



高速实时图像细胞术

本白皮书探讨了高速成像系统是如何将图像细胞术提升到一个新水平的。

图像细胞术是一种结合了微流控技术和成像技术的测量技术，可以快速表征群体中的单个细胞（见图 1）。^{1,2} 它的优点是它可以快速表征、量化和分析单个细胞的特征，而这是传统技术无法实现的，因为传统技术使用的是基于细胞群平均化的宏观方法。

在图像细胞术中，每个细胞都穿过一个线性透明微通道。当它们通过通道内的一个指定区域时，一个图像或一系列的图像会被记录下来。研究人员实时或在稍后处理图像，以提取每个细胞的生物标志物列表。明场成像从染色的细胞成分中提取包括细胞大小、形状、不透明度、颜色、弹性³、粒度在内的标志物和其他信息。荧光成像用于表征细胞内关键生物分子种类的数量和位置，包括 DNA 和肌动蛋白。由于荧光的弱光性质需要花很长一段时间来集成摄像机，因此本研究仅限于明场成像，这是致力于在高通量图像细胞术领域突破创新的研究人员经常使用的一种技术。

一般来说，像本研究中的这种无法表征荧光的实验条件是不利于图像细胞术的研究的。然而，先前的研究表明，仅拍摄无标记的明场和暗场图像就能提供足够的细胞信息，而“不需要对传统流式细胞术来说非常重要的特定生物标志物”。⁴ 一些研究人员表明，明场成像虽然只适用于某些应用，但它能够阐明关键的表型和状态，包括癌症的恶性程度和侵袭性、干细胞的多能性和分化、

开发者：



PHANTOM[®]

VISION
RESEARCH

AMETEK[®]

活化/幼稚白细胞, 以及细胞骨架和细胞核的变化。⁵ 这是一个好消息, 因为由于相对较低的发光量, 再加上使用超短的曝光时间 (例如, $\sim 10-10 \mu\text{s}$), 在高帧速率下进行荧光显微镜检查是非常困难的。⁶ 另外, 通过避免标记步骤, 这种表征技术在未来可用于难以或根本不可执行染色和标记步骤的体内应用。关于高速荧光成像的简短讨论见结语。

一些市售的图像细胞仪能够以每秒数千个细胞的吞吐量进行这样的特征分析。但这些技术无法高速处理数据, 不能运行对未来的人工智能和机器学习应用至关重要的实时反馈回路。在本白皮书中, 我们说明了如何将现成的硬件 (即摄像机、图像采集卡、处理器) 和软件集成在一起, 以高帧速率 (10-100 kfps)、超短曝光时间和微秒级的延迟实时处理单个细胞。这个系统有助于从微秒级的图像中推断结论, 以便对单个细胞做出更好的微秒和微米级的操作决定。

图像细胞术和反馈

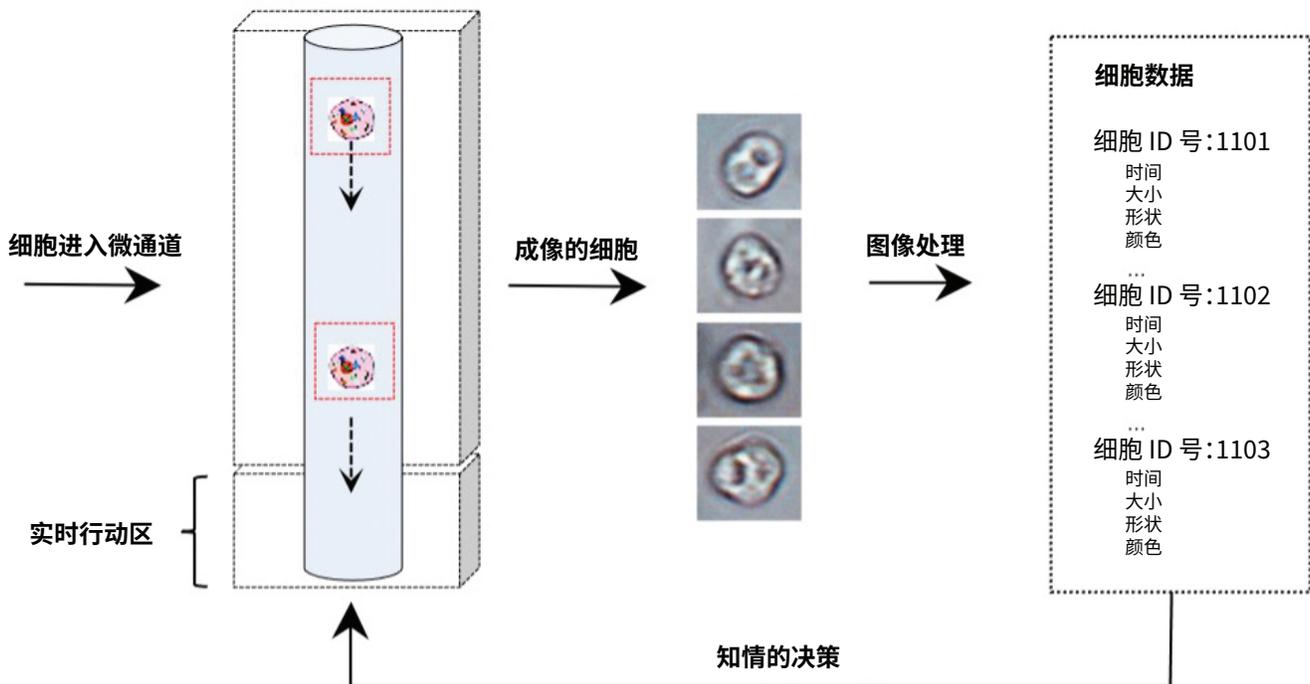


图 1. 示意图显示了图像细胞术的工作流程, 其中细胞样本通过一个微通道, 然后被成像和处理。然后, 被提取出来的数据可以用来对单个细胞执行某项操作。

实验系统

在这个模型中，红色、蓝色和透明色的聚苯乙烯珠流经一个 Cole Parmer 200 μm 宽的微通道。尼康 SMZ18 被设置到 13.5 的放大倍率，AMETEK Vision Research Phantom S710 被配置为以 52,000 fps 的帧速率和 18 μs 的曝光时间进行录像。一个 photonic 5100 LED 光纤灯为样品提供背光。数据被捕获并通过 SPICAtek DHS-RT 站传送，该站可以在两个 Euresys 图像采集卡上捕获多达 16 个 CXP 通道的数据。该站可以实时处理数据，并实时存储长达 45 分钟的高速、未压缩的视频。典型的图像数据如图 2 所示，我们可以从中看到红色、蓝色和透明的颗粒高速穿过微通道。

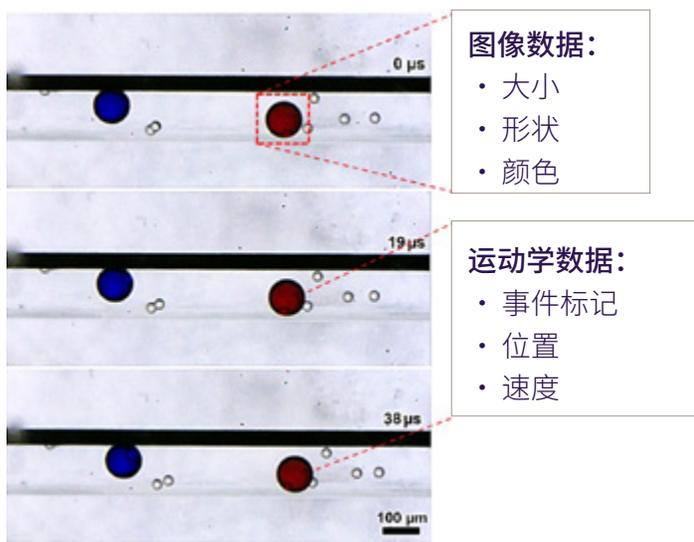


图 2. 彩色聚苯乙烯珠流经微通道的照片。系统可以实时采集关键图像数据和运动学数据。

技术挑战

高速 (10-100 kfps) 实时成像面临着三个主要挑战：选择合适的摄像机传感器和架构，配置正确的摄像机设置，以及使用能够处理高吞吐量的后端 PC。

摄像机传感器和架构。高速科研摄像机市场上的主导产品是采用千兆以太网 (GbE) 通信协议的自带 RAM 的摄像机架构。在这种架构下，摄像机将所有的图像数据保存到一个固定大小的 RAM 缓冲区中，随后这些数据被转移到外部存储器中。缓冲区的大小在几 GB 到几十 GB

之间，一般允许几秒钟时间的高速录像。这种方法对捕捉单个和相对较短的高速事件非常有效，但连续在几分钟或几小时内录像和处理数据则几乎是不可能的。

此外，最快的通信通常是通过 10 GbE，它可以以 $\sim 400 \text{ MB} \cdot \text{s}^{-1}$ 的速度从高速摄像机转移数据。然而，基于 CoaXPress (CXP) 的机器视觉摄像机能够以超过 $7 \text{ GB} \cdot \text{s}^{-1}$ 的速度传输数据，是专门为高速图像传输和机器视觉应用开发的。它们可以直接与市面上的 CXP 图像采集卡集成，图像采集卡提供了摄像机和 PC 主板之间的接口。该卡根据吞吐量被直接连接到具有适当大小和通道数量的 PCIe 插槽。

摄像机设置。图像传感器在帧速率和曝光时间方面必须足够快，以正确地对细胞进行成像，同时减少时间混叠和/或运动模糊。分辨率（像素面密度）是根据相对于视场的颗粒大小来选择的。在这里，最小颗粒的直径约为 10 像素。在较高的粒子速度下，使用 ~ 0.1 到 20 μs 之间的超短曝光时间是很常见的。在本例中，Phantom S710 被配置为以 52,000 fps 的速度和 18 μs 的曝光时间录像。在 cytoTracker 软件中，对摄像机进行了配置，并生成了一个细胞分析列表，其中显示了穿过视场的特定颗粒。（见图 3）。这些数据还详细说明了细胞的大小、形状和颜色，以及位置和速度。

后端 PC 和结果。系统处理每帧的平均时间为 6.2 μs ，在选定的 640 x 200 分辨率下可以达到约 100 kfps 的速度。大多数计算是在未拼接的图像上进行的，图像分类是用选择性的 ROI 拼接进行的。主处理周期在一个内核上运行，其他的内核被用来进行分类、计算和显示结果。有关硬件和软件架构的概述，请参见图 4。这个系统可以在执行计算的同时将数据存储在一个 30 分钟的循环缓冲区中，允许用户实时查看部分内容。检测到的细胞的图像部分以 HSV 格式存储在高达 256 GB 的内存中，以便执行分类算法。根据初步结果，HSV 格式的每个粒子和/或细胞平均使用了 2 KB (8 位) 的内存。这样，1 GB 可以存储超过 50 万个样本。如此高的采样率支持非常详细的分类，并允许进行并行统计计算。系统也可以配置成以 RAW 像素值的形式保存图像数据，这些像素值可以被直接读入诸如 CellProfiler 等软件中。⁷

通过这种架构,可以发送关于细胞是否存在、细胞数和细胞图像/表型的事件信号,以及许多其他可能的识别触发信号。其中,经校准的用时间和位置来匹配事件的触发信号就是一种选择。这对那些想实时过滤、破坏和/或分拣特定微粒的研究人员来说是理想的。系统的最大延迟是 300 μ s,换句话说,在 52,000 fps 的帧速率下约为 15 帧。在本研究中,由于粒子或细胞需要 2400 帧才能穿过整个视场,因此有足够的时间对细胞进行实时操作,并观察通道内的结果,以进行验证和纠正错误。



图 3. cytoTracker GUI 示例, 它用于控制摄像机, 查看实时结果, 并处理图像数据。

结束语

本研究的目的是讨论实时图像细胞术最高可以达到什么技术水平。希望研究人员知道在需要单细胞精度和快速实时结果的最新生物应用中什么是可行的。这个模型系统表现出一定程度的灵活性, 可以适应不同的细胞测量应用。值得注意的是, 这项技术并不局限于图像细胞术, 而是可以扩展到其他需要 $Gpixels \cdot s^{-1}$ 级实时分析的应用。

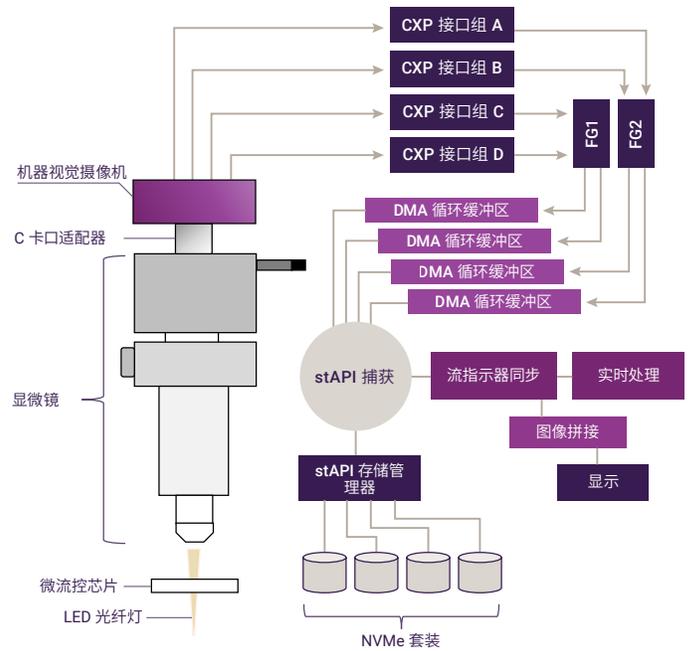


图 4. 框图显示了实时图像细胞术设置中的硬件和软件架构。机器视觉摄像机将图像从显微镜/细胞仪传输到后端硬件。注意: 示意图中的“FG”表示“图像采集卡”。

对荧光的讨论。在荧光应用中, 帧速率通常被限制在 ~1,500 fps 以下。正如上面简要提到的, 这是由于荧光事件中缺乏可用的光子, 这对曝光时间提出了硬性限制。如果试图进行这样的实验, 信噪比 (SNR) 可能会太低, 无法生成质量和清晰度符合要求的图像。此外, 如果增加曝光时间以吸收更多的光子并试图实现更高的信噪比, 细胞图像将出现严重的运动模糊。为了克服这些问题, 研究人员可以尝试使用图像增强器, 或者使用较慢的流速和延时积分 (TDI)。



机器学习。鉴于软件系统有采集和记录、实时检测和分类功能,可以并行执行这些软件功能。因此,这种架构适合于机器学习,以确定触发模式或更复杂的条件,也可用于完善 blob 分析和检测算法。软件允许从外部访问,因此可以通过用 Python 或类似语言构建的独立程序对它进行控制,这使它更容易集成到其他人工智能系统中。

如需了解更多信息,请访问
www.phantomhighspeed.com/Cytometry

关于 Vision Research

Vision Research 是 AMETEK 公司材料分析事业部的一个业务部门,专门设计和制造高速摄像机。Phantom 摄像机以高感光度、高图像分辨率、采集速度和图像质量著称,这些特质对分析高速现象必不可少。

Vision Research 提供标准和机器视觉高速摄像机,可以满足各行业的需求。从 VEO 系列到 TMX 系列,自带内存的标准摄像机是研发应用的完美选择。Phantom 机器视觉摄像机为需要实时处理或长时间录像的应用提供了质量不打折扣的成像性能。它们为变形细胞仪和详细的电子产品检查等具有挑战性的应用提供了出色的性能。

¹ Y. Han, Y. Gu, A. Ce Zhang, Y.-H. Lo. 回顾: 流式细胞术的成像技术. Lab Chip, 2016, 16, 4639-4647.

² H. Mikami, C. Lei, N. Nitta, T. Sugimura, T. Ito, Y. Ozeki, K. Goda, 高速成像与单细胞分析相结合 Chem, 4, 11 2018, 2278-2300

³ D. R. Gossett, H. T. K. Tse, S. A. Lee, Y. Ying, A. G. Lindgren, O. O. Yang, J. Rao, A. T. Clark, D. D. Carlo. 用于大群体力学表型分析的单细胞流体动力学拉伸 PNAS, 2012, 7630-7635.

⁴ M. Doan, A. E. Carpenter, 在细胞诊断中利用机器视觉,做到事半功倍. Nature Materials 18, 2019, 410-427.

⁵ D. D. Carlo, 医学中细胞状态的机械生物标志物, Journal of Laboratory Automation 17, 2012, 32-42.

⁶ Y. J. Heo, D. Lee, J. Kang, K. Lee, W. K. Chung. 微流控芯片中基于显微镜的无标记成像流式细胞术的实时图像处理. Scientific Reports 7, 2017, 11651.

⁷ T. R. Jones, I. H. Kang, D. B. Wheeler, R. A. Lindquist, A. Papallo, D. M. Sabatini, P. Golland, A. E. Carpenter, CellProfiler 分析师: 用于复杂图像筛选的数据研究和分析软件. BMC Bioinformatics, 2008, 9, 482.



某些 Phantom 摄像机需要出口许可证。有关更多信息,请访问 www.phantomhighspeed.com/export。