值。例如,如果亮度值是738、820、697,那么在归一化之后,这些亮度值变成0.9、1和0.85。在这个例子中,归一化亮度值的比率将是0.9:1:0.85。

[0106] 接下来,可以基于归一化亮度值的比率为每个图像通道计算标准目标强度值(步骤352)。可以为具有最高亮度值的通道设置初始标准亮度值。在上面的例子中,1000个计数可以分配给CH2。然后,可以通过将确定的比率乘以初始标准强度值(对于本例,900、1000、850次计数)来导出每个其他通道的标准强度值。

[0107] 随后,可以为每个通道导出曝光时间(步骤353),该曝光时间是通过调整相机或传感器的曝光设置以产生该通道的目标标准强度值而导出的。如上例所述,为了达到CH1上的

900个计数,快门或传感器可能需要曝光50ms。同样,对于CH2和CH3,曝光时间可以分别是40ms(达到1000次计数)和60ms(达到850次计数)。记录这些曝光时间(步骤354),并导出每个曝光时间相对于彼此的比率(步骤355)。例如,CH1:CH2:CH3的比例为50:40:60,或0.8:0.66:1。

[0108] 当用成像系统对组织样品成像时,上述曝光时间比可以用作图像强度校准数据。例如,如果方案要求150%的标准目标强度,曝光时间比可用于为每个通道提供新的曝光时间。对于比率0.8:0.66:1,将每个值除以0.8得到比率1:0.83:1.25。对于CH1,在100%的标准强度值(1000次计数)下使用50ms的曝光时间,在150%的标准强度值下,我们得出的曝光时间为75ms(50ms x 1.5)。CH2和CH3的新曝光时间同样被计算为分别提供62ms和93ms的曝光时间。

[0109] 虽然这种校准可以通过在纸上记录值并使用计算器导出每个通道的STI值和所需的曝光时间以简单的方式手动完成,但是校准更方便地在软件中完成,其中数据表保存在非暂时性计算机可读存储器(602)中,并由仪器(606)用来计算适当的曝光时间(604),以实现跨通道的STI,该STI与其他系统相同,其各自的曝光时间数据保存在计算机存储器中。

[0110] 成像系统应定期通过在系统上放置校准标准、选择STI曝光、收集图像数据并测量数据中产生的值以确认它们与每个通道的STI值相匹配来确认跨通道实现STI值的能力。这可以确保仪器正常工作,并且光学系统没有出现损坏。例如,这可以通过对成像系统编程以将校准样品放置(例如,用机械臂、致动器或其他传输设备)在成像平台上,然后重复上述步骤来自动化。

[0111] 作为上述过程的替代,可以调整每个通道的光水平偏移。一般来说,调整曝光时间可能是优选的,因为据信通常更容易以高分辨率调整曝光时间,并且更容易保持每个通道的照明功率相同。

[0112] 用于测定/造影剂强度校正模块的染色剂相对亮度校准

[0113] 第三校准过程(步骤23或34)可以可选地应用于调整捕获的图像,以反映产生对比度的材料量,而不是信号的相对强度,并有助于解释所得图像中的像素值。例如,给定样品中相同量的两个荧光团,荧光团“A”可以产生比相同量的荧光团“B”更多的信号。在某些情况下,这可能会使化学性能的研究难以解释。因此,该校准提供了对图像的可选调整,以使数据直接说明样品上或样品内存在的材料量。

[0114] 图9A示出了第三校准。通常,在步骤401使用解混模块607可选地解混图像之后,使用造影剂强度校正模块605导出每个造影剂(或染色剂)的图像校正因子(步骤402)。然后,针对每个单通道图像中的像素值应用来自步骤402的图像校正因子(步骤403)。步骤402和403可以针对被分析的每个造影剂或染色剂重复任意次数(404),以提供一系列图像校正因子。

[0115] 更具体地,参照图9B,确定对应于检测通道的每种造影剂(例如荧光团)的相对亮度(步骤411)。本领域技术人员将理解,通过将校准样品的吸收系数乘以给定波长(例如激发波长)下校准样品的量子产率来确定亮度(步骤410),如本文所述。一旦确定,通道激发波长下荧光团的亮度值可以存储在数据库中,例如图像分析软件中。对于测定中使用的给定染料组,亮度值可以被调用并归一化为最亮的值以产生十进制分数(步骤412)。然后,从整数1中减去每个小数部分,以导出图像校正因子,即调整像素值的量(步骤413)。最后,采集

图像内给定通道的像素值乘以图像校正因子,以补偿不同染料的吸收和量子产率的差异(414)。

[0116] 解混模块

[0117] 在多光谱成像中,线性解混可以用解混模块607来执行(步骤33),以将信号的渗漏分离到相邻通道中,并从样品中去除外来信号,例如本构自发荧光。步骤34的相对亮度校准可以可选地对线性解混后产生的图像执行,因为这些图像被认为代表感兴趣的染料(例如荧光团)的纯信号贡献。图像数据的校准可以是用于在软件中查看/分析图像的选项,可以是可逆的,并且通过诸如复选框的图形用户接口(GUI)元素触发。

[0118] 在一些实施方案中,在包括一种或多种染色剂的样品中,可以为一种或多种染色剂的每个通道产生单独的图像。本领域技术人员将理解,从这些通道提取的特征可用于描述组织的任何图像(例如细胞核、膜、细胞质、核酸等)中存在的不同生物结构。

[0119] 成像模块601提供的多光谱图像是与各个生物标记和噪声成分相关联的基础光谱信号的加权混合物。在任何特定像素,混合权重与组织中特定位置的基础共定位生物标记的生物标记表达和该位置的背景噪声成比例。因此,混合权重因像素而异。本文公开的光谱解混方法将每个像素处的多通道像素值向量分解成组成生物标记端元或组分的集合,并估计每个生物标记的各个组成染色的比例。

[0120] 解混是将混合像素的测量光谱分解成一组组成光谱或端元以及一组相应的分数或丰度的过程,这些分数或丰度表示像素中存在的每个端元的比例。具体而言,解混过程可以提取染色剂特异性通道,以使用标准类型的组织和染色剂组合所熟知的参考光谱来确定单个染色剂的局部浓度。解混可以使用从对照图像检索的或者从观察图像估计的参考光谱。解混每个输入像素的分量信号使得能够检索和分析染色特异性通道,例如H&E图像中的苏木精通道和曙红通道,或者IHC图像中的二氨基联苯胺(DAB)通道和反染色(例如苏木精)通道。术语“解混”和“颜色去卷积”或“去卷积”)等(例如,“去卷积”、“解混”)在本领域中可以互换使用。

[0121] 在一些实施方案中,使用线性解混,用解混模块205解混复用图像。线性解混在例如“Zimmermann“Spectral Imaging and Linear Unmixing in Light Microscopy”Adv Biochem Engin/Biotechnology (2005) 95:245-265”中以及在C.L.Lawson and R.J.Hanson,“Solving least squares Problems,”PrenticeHall,1974,Chapter 23, p.161中有所描述,其公开内容通过引用整体结合于此。在线性染色剂解混中,任何像素处的测量光谱($S(\lambda)$)被认为是染色剂光谱成分的线性混合,并且等于在像素处表示的每个单独染色剂的颜色参考($R(\lambda)$)的比例或权重(A)的总和

$$[0122] \quad S(\lambda) = A_1 \cdot R_1(\lambda) + A_2 \cdot R_2(\lambda) + A_3 \cdot R_3(\lambda) \dots \dots A_i \cdot R_i(\lambda)$$

[0123] 这可以更一般地表示为矩阵形式

$$[0124] \quad S(\lambda) = \sum A_i \cdot R_i(\lambda) \text{ 或 } S = R \cdot A$$

[0125] 如果有M个采集到的通道图像和N个单独的荧光团,则 $M \times N$ 矩阵R的列是单独荧光团的已知参考光谱特征,并且 $N \times 1$ 矢量A是单独荧光团的比例未知,并且 $M \times 1$ 矢量S是在像素处测量的多通道光谱矢量。在这些方程中,在获取多重图像期间测量每个像素(S)中的信号,并且通常使用相同的仪器设置,通过独立的离线方法从仅标有单一染色剂的荧光样本中确定已知染色剂的参考光谱。各种染色剂(A_i)的贡献可以通过计算它们对测量光谱中每

个点的贡献来确定。在一些实施方案中,使用最小二乘逆拟合方法来获取解决方案,所述方法通过求解以下方程组来最小化测量光谱和计算光谱之间的平方差,

$$[0126] \quad [\partial \Sigma_j \{S(\lambda_j) - \sum_i A_i \cdot R_i(\lambda_j)\}^2] / \partial A_i = 0$$

[0127] 在这个等式中,j代表检测通道的数量,i等于染色剂的数量。线性方程解通常包括允许受约束的解混来强制权重(A)求和为1。

[0128] 在其他实施方案中,使用在2014年5月28日提交的题为“Image Adaptive Physiologically Plausible Color Separation(图像自适应生理上似然颜色分离)”的W02014/195193中描述的方法来完成解混,其披露内容通过引用以其全文并入本文。一般而言,W02014/195193描述了一种通过使用迭代优化的参考向量分离输入图像的分量信号来进行解混的方法。在一些实施方案中,来自测定的图像数据与特定于测定特征的预期或理想结果相关,以确定质量度量。在低质量图像或与理想结果相关性差的情况下,调整矩阵R中的一个或多个参考列向量,并且使用调整后的参考向量迭代地重复解混,直到相关性显示出匹配生理和解剖要求的良好质量图像。解剖、生理和测定信息可用于定义应用于测量图像数据的规则,以确定质量度量。这些信息包括组织是如何染色的,组织内的哪些结构是打算染色的或不打算染色的,以及结构、染色剂和特定于正在处理的测定的标记之间的关系。迭代过程产生特定于染色的向量,该向量可以生成精确标识感兴趣结构和生物学相关信息的图像,没有任何噪声或不想要的光谱,因此适于分析。参考向量被调整到搜索空间内。搜索空间定义了参考向量可以用来表示染色剂的值的范围。搜索空间可以通过扫描包括已知或常见问题在内的各种代表性训练测定,并确定训练测定的高质量参考向量集来确定。

[0129] 在其他实施方案中,使用在2015年2月23日提交的题为“Group Sparsity Model for Image Unmixing(用于图像解混的群稀疏模型)”的W02015/124772中描述的方法来完成解混,其披露内容通过引用以其全文并入本文。总的来说,W02015/124772描述了使用组稀疏性框架来解混,其中在“相同的组”内对来自多个共存标记的染色贡献的分数进行建模,并且在不同的组中对来自多个非共存标记的染色贡献的分数进行建模,向建模的组稀疏性框架提供多个共存标记的共同定位信息,使用组套索求解建模的框架以在每个组内产生最小二乘解,其中最小二乘解对应于共存标记的解混,并且在对应于非共存标记的解混的组中产生稀疏解。此外,W02015/124772描述了一种通过输入从生物组织样品获取的图像数据、从电子存储器读取参考数据、从电子存储器读取共存数据来解混的方法,所述参考数据描述多种染色剂中每一种染色剂的染色剂颜色,所述共存数据描述染色剂的组,每个组包括可以在生物组织样本中并置的染色剂,并且每个组形成用于组套索标准的组,至少一个组具有二或更大的尺寸,并且使用参考数据作为参考矩阵来计算用于获得未混合图像的组套索标准的解。在一些实施方案中,用于解混图像的方法可以包括生成组稀疏模型,其中来自共定位标记的一部分染色贡献被分配在单个组内,来自非共定位标记的一部分染色贡献被分配在单独的组内,并且使用解混算法求解组稀疏模型以在每个组内产生最小二乘解。

[0130] 除了上述线性解混方法之外,还可以使用显微数据光谱解混的替代方法,特别是对于仅由少数光谱通道组成的数据集,其中所述方法基于不同图像通道中像素的强度值的相关性(这可以在类似于细胞荧光测定中使用的散点图中可视化)。然后,通过在散点图中

找到所需荧光团的分布角度,并通过将它们正交化成单独的通道(将它们“拉伸”到散点图的不同轴上),来实现解混。所述方法原则上不需要关于光谱的先验信息,因为主要分布可以通过线拟合找到。(见Zimmermann,上文)。

[0131] 显微镜/成像系统/造影剂(染色剂)

[0132] 通常,如本文所述,显微镜或成像系统601包括被配置为照射目标样品的照明源、被配置为产生被照射目标样品的放大图像的光学器件、以及被配置为捕获放大图像的数字图像的检测器,例如数字相机。定量结果可以通过操纵捕获的数字图像(例如,利用图像处理模块606)来获取。这种图像处理可以包括本领域技术人员已知的图像处理技术。在至少一些实施方案中,借助于一个或多个处理器608来完成一个或多个这样的图像捕获和图像操作。一个或多个处理器608可以包括实现存储在非暂时性计算机可读存储器602中的预编程指令的计算机609。

[0133] 这里描述的系统 and 过程一般适用于任何结合有照明源的显微镜系统。可以使用该系统 and 过程的至少一些显微镜系统的例子包括光学显微镜、荧光显微镜和共焦激光扫描显微镜。显微镜系统的一个例子是康涅狄格州纽黑文市HistoRx, Inc. 的PM-2000仪器。该系统 and 过程对于旨在提供半定量或定量结果的系统特别有用。示例性应用包括在病理学领域中使用的免疫组织化学(IHC)(参见,例如,Immunohistochemistry and Quantitative Analysis of Protein Expression, M. Cregger等人, Arch. Pathol. Lab. Med., Vol. 130, July 2006 at pgs. 1026-1030)。通常,这些结果基于使用显微镜系统检查的样品的染色强度。

[0134] 从其上设置有组织样本的载玻片采集图像,其中组织样本已经被染色,因此组织样本包括一种或多种可检测的染色剂或造影剂。染色剂或造影剂是能够产生可检测(例如视觉、电子或其他)信号的分子或材料,该信号指示样品中标记的存在和/或浓度(该标记指示靶或生物标记的近似位置)。在一些实施方案中,被检测的染色剂或造影剂包括一个或多个量子点、荧光团、酶沉积荧光团或发色染色剂,或它们的任意组合。

[0135] 有多种荧光团和发色造影剂或染色剂可供选择。通常,最常用的荧光团属于几种常见的化学类别,包括香豆素、荧光素、罗丹明和氰化物。银染色和快速红色染色是本领域技术人员可以使用的酶沉积发色或吸光染色的例子。例如,在Sambrook等人的Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 和 Ausubel等人的Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and Wiley-Intersciences (1987) 中讨论了用于标记和指导选择适合各种目的的标记的方法,这些文献的公开内容在此引入作为参考。当然,熟练的技术人员将能够调整这里采用的方法以适应这些和其他试剂,从而可以进行染色质量和/或均匀性评估。

[0136] 在免疫荧光中,荧光产物沉积在抗原的位置,允许抗原在样品中的视觉定位。在照片捕获之后,反应产物可以通过图像分析软件(例如,利用图像处理模块606)量化。此外,抗原可以位于特定的细胞位置(例如,核、细胞器、细胞质、膜)或细胞外位置(例如,参见Camp等人, Nature Medicine 8(11) 1323-1327, 2002)。

[0137] 在一些实施方案中,对于荧光IHC,从用蛋白质生物标记特异性抗体和次级荧光检测试剂(在本文中也称为染料、染色剂或造影剂)染色的同一目标组织样品获取多个数字图像。不希望受任何特定理论的束缚,据信,当优化时,荧光染色剂提供了比基于吸光度的发

色染色剂更宽的动态范围。每个数字图像可以使用不同的光学滤波器来获取,该光学滤波器被配置为通过相应的一个次级荧光信号。因此,为每个次级荧光信号获取至少一个相应的数字图像。在一些实施方案中,为了定量分析,对捕获的数字图像进行操作(例如,使用图像处理软件)以获取组织样品的相应分数。

[0138] 虽然本文描述的技术最初是为荧光而开发的,但广义校准过程也适用于用吸光色原染色的载玻片的多光谱捕获。发色体包括苏木精和曙红。发色染色剂进一步包括例如快红、3,3'-二氨基联苯胺(DAB)和基于酞酰胺的发色物质(如美国申请公开号2012/0171668中公开的,本文中将其公开内容全文引入作为参考)和酞甲基化发色物质(如美国申请公开号2017/0089911中公开的,其公开内容在此全文引入作为参考)。适合使用的其他发色组分包括在PCT公开号W0/2018/002015中描述的那些,其公开内容通过引用整体结合于此。在一些实施方案中,组织样品用初染剂(例如苏木精)染色。在一些实施方案中,组织样品也用次级染色剂(例如曙红)染色。在一些实施方案中,组织样品在特定生物标记的IHC测定中被染色。当然,本领域技术人员将理解,也可以用一种或多种荧光团染色任何生物样品。

[0139] 用于明场图像捕获的仪器配置将涉及明场和荧光照明的不同带通。多光谱捕获的仪器配置也将涉及不同的检测带通,在荧光的情况下也是如此。用于描述捕获数据的特定带通的术语是“通道”。

[0140] 使用校准数据采集图像的方法

[0141] 在本公开的另一方面,提供了一种用于采集用一种或多种造影剂染色的组织样品的图像的方法,由此所述方法利用校准数据,使得定性和/或定量结果的可变性降低。一般而言,参考图10,所述方法包括:(i)使用功率输出校准数据来为待成像的每个通道设置光源的功率输出(步骤500);(ii)使用曝光校准数据为待成像的每个通道设置适当的曝光时间,使得每个通道上的图像强度相同(501);(iii)采集每个待成像通道的图像数据(502);(iv)可选地解混所采集的图像(步骤503);以及(v)可选地将图像校正因子应用于采集的图像或解混的图像(步骤504)。在一些实施方案中,功率输出校准数据和/或曝光校准数据存储在非暂时性计算机可读存储器中(602)。在一些实施方案中,并且基于在本文中描述的过程,成像系统10可以基于存储在存储器602中的功率输出校准数据,被自动设置为待成像的每个通道的标准化相等照明输出功率。同样地,再次基于本文描述的过程,可以基于存储在存储器602中的图像强度校准数据自动调整成像系统内的相机的曝光时间,使得可以采集具有相似强度的图像。此外,可以基于每种染色剂的图像校正因子、存储在存储器602中并在图像采集和/或图像解混之后自动应用的图像校正因子来调整任何采集的图像(或解混的图像)中的像素。

[0142] 在一些实施方案中,提供了一种用于对被一种或多种染色剂染色的生物样品进行成像的方法,每种染色剂选择性地标识生物样品中的特定目标或生物标记,所述方法包括:为待成像的每个通道设置光源的功率输出,使得达到预定功率值,其中预定功率值对于待成像的每个通道基本相同,并且其中功率输出对于待成像的每个通道独立设置;调节相机的曝光时间以产生预定功率值的目标强度,其中独立调节每个待成像通道的曝光时间以产生该特定通道的目标强度;基于调整后的曝光时间在每个待成像通道采集生物样品的一系列图像;以及基于特定于所述一种或多种染色剂中的每一个的导出图像校正因子来调整每个采集图像中的像素数据。在一些实施方案中,光源的功率输出水平是从待成像的每个通

道的预先存在的校准数据中导出的。在一些实施方案中,所述预先存在的校准数据是功率输出对测量功率的校准曲线。在一些实施方案中,预先存在的校准数据是列出功率输出相对于测量功率(或插值功率值)的表,该功率是在样品平面处测量的。在一些实施方案中,所述预定功率值特定于特定测定。例如,预定功率值的范围可以从大约20mW到大约500mW。在一些实施方案中,对于待成像的所有通道,预定功率值基本相同。“基本相同”是指每个通道的功率值在彼此的10%以内。在其他实施方案中,“基本相同”是指每个通道的功率值在彼此的5%以内。在其他实施方案中,“基本相同”是指每个通道的功率值在彼此的2%以内。在一些实施方案中,使用本文所述的功率输出校准模块603来计算功率输出值

[0143] 在一些实施方案中,特定通道的目标强度是该通道的校准样品的标准化目标强度的预定百分比。例如,预定百分比可以在标准化目标强度的大约10%到大约1000%的范围内。在其他实施方案中,所述预定百分比可以在所述标准化目标强度的约20%至约500%的范围内。在其他实施方案中,所述预定百分比可以在所述标准化目标强度的约50%至约250%的范围内。

[0144] 在一些实施方案中,通过以下步骤导出每个通道的所述标准化目标强度:(i) 确定多个图像通道的所述校准标准的校准强度值;(ii) 将所述多个图像通道中的每一个的校准标准的校准强度值归一化到最高强度值;(iii) 导出所述一系列图像通道上归一化强度的比率;(iv) 为所述一系列图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值;以及(v) 计算剩余图像通道的标准强度值。在一些实施方案中,使用如本文所述的图像强度校准模块604来计算标准目标强度值。

[0145] 在一些实施方案中,通过以下步骤来计算所述导出的图像校正因子:(i) 归一化多种染色剂的亮度值;以及(ii) 从整数1中减去每种染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中,通过将每个采集图像中的每个像素值乘以相应的图像校正因子来调整每个采集图像中的所述像素数据。在一些实施方案中,使用造影剂强度校正模块605导出图像校正因子。在一些实施方案中,所述方法进一步包括在调整像素数据之前解混所采集的图像。在一些实施方案中,使用解混模块607对采集的图像进行解混。

[0146] 在一些实施方案中,是一种对被一种或多种染色剂染色的生物样品成像的方法,每种染色剂选择性地对特定生物标记染色,所述方法包括:为第一通道设置光源的第一功率输出,使得达到预定功率值;调整相机的第一曝光时间,以在所述预定功率值下为所述第一通道产生第一目标强度;基于所述调整后的曝光时间在第一通道采集生物样品的第一图像;并且基于特定于所述第一通道内的所述一种或多种染色剂之一的第一导出图像校正因子来调整所述第一采集图像中的像素数据。在一些实施方案中,所述光源的功率输出水平是从第一通道的预先存在的校准数据中导出的。在一些实施方案中,所述预先存在的校准数据是功率输出对测量功率的校准曲线。在一些实施方案中,预定功率值特定于特定的测定或方案(例如,要求100mW功率值的测定或方案)。在一些实施方案中,对于待成像的所有通道,预定功率值是相同的(例如,第一通道为100mW,第二通道为100mW,第三通道为100mW,等等)。在一些实施方案中,所述第一目标强度是校准样品的标准化目标强度的预定百分比。在一些实施方案中,所述预定百分比在所述标准化目标强度的约20%至约150%的范围内。在一些实施方案中,所述预定百分比在所述标准化目标强度的约50%至约150%的范围内。在一些实施方案中,通过以下步骤来导出所述第一通道的标准化目标强度:(i) 确定多

个图像通道的校准标准的强度值；(ii) 将多个图像通道中的每一个的校准标准的强度值归一化到最高强度值；(iii) 导出所述一系列图像通道上归一化强度的比率；(iv) 为所述一系列图像通道中最亮的图像通道分配目标强度值；以及(v) 计算剩余图像通道的标准强度值。在一些实施方案中，通过以下步骤来计算所述第一导出图像校正因子：(i) 归一化多种染色剂的亮度值；以及(ii) 从整数1中减去第一染色剂的所述归一化亮度值。在一些实施方案中，通过将所述第一图像中的每个像素值乘以所述第一图像校正因子来调整所述第一图像中的所述像素数据。

[0147] 在一些实施方案中，所述方法进一步包括为第二通道设置光源的第二功率输出，使得达到预定功率值；调整相机的第二曝光时间，以在所述预定功率值下为所述第二通道产生第二目标强度；基于调整后的曝光时间在第二通道采集生物样品的第二图像；以及基于特定于第二通道内的一种或多种染色剂之一的第一导出图像校正因子来调整第二采集图像中的像素数据。当然，本领域技术人员将理解，对于每种生物染色剂，上述方法可以重复任何次数。

[0148] 用于实施本公开的实施方案的其他部件

[0149] 本公开的计算机系统可以连接到样本处理装置，该样本处理装置可以对生物样本执行一个或多个准备过程。制备过程可以包括但不限于对样本进行脱蜡、调节样本（例如，细胞调节）、染色样本、执行抗原修复、执行免疫组织化学染色（包括标记）或其他反应、和/或执行原位杂交（例如，SISH、FISH等）染色（包括标记）或其他反应，以及制备用于显微镜、微量分析、质谱方法或其他分析方法的样本的其他处理。

[0150] 处理装置可以将固定剂应用于样本。固定剂可以包括交联剂（诸如，醛类，例如甲醛、多聚甲醛、戊二醛以及非醛类交联药剂）、氧化剂（例如，金属离子和诸如四氧化锇和铬酸等复合物）、蛋白质变性剂（例如，醋酸、甲醇和乙醇）、未知机制的固定剂（例如，氯化汞、丙酮和苦味酸）、组合试剂（例如，卡诺固定剂（Carnoy's fixative）、甲氧基乙酰苯胺、波恩氏溶液（Bouin's fluid）、B5固定剂、罗斯曼溶液（Rossman's fluid）、詹德莱溶液（Gendres fluid））、微波和混杂固定剂（例如，排出体积固定和蒸气固定）。

[0151] 如果样本是嵌入石蜡中的样品，则可以使用（多种）适当的去石蜡流体对样品进行脱石蜡。除去石蜡后，任何数量的物质都可以连续施加到样本上。这些物质可以用于预处理（例如，反向蛋白质交联、暴露核酸等）、变性、杂交、洗涤（例如，严格性洗涤）、检测（例如，将视觉或标记分子连接到探针）、扩增（例如，扩增蛋白质、基因等）、反染色、盖玻片等。

[0152] 样本处理装置可以向样本施加各种物质。这些物质包括但不限于染色剂、探针（例如包含有助于标记样品中目标的特定结合实体的探针）、试剂、冲洗剂和/或调节剂。物质可以是流体（例如，气体、液体或气体/液体混合物）等。流体可以是溶剂（例如，极性溶剂、非极性溶剂等）、溶液（例如水溶液或其他类型的溶液）等。试剂可以包括但不限于染色剂、润湿剂、抗体（例如，单克隆抗体、多克隆抗体等）、抗原回收流体（例如，基于水性或非水性的抗原修复溶液、抗原回收缓冲液等）等。探针可以是附接至可检测的标记或报告分子的分离的核酸或分离的合成寡核苷酸。标记可包括放射性同位素、酶底物、辅因子、配体、化学发光或荧光剂、半抗原和酶。

[0153] 样本处理设备可以是自动化设备，例如Ventana Medical Systems, Inc. 出售的BENCHMARK XT仪器和SYMPHONY仪器。Ventana Medical Systems, Inc. 是许多美国专利的受

让人,这些专利公开了用于执行自动分析的系统和方法,包括美国专利第5,650,327号、第5,654,200号、第6,296,809号、第6,352,861号、第6,827,901号和第6,943,029号以及美国公开专利申请第20030211630号和第20040052685号,这些专利申请的全部内容通过引用结合于此。替代性地,可以手动处理样本。

[0154] 在处理样本之后,用户可以将带有样本的载玻片运送到成像装置。在一些实施方案中,成像装置是明场成像器载玻片扫描仪。一种明场成像器是Ventana Medical Systems, Inc. 出售的iScan超线程和DP200明场扫描仪。在自动化实施方案中,成像装置是如在题为IMAGING SYSTEM AND TECHNIQUES的国际专利申请号:PCT/US2010/002772(专利公开号:WO/2011/049608)中公开的或者在2011年9月9日提交的题为IMAGING SYSTEMS, CASSETTES, AND METHODS OF USING THE SAME的美国专利公开号2014/0178169中公开的数字病理学设备。

[0155] 成像系统或装置可以是多光谱成像(MSI)系统或荧光显微镜系统。这里使用的成像系统是MSI。MSI通常通过提供对像素级下的图像的光谱分布的访问来配备病理样本的分析和基于计算机化显微镜的成像系统。虽然存在各种多光谱成像系统,但是所有这些系统共有的操作方面是形成多光谱图像的能力。多光谱图像是捕获特定波长或跨电磁波谱的特定光谱带宽的图像数据的图像。可以通过光学滤波器或通过使用能够选择预定光谱分量的其他仪器来挑选这些波长,该预定光谱分量包括在可见光范围之外的波长处的电磁辐射,例如红外(IR)。

[0156] MSI系统可以包括光学成像系统,该光学成像系统的一部分包含光谱选择性系统,该光谱选择性系统可调谐以定义预定数量的N个离散光学带。该光学系统可以适于将生物样品成像,该生物样品用宽带光源透射照射到光学检测器上。在一个实施方案中可以包括放大系统(诸如,例如,显微镜)的光学成像系统具有通常在空间上与光学系统的单个光学输出对准的单个光轴。当光谱选择系统被调整或调谐(例如用计算机处理器)时,该系统形成生物样品的图像序列,以确保图像是在不同的离散光谱带中采集的。该装置可以另外包含显示器,在该显示器中出现来自采集图像序列的生物样本的至少一个视觉上可感知的图像。光谱选择系统可以包括光学色散元件,诸如衍射光栅、光学滤波器(诸如薄膜干涉滤波器)的集合,或适于响应于用户输入或预编程处理器的命令从光源通过样品朝向检测器透射的光谱中选择特定通带的任何系统。

[0157] 在替代性实施方式中,光谱选择系统定义了对应于N个离散光谱带的若干光输出。这种类型的系统从光学系统输入透射光输出,并且沿着N个空间上不同的光路在空间上重定向这个光输出的至少一部分,其方式为将经识别的光谱带中的样品沿着对应于这个经识别的光谱带的光路成像到检测器系统上。

[0158] 在本说明书中描述的主题和操作的实施方案可以在数字电子电路中或在计算机软件、固件、或硬件(包括在本说明书中公开的结构及其结构等同物)、或它们中的一个或多个的组合中实施。本说明书中所描述的主题的实施方案可以被实现为一个或多个计算机程序,即在计算机存储介质上编码的以用于由数据处理装置来执行或者用以控制数据处理装置的操作的计算机程序指令的一个或多个模块。本文描述的任何模块可以包括由(多个)处理器执行的逻辑。如本文所使用的“逻辑”指的是具有可以应用于影响处理器操作的指令信号和/或数据形式的任何信息。软件是逻辑的例子。

[0159] 计算机存储介质可以是机器可读存储设备、机器可读储存基板、随机或串行存取存储器阵列或设备、或其中的一项或多项的组合。此外,虽然计算机存储介质不是传播信号,但是计算机存储介质可以是以人工生成的传播信号编码的计算机程序指令的源或目的地。计算机存储介质还可以是或可以包括在一个或多个单独的物理部件或介质(例如,多个CD、磁盘或其他存储设备)中。可以将本说明书中描述的操作实施为由数据处理装置对存储在一个或多个计算机可读存储设备上或从其他源接收的数据执行的操作。

[0160] 术语“程序处理器”包括用于处理数据的所有种类的装置、设备和机器,包括例如可编程微处理器、计算机、芯片上系统或多个芯片上系统、或前述的组合。所述装置可以包括专用逻辑电路,例如FPGA(现场可编程门阵列)或ASIC(专用集成电路)。除了硬件之外,装置还可包括为所讨论的计算机程序创造执行环境的代码,例如,组成处理器固件、协议栈、数据库管理系统、操作系统、跨平台运行时环境、虚拟机、或其中的一个或多个的组合的代码。装置和执行环境可以实现各种不同的计算模型基础结构,诸如web服务、分布式计算和网格计算基础结构。

[0161] 计算机程序(亦称程序、软件、软件应用、脚本或者代码)可以被写为任何形式的编程语言(包括编译或者解释语言、说明或者过程语言),并且该计算机程序可以任何形式被采用,这些形式包括作为独立程序或者作为模块、部件、子程序、对象或者适用于计算环境的其他单元。计算机程序可以但不需要对应于文件系统中的文件。可以将程序存储在保持其他程序或数据的文件(例如,存储在标记语言文档中的一个或多个脚本)的一部分中、专用于所讨论的程序的单个文件中或者多个协调文件(例如,存储一个或多个模块、子程序或部分代码的文件)中。计算机程序可以被部署成在一个计算机上或者在位于一个站点或跨多个站点分布并且通过通信网络互连的多个计算机上执行。

[0162] 本说明书中所描述的过程或逻辑流程可以由执行一个或多个计算机程序的一个或多个可编程处理器来执行以便通过操作输入数据并生成输出来执行动作。这些过程和逻辑流程还可以由装置执行,并且装置还可以被实施为专用逻辑电路,例如,FPGA(现场可编程门阵列)或者ASIC(专用集成电路)。

[0163] 举例来说,适合于执行计算机程序的处理器包括通用和专用微处理器、以及任何类型的数字计算机的任何一个或多个处理器。通常来说,处理器将从只读存储器或随机存取存储器或二者中接收指令和数据。计算机的必不可少的元件是用于根据指令执行动作的处理器和用于存储指令和数据的一个或多个存储器设备。通常,计算机还将包括用于存储数据的一个或多个大容量存储设备(例如,磁盘、磁光盘或者光盘),或者被可操作地耦合以从大容量存储设备中接收数据或者向大容量存储设备传送数据,或者两者。然而,计算机无需具有这样的设备。此外,计算机可以嵌入在另一个设备中,例如移动电话、个人数字助理(PDA)、移动音频或视频播放器、游戏控制台、全球定位系统(GPS)接收器或便携式存储设备(例如,通用串行总线(USB)闪存驱动器),仅举几例。适用于存储计算机程序指令和数据的设备包括所有形式的非易失性存储器、介质和存储器设备,举例来讲,包括半导体存储器设备(例如,EPROM、EEPROM、以及闪存存储器设备)、磁盘(例如,内置硬盘或可移除盘)、磁光盘、以及CD ROM和DVD-ROM盘。处理器和存储器可以由专用逻辑电路补充或结合在其中。

[0164] 为了提供与用户的交互,本说明书中所描述的主题实施方案可以在具有用于向用户显示信息的显示设备(例如,LCD(液晶显示器)、LED(发光二极管)显示器或OLED(有机发

光二极管)显示器)以及通过其用户可以向计算机提供输入的键盘和定点设备(例如鼠标或轨迹球)的计算机上实施。在一些实施方案中,触摸屏可用于显示信息并接收来自用户的输入。还可以使用其他种类的设备来提供与用户的交互;例如,提供给用户的反馈可以是任何形式的感官反馈,例如,视觉反馈、听觉反馈或触觉反馈;并且可以以任何形式来接收来自用户的输入,包括声学、语音或触觉输入。另外,计算机可以通过向用户使用的设备发送文档和从用户使用的设备接收文档(例如,通过响应于从web浏览器接收的请求将网页发送到用户的客户端设备上的web浏览器)来与用户交互。

[0165] 可以在计算系统中实施在本说明书中所描述的主题的实施方案,该计算系统包括后端部件(例如,作为数据服务器)、或包括中间件部件(例如,应用服务器)、或包括前端部件(例如,具有图形用户界面或Web浏览器的客户端计算机,用户可以通过其与在本说明书中所描述的主题的实施方式交互)、或一个或多个这种后端、中间件或前端部件的任何组合。系统的部件可以通过数字数据通信(例如,通信网络)的任何形式或介质来进行互连。通信网络的例子包括局域网(“LAN”)和广域网(“WAN”)、互联网络(例如,互联网)、以及对等网络(例如,自组织对等网络)。例如,图1的网络20可以包括一个或多个局域网。

[0166] 计算系统可以包括任何数量的客户端与服务器。客户端和服务端通常远离彼此并且通常通过通信网络进行交互。客户端和服务器的关系是通过在相应计算机上运行的并且彼此之间具有客户端-服务器关系的计算机程序而产生的。在一些实施方案中,服务器将数据(例如,HTML页面)发送到客户端设备(例如,目的是向与客户端设备交互的用户显示数据和从该用户接收用户输入)。可以从服务器处的客户端设备接收在客户端设备处生成的数据(例如,用户交互的结果)。

[0167] 本说明书中提到的和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物通过引用整体并入本文。如果需要,可以修改实施方案的方面,以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供进一步的实施方案。

[0168] 尽管已经参考多个说明性实施方案描述了本公开,但是应当理解,本领域技术人员可以设计出在本公开的原理的精神和范围内的许多其他修改和实施方案。更具体地,在不脱离本公开的精神的情况下,在前述公开、附图和所附权利要求的范围内,主题组合布置的组成部分和/或布置中的合理变化和修改是可能的。除了部件和/或布置的变化和修改之外,替代用途对于本领域技术人员也是显而易见的。

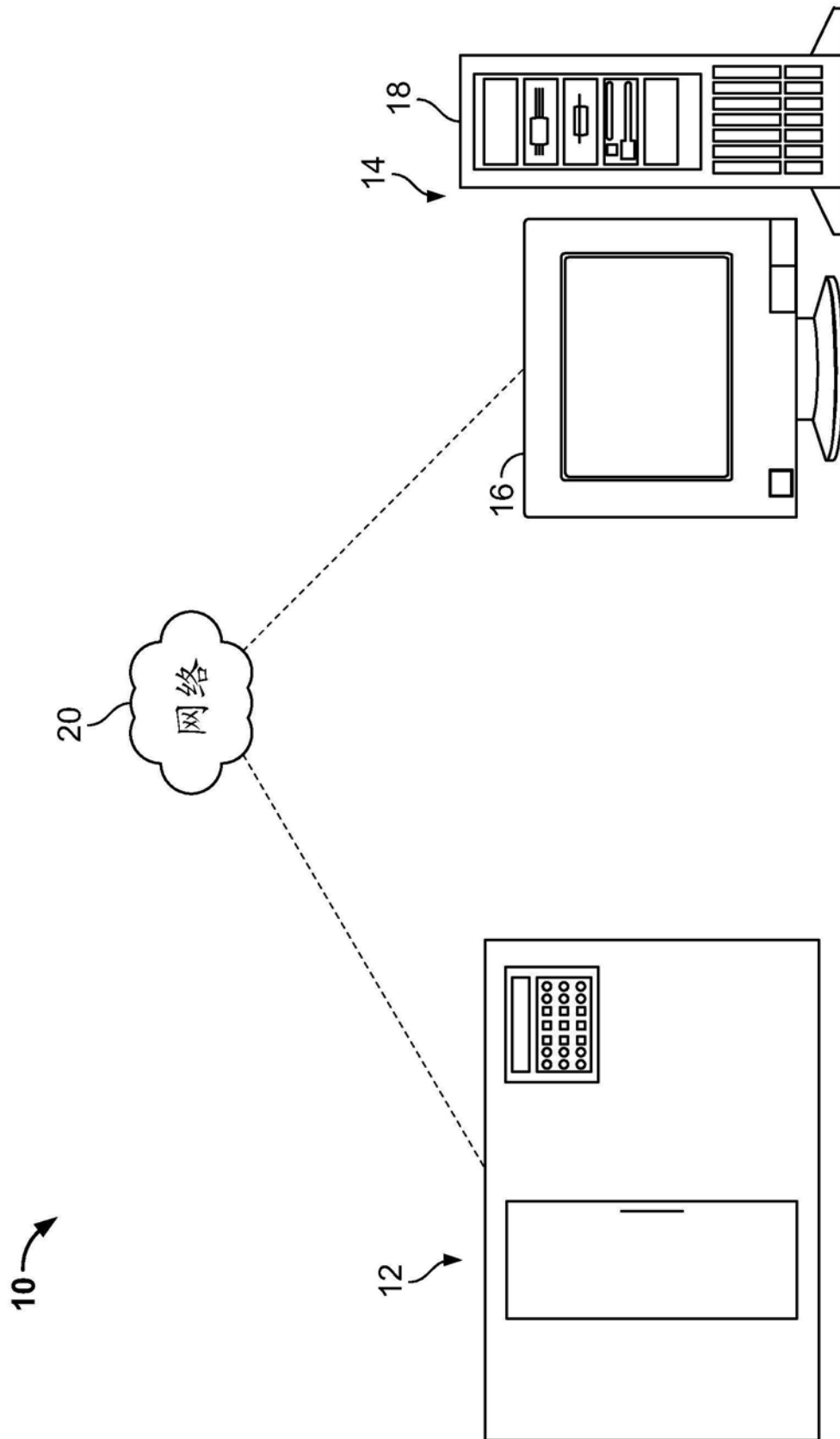


图1A

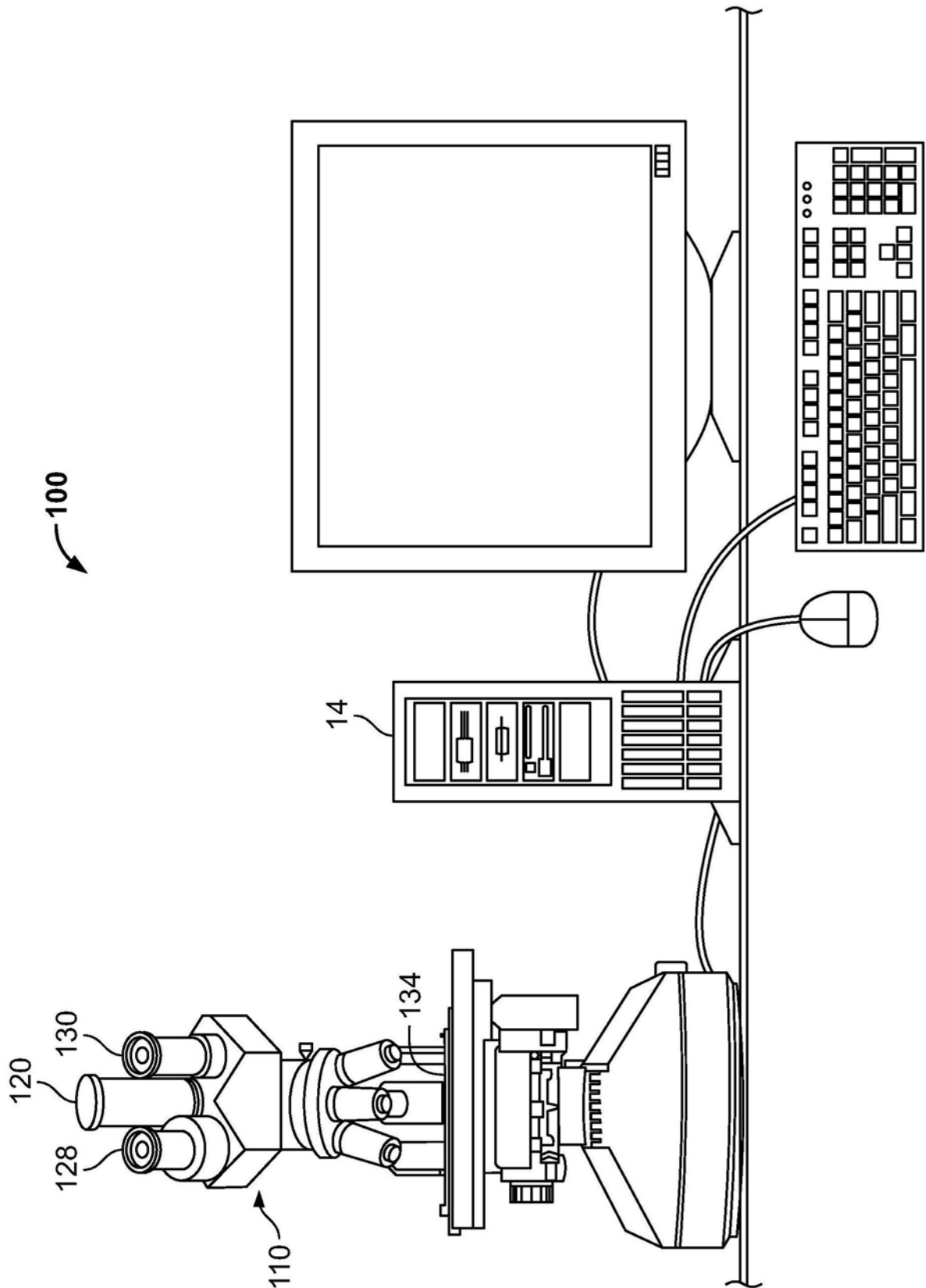


图1B

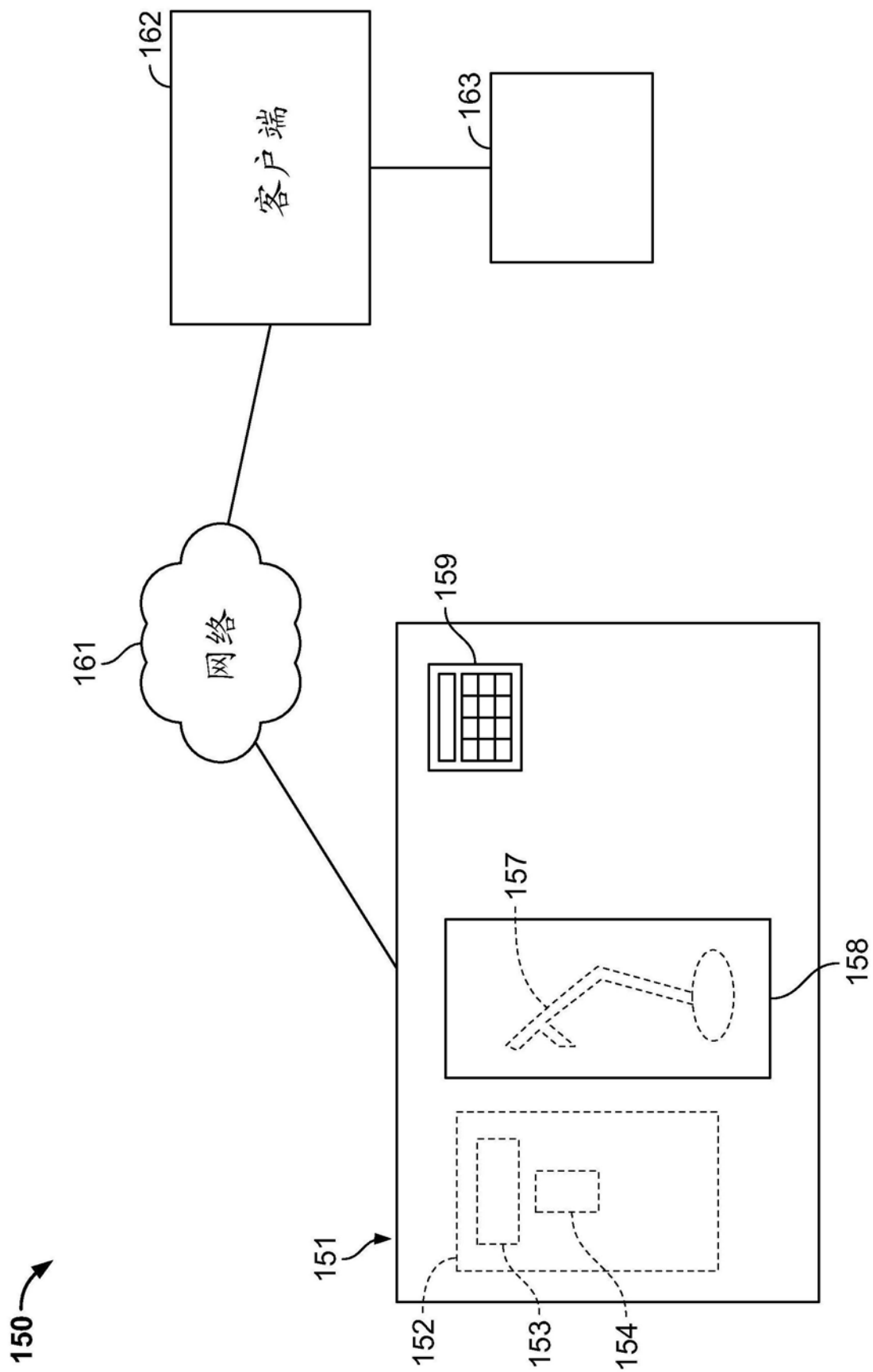


图1C

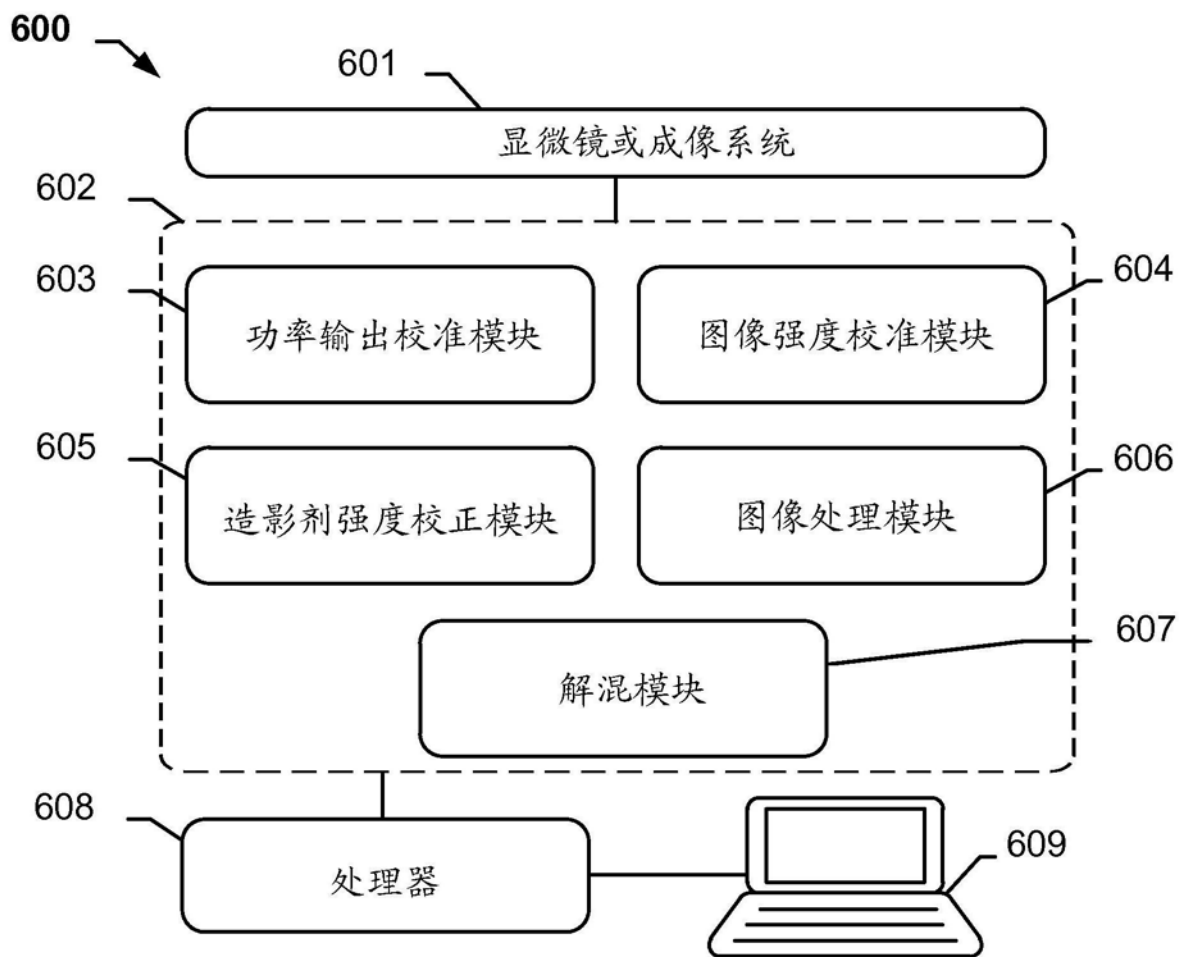


图2

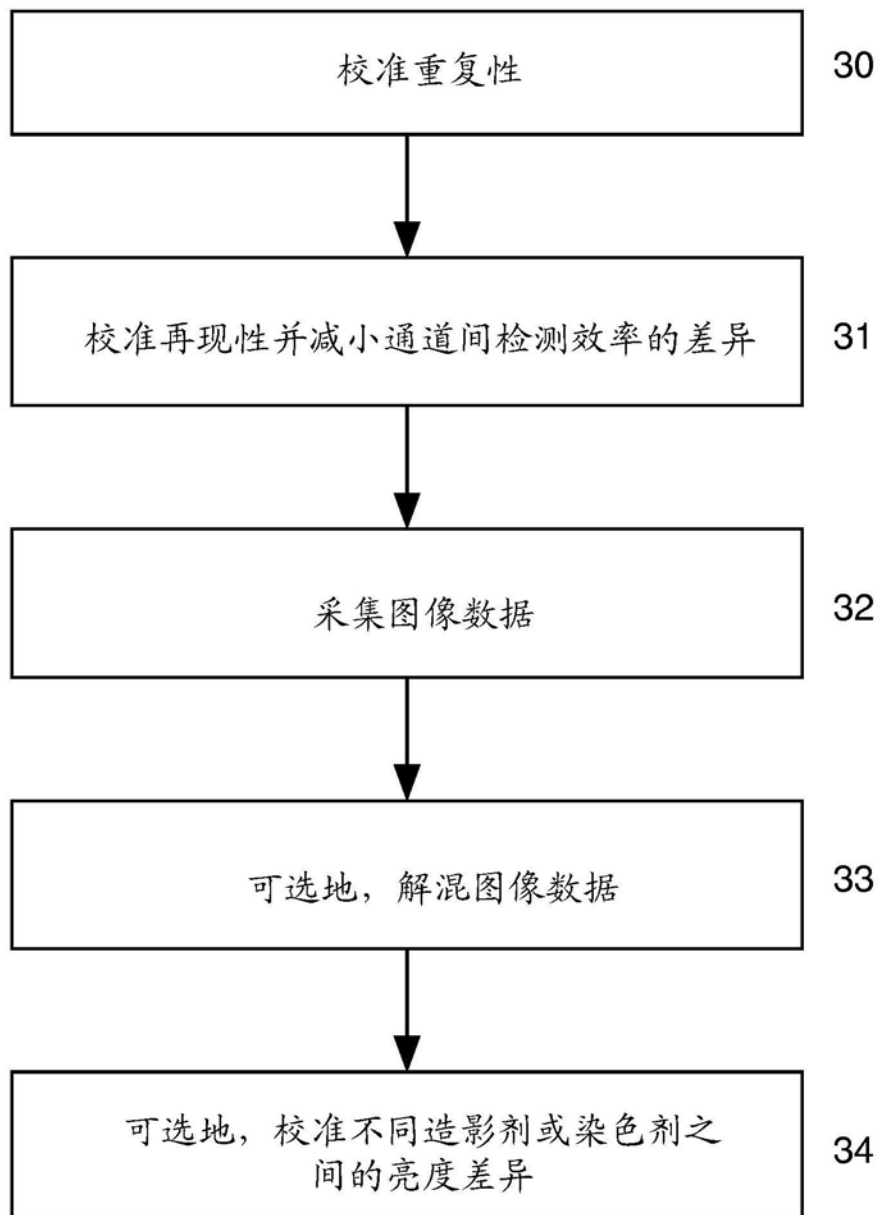


图3

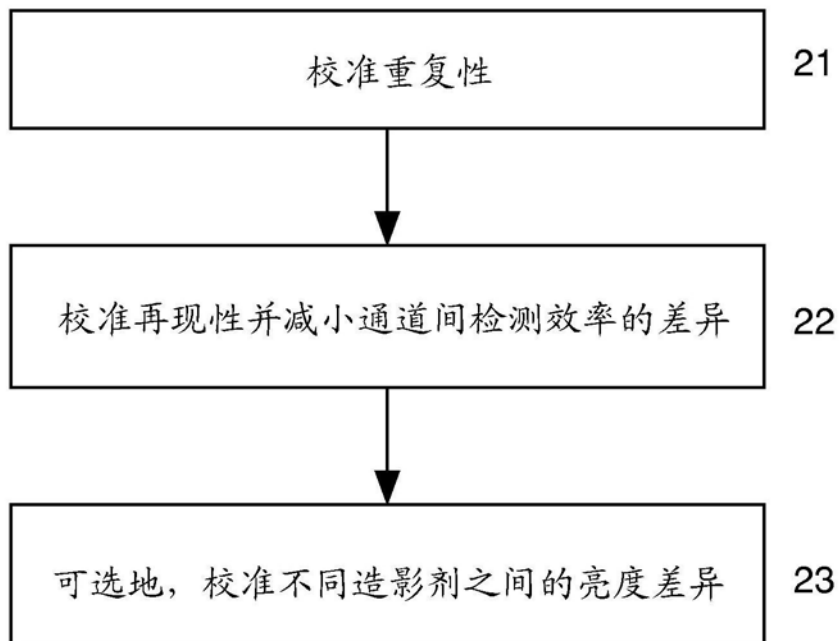


图4

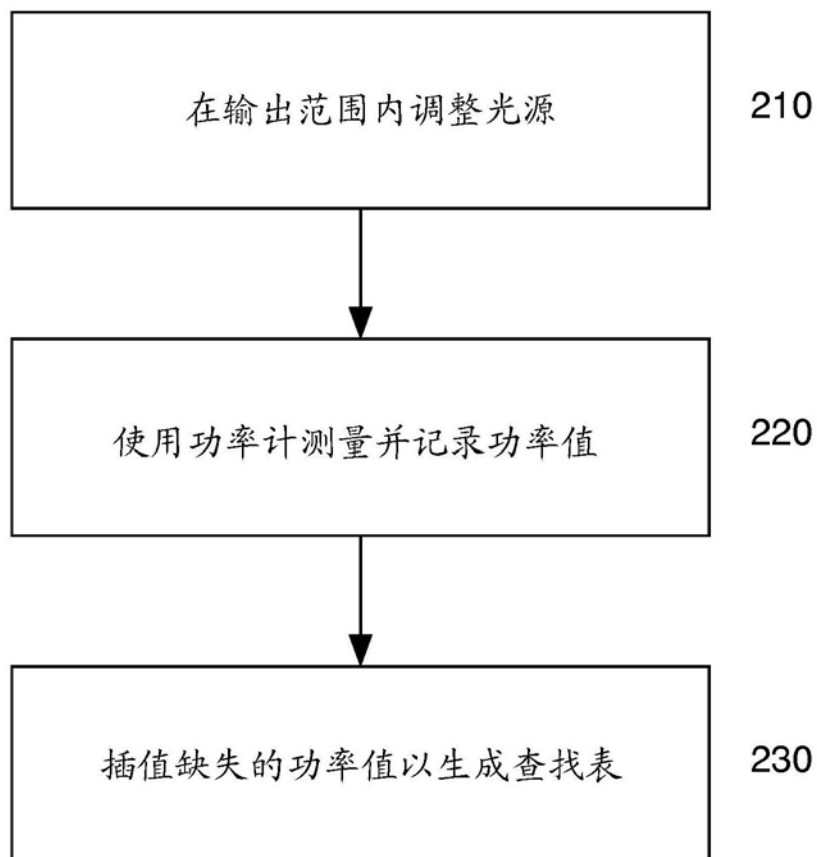


图5A

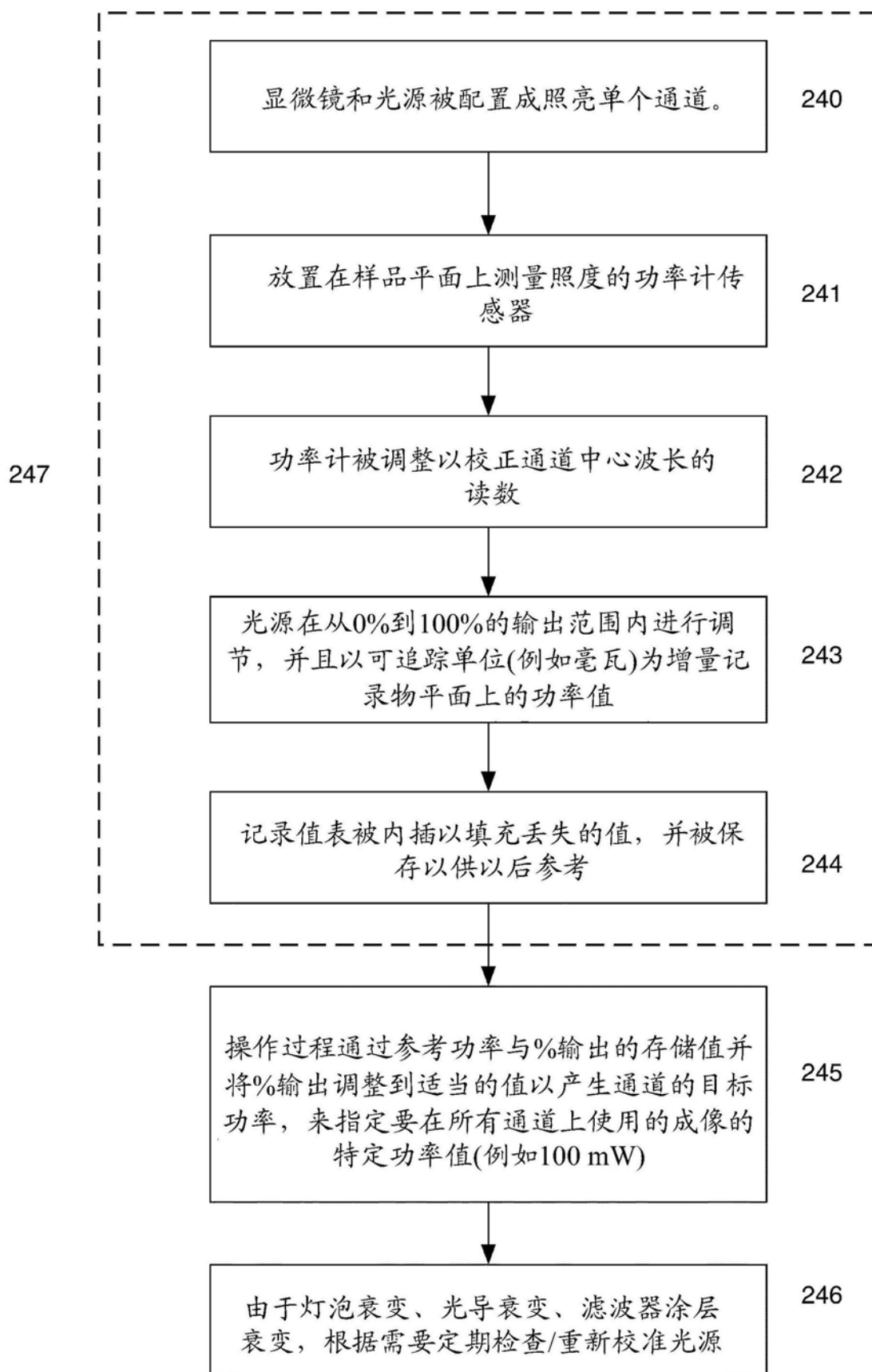


图5B

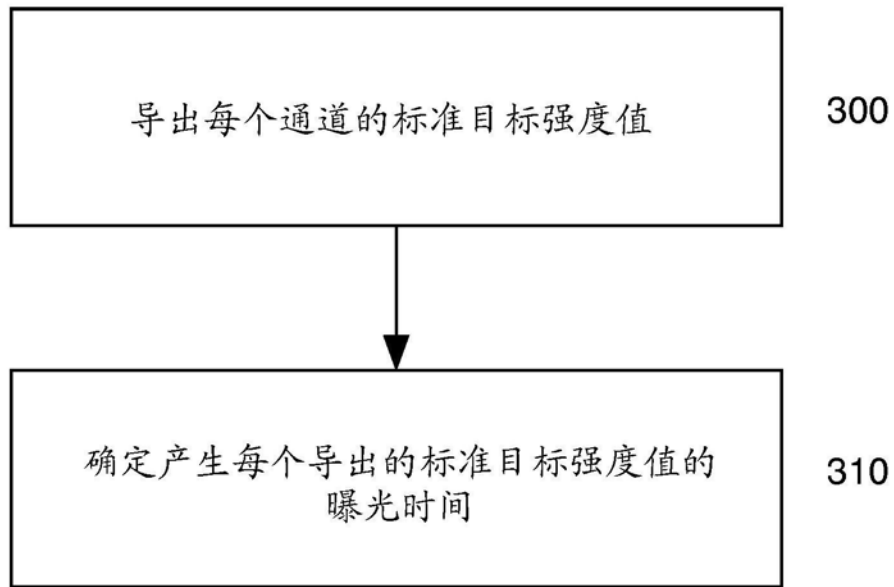


图6

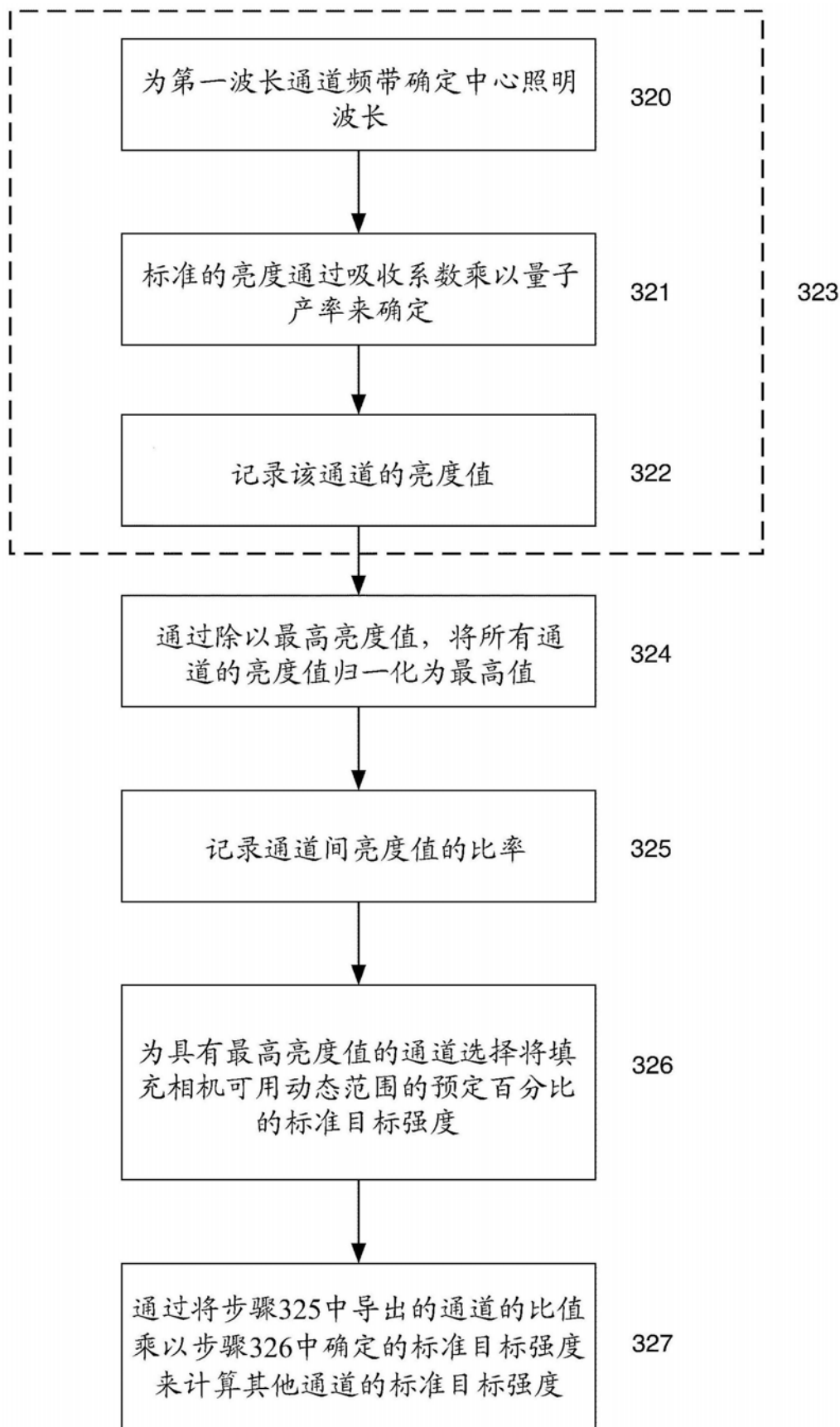


图7A

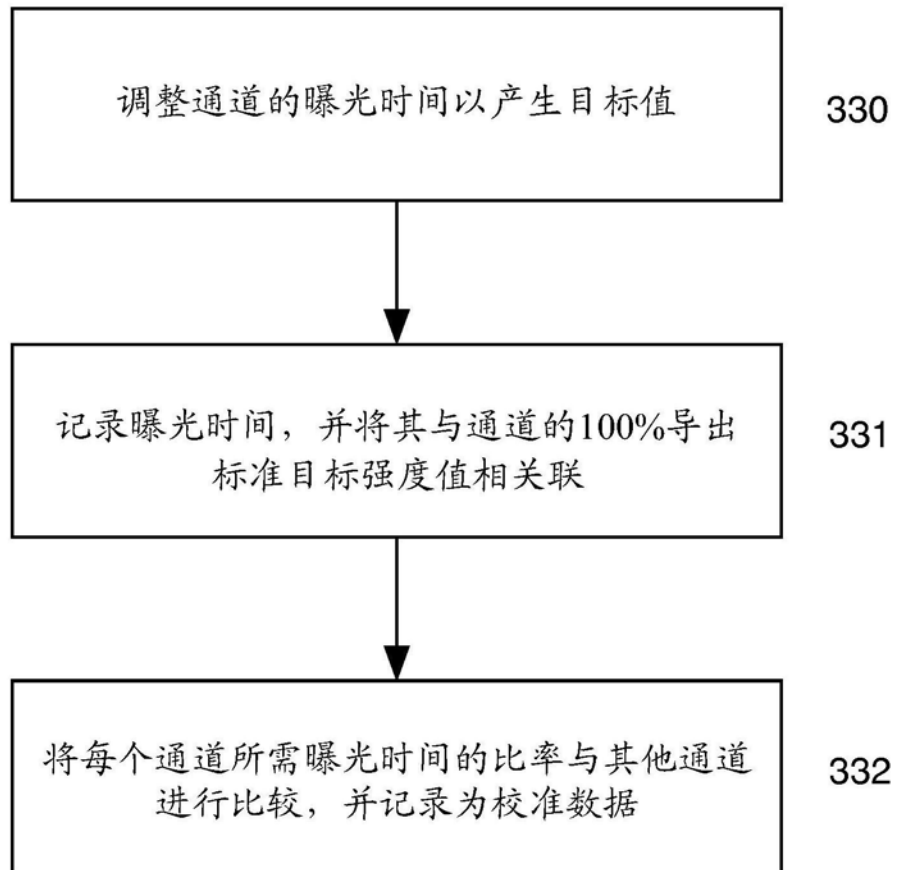


图7B

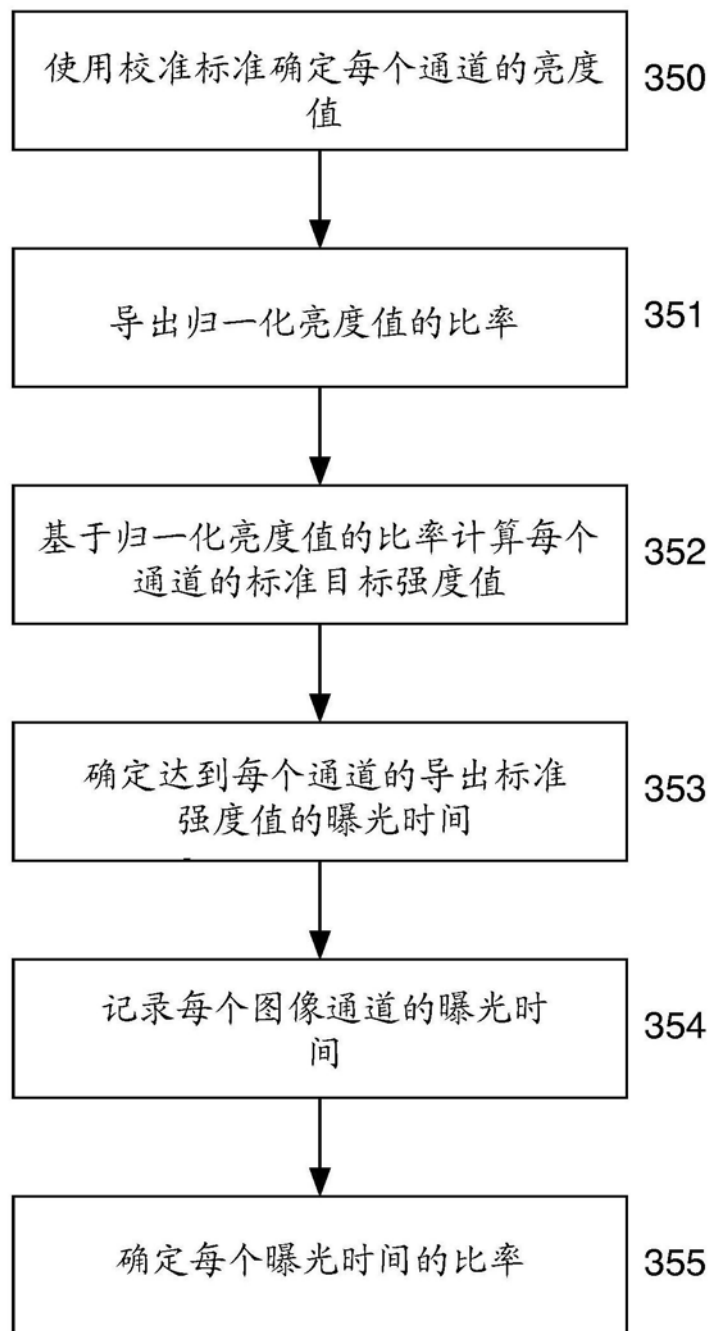


图8

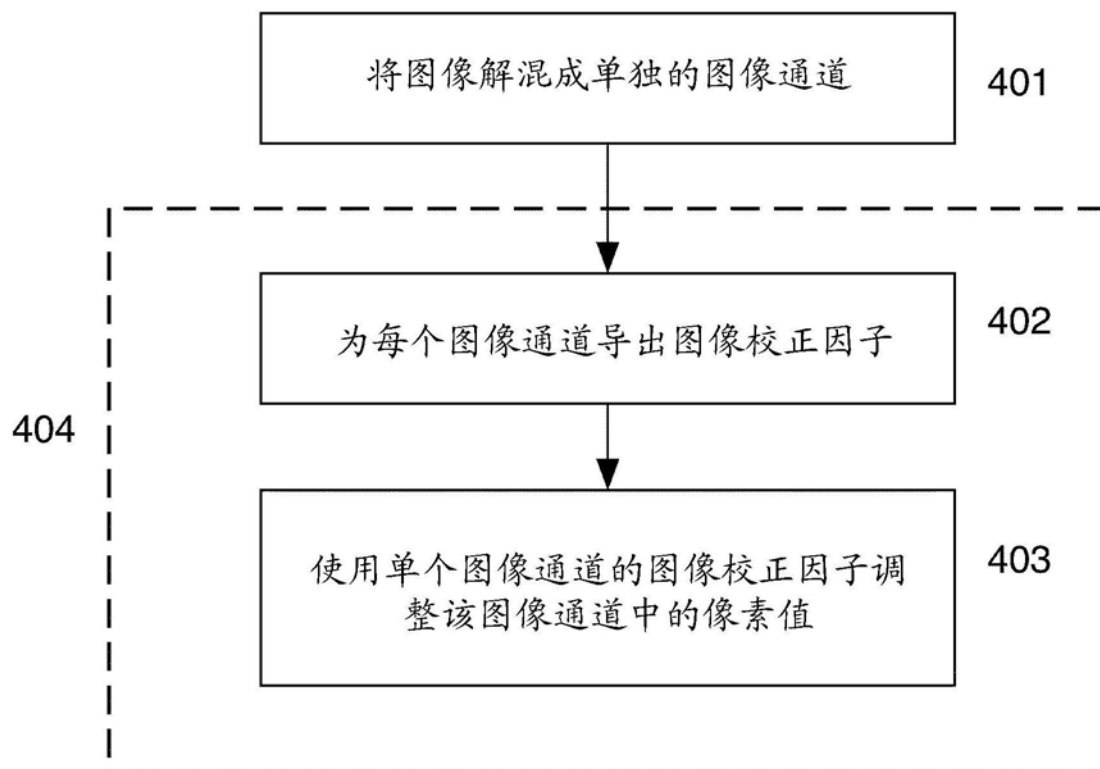


图9A

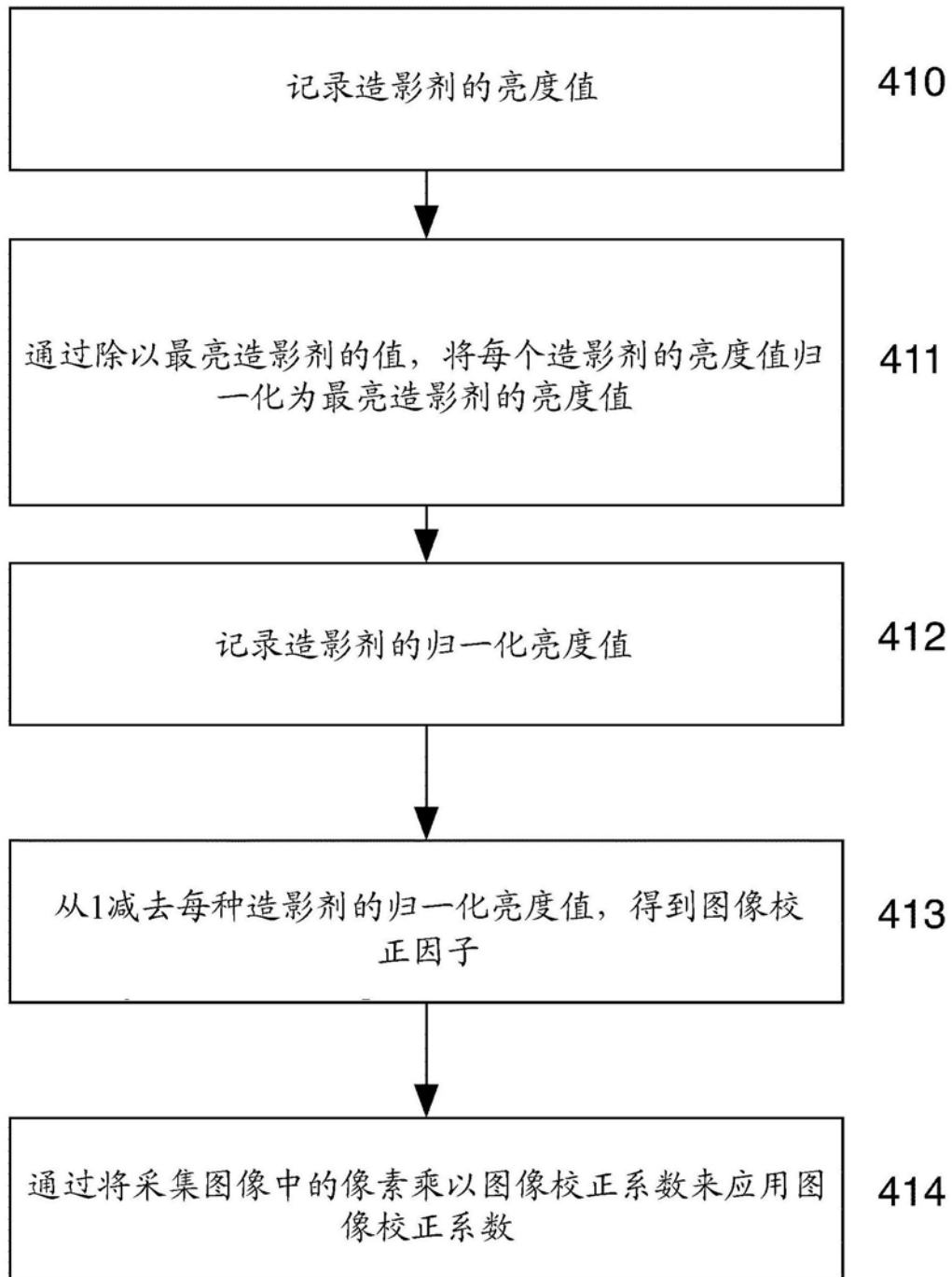


图9B

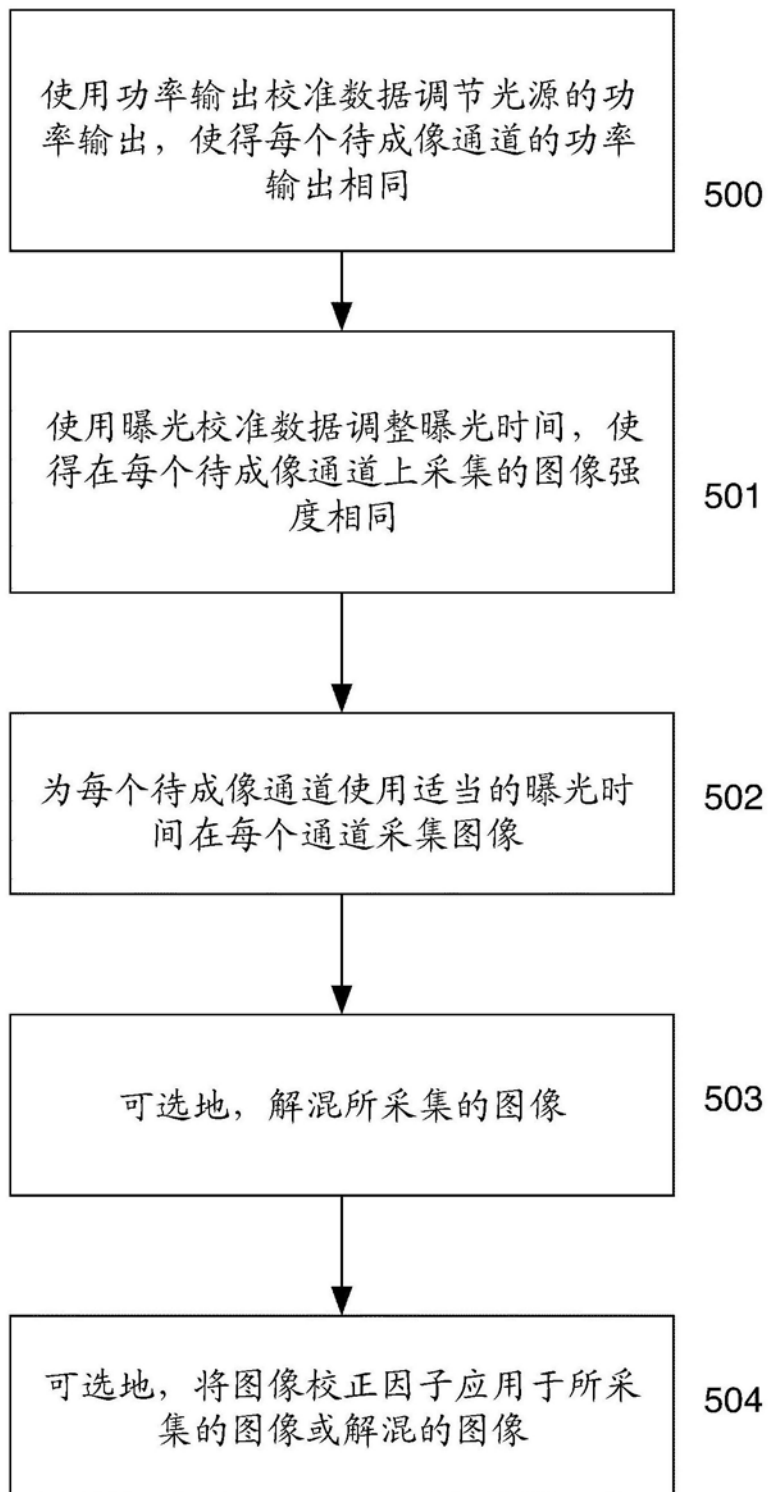


图10