



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117859086 A

(43) 申请公布日 2024. 04. 09

(21) 申请号 202280045027.5

P·文

(22) 申请日 2022.09.09

(74) 专利代理机构 上海弼兴律师事务所 31283

专利代理师 徐婕超

(30) 优先权数据

63/242,801 2021.09.10 US

17/940,591 2022.09.08 US

(51) Int.Cl.

G02B 21/24 (2006.01)

G01N 21/64 (2006.01)

G02B 7/28 (2021.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.12.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/042986 2022.09.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/039120 EN 2023.03.16

(71) 申请人 因美纳有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 T·贝克 K·厄尔利 张思琪

R·阿巴斯哈伦 A·普拉巴胡

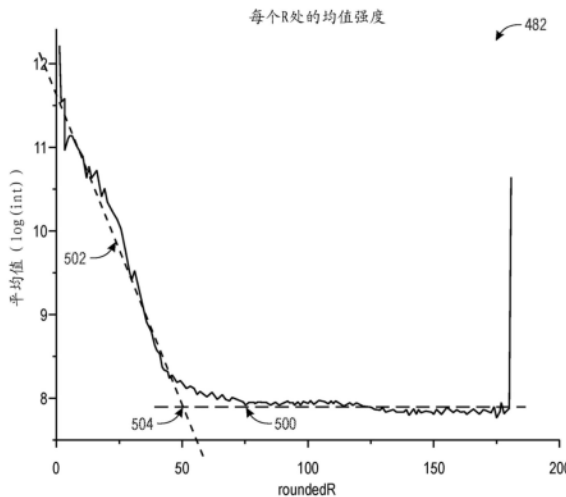
权利要求书3页 说明书23页 附图25页

(54) 发明名称

用于周期性图案化表面的测序仪聚焦质量度量和聚焦跟踪

(57) 摘要

本发明描述了一种与强度无关的聚焦质量度量的生成和使用。在一个示例中,通过获取图像(诸如流通池的图案化表面的图像)并处理该图像的整体或一部分(例如,子区域或子图像)以生成相应图像数据的傅立叶变换,从而生成该聚焦质量度量。举例来说,在一个实施方案中,离散傅立叶变换可应用于图案化流通池表面的图像的子区域。可从该图像数据的该傅立叶变换导出与强度无关的聚焦质量度量。



1. 一种用于确定聚焦质量度的方法,所述方法包括:
 - 获取或访问包括多个样本孔的流通池的图像;
 - 确定所述图像的一部分或整体的傅立叶变换,其中与所述图像相关联的光学点扩散函数 (PSF) 不具有高斯分布曲线;
 - 基于所述傅立叶变换来确定功率谱;
 - 确定拟合到所述功率谱的一部分的线性分段的斜率,其中所述斜率与所述聚焦质量度量对应;
 - 基于至少所述聚焦质量度量来参数化或校准聚焦模型;以及
 - 基于所述聚焦模型来调整物镜和所述流通池所在的样本台的相对位置。
2. 根据权利要求1所述的方法,其中确定所述傅立叶变换包括确定所述图像的在所述流通池上的已知位置处的子区域的傅立叶变换,所述已知位置是基于设置在所述流通池上的一个或多个基准点确定的。
3. 根据权利要求1所述的方法,其中确定所述功率谱包括:
 - 确定所述傅立叶变换的均值或中值k值或径向强度;以及
 - 基于所述傅立叶变换的所述均值或中值k值或径向强度来生成所述功率谱。
4. 根据权利要求1所述的方法,其中与所述图像相关联的所述光学点扩散函数 (PSF) 具有洛伦兹分布曲线。
5. 根据权利要求1所述的方法,其中调整所述物镜和所述样本台的所述相对位置包括基于所述聚焦模型来为测序操作选择聚焦高度。
6. 根据权利要求5所述的方法,所述方法包括:
 - 在所述测序操作期间使用所述聚焦高度对所述流通池的整体或一部分进行成像。
7. 根据权利要求1所述的方法,其中所述聚焦质量度量与强度无关。
8. 一种测序仪器,所述测序仪器包括:
 - 样本台,所述样本台被构造成支撑样本容器;
 - 物镜、光电探测器和光源,所述物镜、所述光电探测器和所述光源被构造成组合操作,以在所述样本容器存在于所述样本台上时对所述样本容器进行成像;
 - 聚焦部件,所述聚焦部件被构造成在所述样本容器存在于所述样本台上时控制所述物镜相对于所述样本容器的定位;和
 - 控制器,所述控制器被构造成执行操作,所述操作包括:
 - 对于在不同z高度处获取的样本表面的图像堆栈中的每个图像,确定相应图像的子区域的相应傅立叶变换;
 - 对于每个傅立叶变换,确定拟合到根据所述傅立叶变换计算的相应功率谱的一部分的线性分段的相应斜率,其中所述斜率与聚焦质量度量对应;
 - 基于所述聚焦质量度量来参数化聚焦模型;以及
 - 基于所述聚焦模型在测序操作期间控制所述聚焦部件的操作。
9. 根据权利要求8所述的测序仪器,其中所述图像堆栈包括使用第一色彩通道获取的第一组图像和使用第二色彩通道获取的第二组图像。
10. 根据权利要求9所述的测序仪器,其中参数化所述聚焦模型包括基于针对所述第一色彩通道导出的聚焦质量度量与针对所述第二色彩通道导出的聚焦质量度量之间的差异

来确定中间聚焦高度。

11. 根据权利要求10所述的测序仪器,其中控制所述聚焦部件的操作包括在所述测序操作的至少一部分期间在所述中间聚焦高度处获取图像数据。

12. 根据权利要求8所述的测序仪器,其中所述样本表面包括流通池的图案化表面。

13. 根据权利要求11所述的测序仪器,其中所述聚焦质量度量与强度无关。

14. 一种用于确定聚焦质量度量的方法,所述方法包括:

获取或访问包括多个样本孔的流通池的图像;

计算所述图像内的一个或多个像素行的一维傅立叶变换;

基于每个相应像素行的所述一维傅立叶变换来确定功率谱;

确定拟合到所述功率谱的一部分的线性分段的斜率,其中所述斜率与所述聚焦质量度量对应;

基于至少所述聚焦质量度量或从所述聚焦质量度量导出的分数来参数化或校准聚焦模型;以及

基于所述聚焦模型来调整物镜和所述流通池所在的样本台的相对位置。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中确定所述功率谱包括:

执行所述一维傅立叶变换的对数平方归一化。

16. 根据权利要求14所述的方法,其中参数化或校准所述聚焦模型包括:通过确定在所述一个或多个像素行处的所述聚焦质量度量或从所述聚焦质量度量导出的所述分数的抛物线图的局部最小值,来确定所述聚焦模型中与所述一个或多个像素行对应的位置的聚焦高度。

17. 根据权利要求14所述的方法,其中调整所述物镜和所述样本台的所述相对位置包括基于所述聚焦模型来为测序操作选择聚焦高度。

18. 根据权利要求17所述的方法,所述方法包括:

在所述测序操作期间使用所述聚焦高度对所述流通池的整体或一部分进行成像。

19. 一种测序仪器,所述测序仪器包括:

样本台,所述样本台被构造成支撑流通池;

物镜、光电探测器和光源,所述物镜、所述光电探测器和所述光源被构造成组合操作,以在所述流通池存在于所述样本台上时对所述流通池进行成像;

聚焦部件,所述聚焦部件被构造成在所述流通池存在于所述样本台上时控制所述物镜相对于所述流通池的定位;和

控制器,所述控制器被构造成执行操作,所述操作包括:

对于在不同 z 高度处获取的样本表面的图像堆栈中的每个图像,确定相应图像内的像素行的相应一维傅立叶变换;

对于每个一维傅立叶变换,确定拟合到根据所述一维傅立叶变换计算的相应功率谱的一部分的线性分段的相应斜率,其中所述斜率与聚焦质量度量对应;

基于所述聚焦质量度量来参数化聚焦模型;以及

基于所述聚焦模型在测序操作期间控制所述聚焦部件的操作。

20. 根据权利要求19所述的测序仪器,其中参数化所述聚焦模型包括基于针对第一色彩通道导出的聚焦质量度量与针对第二色彩通道导出的聚焦质量度量之间的差异来确定

中间聚焦高度。

21. 根据权利要求20所述的测序仪器,其中控制所述聚焦部件的操作包括在所述测序操作的至少一部分期间在所述中间聚焦高度处获取图像数据。

22. 根据权利要求19所述的测序仪器,其中每个相应功率谱是通过执行所述一维傅立叶变换的对数平方归一化而确定的。

23. 根据权利要求19所述的测序仪器,其中参数化所述聚焦模型包括:通过确定在所述像素行处的所述聚焦质量度量或从所述聚焦质量度量导出的分数的抛物线图的局部最小值,来确定所述聚焦模型中与所述像素行对应的位置的聚焦高度。

24. 根据权利要求19所述的测序仪器,其中在所述测序操作期间控制所述聚焦部件的操作包括:基于所述聚焦模型来为所述测序操作选择聚焦高度,从而调整所述物镜和所述样本台的所述相对位置。

25. 根据权利要求24所述的方法,所述方法包括:

在所述测序操作期间使用所述聚焦高度对所述流通池的整体或一部分进行成像。

用于周期性图案化表面的测序仪聚焦质量度和聚焦跟踪

背景技术

[0001] 本方法整体涉及用于评价图案化表面的基于图像的方法,这些图案化表面包括用于对核酸序列进行测序或以其他方式处理核酸序列的基底上的图案化表面。更具体地,该方法涉及关于扫描此类图案化表面的聚焦质量的评估。

[0002] 在核酸测序语境下,测序设备(诸如流通池)可在表面上的各位置处包括多个单独位点(例如,样本孔或纳米孔)。此类位点可含有化学基团或生物分子,它们在许多位点中可以是相同的或不同的,并且可与其他感兴趣的材料(诸如生物样本)相互作用。通过拍摄基底表面的图像,诸如通过平面成像或通过线扫描,可定位和/或分析位点。可处理图像数据以定位和识别位点中的至少一部分,以及/或者获得与被分析的样本相关的定性或定量测量。在此类语境下,当在特定位点处发生化学或生物相互作用时,可在该位点处检测该相互作用,并将该相互作用与该位点的位置和身份以及该位点处存在的特定基团或分子相关联。

[0003] 位点经常以规则的几何图案排列,其中图案的元素重复,诸如呈棋盘或六边形网格,以优化基底表面上可用的位点的数量并便于通过自动化仪器定位位点。可使用各种配准方法来确定和/或校正表面上的单独位点的位置。举例来说,局部配准技术可利用刚性配准基准点,诸如在图像内的各种已知位置处存在的靶心图案,以允许与已知模板交叉相关。作为这种交叉相关的结果,可确定平面内移位或偏移,并且可基于这些偏移来调整或校正模板位置和/或图像数据。

[0004] 考虑到前述语境,应当理解,与在测序设备诸如流通池上读取位点时采用的成像过程相关联的聚焦质量对于为了定位数据读出位点而执行的配准过程以及对于数据获取步骤本身而言都是重要的。因此,可量化聚焦质量,以用于监测或实施给定测序操作中的若干步骤,包括但不限于给定表面上样本位点的配准(例如,流通池配准)、聚焦模型生成、焦平面映射以及在测序运行过程中的聚焦跟踪。

[0005] 测量或以其他方式评估聚焦质量的当前方法可基于使用Brenner梯度或函数来生成可用于自动聚焦过程的一部分的聚焦分数(即,Brenner分数)。然而,此类Brenner分数本质上与强度相关。对应地,基于Brenner分数的聚焦技术由于这种强度相关性而存在稳健性问题。例如,在核酸测序语境下,由于跨流通池表面的荧光团的强度不均匀或随时间变化(例如,空间和/或时间的不均匀),基于Brenner分数的聚焦度量可能随时间或在各测序系统之间不稳健。因此,基于Brenner梯度的聚焦评估可能会将强度变化误表征为聚焦的变化或差异。结果是,跨仪器(例如,测序仪)和/或流通池,或者甚至在所获取的流通池的图像图块内比较Brenner分数是不稳健的。

发明内容

[0006] 本文所述的技术提供了一种与强度无关的聚焦质量度量的生成和用途。在一种语境下,通过获取图像(诸如流通池的图案化表面的图像)并处理该图像的整体或一部分(例如,子区域或子图像)以生成相应图像数据的傅立叶变换,从而生成该聚焦质量度量。举例

来说,在一个实施方案中,离散傅立叶变换可应用于图案化流通池表面的图像的子区域。可针对所得傅立叶变换来计算均值(或中值)径向强度,并随后将其用于确定傅立叶变换和底层图像数据的功率谱。在二维(2D)傅立叶变换的语境下呈现本文的各种示例,并且此类示例可引用对应2D傅立叶变换的语境下的半径、径向强度、径向平均值等。然而,应当理解,此类对半径或针对相应半径导出的值的引用可被认为是这些2D语境下的特殊情况,并且此类基于半径的术语可被涵盖在其他示例中,并且一般在更广泛的语境下,涉及k空间(即,傅立叶或频率空间)和k空间内的k值。因此,如本文所用,对半径、径向平均值、径向强度等的引用可被更广泛地理解为与它们在k空间中的广义对应物对应,并且此类k空间术语可在本文的适当非2D(例如,一维(1D))傅立叶变换示例中适当地使用。

[0007] 可将分段函数拟合到功率谱,并且针对拟合的分段函数确定一个或多个参数。此类参数可包括但不限于径向斜率、转角频率、本底噪声等。在一个实施方案中,径向斜率构成了从中导出傅立叶变换的成像子区域的聚焦质量度量。径向斜率和对应聚焦质量度量与强度无关,并且因此提供聚焦质量的一致测量,而不管在测序运行过程中和/或在测序成像器之间的强度变化如何。

[0008] 重要的是,本文所述的用于生成聚焦质量度量的方法中的某些方法没有假设点扩展函数的高斯分布曲线,而该高斯分布曲线可能在其他常规方法中有所假设。实际上,在某些实施方案中,洛伦兹分布曲线可更好地描述点扩散函数。因为没有假设高斯分布,所以本文公开的聚焦质量量化技术在它们的应用中比依赖于此类假设的其他方法更灵活。

[0009] 在实践中,根据本文所述的技术生成的聚焦质量度量可在测序运行开始时生成并用于参数化聚焦模型,该聚焦模型随后在整个测序运行中用于监测和校正成像器相对于流通池的图案化表面的聚焦。举例来说,作为初始聚焦模型生成的一部分,可基于聚焦模型来校准实时聚焦监测系统,诸如基于红外线(IR)的聚焦测量系统。经校准的IR聚焦测量系统随后可在测序期间用于实时监测和校正聚焦。在一些实施方案中,仅在用于聚焦模型生成的测序运行开始时计算如本文所述的聚焦质量度量。在其他实施方案中,每隔一段时间(例如,每10、20、30或40个循环)计算如本文所述的聚焦质量度量,以更新聚焦模型并重新校准实时聚焦测量系统。

[0010] 在一些系统中,图像获取可以是多通道的,使得针对每个成像区域获得不同频率(例如,红色、蓝色、绿色等)下的图像。在此类系统中,可相对于成像区域针对每个通道计算如本文所述的聚焦质量度量。然后,可通过选择为每个相应色彩通道提供合适聚焦的代表性聚焦高度(例如,中间聚焦高度)来确定焦平面或高度。

[0011] 考虑到前述内容,在一个实施方案中,提供了一种用于计算聚焦质量度量的方法。根据该方法,获取或访问包括多个样本孔的流通池的图像。计算图像的一部分或整体的傅立叶变换。与图像相关联的光学点扩散函数(PSF)不具有高斯分布曲线。基于傅立叶变换来计算功率谱。计算拟合到功率谱的一部分的线性分段的斜率。该斜率与聚焦质量度量对应。

[0012] 在另外的实施方式中,提供了一种测序仪器。根据该实施方式,该测序仪器包括:样本台,该样本台被构造成支撑样本容器;物镜、光电探测器和光源,该物镜、该光电探测器和该光源被构造成组合操作,以在样本容器存在于样本台上时对该样本容器进行成像;聚焦部件,该聚焦部件被构造成在样本容器存在于样本台上时控制物镜相对于该样本容器的定位;和控制器。该控制器被构造成执行操作,该操作包括:对于在不同z高度处获取的样本

表面的图像堆栈中的每个图像,计算相应图像的子区域的相应傅立叶变换;对于每个傅立叶变换,计算拟合到根据该傅立叶变换计算的相应功率谱的一部分的线性分段的相应斜率,其中该斜率与聚焦质量度量对应;基于聚焦质量度量来参数化聚焦模型;以及基于聚焦模型在测序操作期间控制聚焦部件的操作。

[0013] 在附加实施方案中,提供了一种用于计算聚焦质量度的方法。根据该方法,获取或访问包括多个样本孔的流通池的图像。计算图像内的一个或多个像素行的一维傅立叶变换。基于每个相应像素行的一维傅立叶变换来确定功率谱。确定拟合到功率谱的一部分的线性分段的斜率。其中该斜率与聚焦质量度量对应。基于至少聚焦质量度量或从聚焦质量度量导出的分数来参数化或校准聚焦模型。基于聚焦模型来调整物镜和流通池所在的样本台的相对位置。

[0014] 在另外的实施方案中,提供了一种测序仪器。根据该实施方式,该测序仪器包括:样本台,该样本台被构造成支撑流通池;物镜、光电探测器和光源,该物镜、该光电探测器和该光源被构造成组合操作,以在流通池存在于样本台上时对该流通池进行成像;聚焦部件,该聚焦部件被构造成在流通池存在于样本台上时控制物镜相对于该流通池的定位;和控制器。该控制器被构造成执行操作,这些操作包括:对于在不同 z 高度处获取的样本表面的图像堆栈中的每个图像,确定相应图像内的像素行的相应一维傅立叶变换;对于每个一维傅立叶变换,确定拟合到根据该一维傅立叶变换计算的相应功率谱的一部分的线性分段的相应斜率,其中该斜率与聚焦质量度量对应;基于聚焦质量度量来参数化聚焦模型;以及基于聚焦模型在测序操作期间控制聚焦部件的操作。

附图说明

[0015] 当参考附图阅读以下具体实施方式时将更好地理解本发明的这些和其他特征、方面和优点,其中在整个附图中相同的字符表示相同的部分,其中:

[0016] 图1示出了根据本公开的图像扫描系统的一个示例的高级概述;

[0017] 图2是根据本公开的诸如用于生物样本的成像和图像处理系统的框图说明;

[0018] 图3是根据本公开的示例性图案化表面的平面图;

[0019] 图4是示出了根据本公开的示例性图案化流通池表面上的位点的另外的剖视图;

[0020] 图5是图案化流通池表面的两个示例性位点的放大视图,其示出了这些位点的图像数据在处理期间的像素化;

[0021] 图6是示出了根据本公开的用于聚焦操作的示例性聚焦控制系统的框图;

[0022] 图7是示出了根据本公开的 z 台控制器的示例性架构的图解;

[0023] 图8描绘了根据本公开的说明生成聚焦质量度量的步骤的处理流程;

[0024] 图9直观地示出了根据本公开的从图像导出的傅立叶变换;

[0025] 图10直观地示出了根据本公开的从傅立叶变换导出的功率谱;

[0026] 图11直观地示出了根据本公开的拟合到功率谱的分段函数,其直观地示出了从图像导出的傅立叶变换;

[0027] 图12A、图12B和图12C直观地示出了根据本公开的分段函数与从图像的 z 堆栈中的相应图像导出的功率谱的拟合;

[0028] 图13A、图13B和图13C描绘了图12A至图12C中所示出的功率谱的对应图像数据;

- [0029] 图14以图形方式描绘了根据本公开的针对两个不同色彩通道的z高度绘制的径向斜率和转角频率的散点图；
- [0030] 图15以图形方式描绘了针对固定聚焦高度并随一系列强度值变化而确定的径向斜率和Brenner分数的散点图；
- [0031] 图16以图形方式描绘了根据本公开的随一系列z维度值和y维度值变化的径向斜率的散点图；
- [0032] 图17以图形方式描绘了根据本公开的针对不同流通池确定的径向斜率和转角频率的散点图；
- [0033] 图18以图形方式描绘了根据本公开的针对图像的不同子区域绘制的斜率的视觉编码表示；
- [0034] 图19描绘了根据本公开的径向不对称傅立叶变换和对应功率谱；
- [0035] 图20描绘了根据本公开的说明使用行数据生成聚焦质量度量的步骤的处理流程；
- [0036] 图21直观地示出了根据本公开的从图像导出的一维傅立叶变换；
- [0037] 图22直观地示出了根据本公开的拟合到功率谱的分段函数,其直观地示出了从图像导出的傅立叶变换；
- [0038] 图23直观地示出了根据本公开的针对变化的行长度并使用第一平均方案的积分功率与k空间值的散点图；
- [0039] 图24直观地示出了根据本公开的针对变化的行长度并使用第二平均方案的积分功率与k空间值的散点图；并且
- [0040] 图25直观地示出了根据本公开的描绘聚焦质量度量与聚焦深度的抛物线拟合从而识别最佳聚焦深度的散点图。

具体实施方式

[0041] 下面将描述一个或多个具体实施方案。在提供这些实施方案的简明描述的过程中,在本说明书中没有描述实际实施方式的所有特征。应当理解,在任何此类实际实施方式的开发中,如在任何工程或设计项目中,必须做出许多实施方式特定的决定以实现开发者的特定目标,诸如符合系统相关约束和企业相关约束,这些约束在不同实施方式之间可能是不同的。此外,应当理解,此类开发工作可能是复杂并耗时的,但是对于受益于本公开的普通技术人员而言仍然是设计、加工和制造的常规任务。

[0042] 本公开提供了傅立叶变换(例如,离散傅立叶变换(DFT))在生成聚焦质量度量时的使用,并且附加地提供了此类聚焦质量度量的使用(诸如生成或以其他方式参数化在测序或扫描操作的过程中使用的聚焦模型,以提供实时聚焦监测或校正)的示例。在某些实施方式中,对规则图案化表面(例如,具有周期性或以其他方式重复的位点图案的表面,诸如样本孔)进行成像,并且诸如通过针对每个感兴趣的区域或子区域计算如本文所述的聚焦质量度量来单独评估图像的区域或子区域的聚焦质量。根据该方法生成的聚焦质量度量与强度无关,并且因此相对于整个图案化表面、在各次运行之间或在各设备之间的强度波动而言是稳健的。结果是,所描述的聚焦质量度量可用于量化和比较聚焦质量,即使在表现出光漂白或导致各设备、样本、过程、运行等之间发生强度变化的其他强度动态的图像上也是如此。

[0043] 为了给下面讨论的术语和概念提供进一步语境,应当注意,如本文所用,“流通池”可被理解为样本保持和/或处理结构或设备。此类设备包括位点或孔(即,样本位点或结合位点),分析物可位于这些位点或孔处,以用于处理和分析。如本文所讨论的,位点中的一些或全部位点可以重复或周期性模式设置在流通池结构的一个或多个表面上。

[0044] 另外,关于“聚焦”及其使用和与成像操作的相关性的概念,该概念可与以下内容相关但不限于以下内容:(1)对正在实时成像的区域进行聚焦的实时自动聚焦;(2)通过分析下一个待成像的区域进行的前瞻预测聚焦;以及/或者(3)通过将来自同一区域的先前扫描循环的前一扫描的信息用于当前扫描进行的前馈聚焦,这些内容中的一些或全部内容在以下文献中有所讨论:美国专利号8,422,031(名称为“FOCUSING METHODS AND OPTICAL SYSTEMS AND ASSEMBLIES USING THE SAME”,提交于2010年11月16日,并且发布于2013年4月16日)、美国专利号11,054,624(名称为“PREDICTIVE FOCUS TRACKING APPARATUS AND METHODS”,提交于2017年12月22日,并且发布于2021年7月6日)和美国专利号10,834,308(名称为“REAL TIME CONTROLLER SWITCHING”,提交于2019年1月10日,并且发布于2020年11月10日),所有这些文献的全部内容以引用方式并入本文并用于所有目的。

[0045] 此外,如本文所讨论的,在核酸测序技术中,核酸的寡聚链或多聚链(其可在空间上分离并且定位在基底(诸如流通池的图案化表面)上)可经历若干循环的生化处理和成像。此类图案化表面可包括对存在于植物、动物(例如人)和其他生物体中的核苷酸序列具有特异性的DNA或RNA探针。在一些应用中,单独DNA或RNA探针可附着在图案化流通池的表面的单独特征部(例如,样本孔或位点)处。可将诸如来自已知或未知的人或生物体的测试样本暴露于位点,使得靶核酸(例如,基因片段、mRNA或其扩增子)与位点图案中的相应位点处的互补探针杂交。探针可在靶标特异性过程中进行标记(例如,由于存在于靶核酸上的标记或由于在特征部处以杂交形式存在的探针或靶标的酶标记)。然后可检查图案化表面,诸如通过在特征部上扫描特定频率(例如,一个、两个、三个或四个频率)的光以识别样本中存在哪些靶核酸。在实践中,可在给定循环中获得多个(例如,两个)不同图像,并且将在组合图像中检测每个特征部。测序包括多个循环,并且来自连续循环的图像数据用于基于在相应位点处检测的标记序列来确定每个位点处的核苷酸序列。如本文所讨论的,图像聚焦不佳可能会对序列分析产生不利影响。

[0046] 关于特征部(诸如图案化表面上的反应或样本结合位点(例如,样本孔或纳米孔))的尺寸,可选择此类特征部的尺寸以适合期望的应用。在一些示例中,图案化表面的特征部可具有仅容纳单个核酸分子的尺寸。具有多个在该尺寸范围内的特征部的表面适用于构造分子图案,从而以单分子分辨率进行检测。该尺寸范围内的特征部也可用于具有特征部的图案化表面中,这些特征部各自含有核酸分子的集落。因此,图案化表面的特征部可各自具有不大于约 1mm^2 、不大于约 $500\mu\text{m}^2$ 、不大于约 $100\mu\text{m}^2$ 、不大于约 $10\mu\text{m}^2$ 、不大于约 $1\mu\text{m}^2$ 、不大于约 500nm^2 、不大于约 100nm^2 、不大于约 10nm^2 、不大于约 5nm^2 或不大于约 1nm^2 的面积。另选地或附加地,图案化表面的特征部将不小于约 1mm^2 、不小于约 $500\mu\text{m}^2$ 、不小于约 $100\mu\text{m}^2$ 、不小于约 $10\mu\text{m}^2$ 、不小于约 $1\mu\text{m}^2$ 、不小于约 500nm^2 、不小于约 100nm^2 、不小于约 10nm^2 、不小于约 5nm^2 或不小于约 1nm^2 。实际上,特征部可具有在选自上文所例示的那些上限和下限之间的范围内的尺寸。尽管已关于核酸和核酸的尺度例示了表面的特征部的若干尺寸范围,但应当理解,这些尺寸范围内的特征部可用于不包括核酸的应用。还应当理解,特征部的尺寸不必局限于

核酸应用中使用的尺度。

[0047] 对于包括具有多个特征部的对象(例如,流通池表面)的示例,特征部(例如,样本位点或孔)可以是离散的,彼此之间分开一定空间。可用于本发明语境的图案化表面可具有以至多约 $100\mu\text{m}$ 、约 $50\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ 、约 $1\mu\text{m}$ 、约 $0.5\mu\text{m}$ 或更小的边到边距离分开的特征部。另选地或附加地,图案化表面可具有以至少约 $0.5\mu\text{m}$ 、约 $1\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ 、约 $50\mu\text{m}$ 、约 $100\mu\text{m}$ 或更大的边到边距离分开的特征部。这些范围可适用于特征部的平均边到边间距以及最小或最大间距。

[0048] 特征部的尺寸和/或特征部的间距可变化,使得图案化表面上的特征部可具有期望的密度。例如,规则图案中的平均特征部间距可为至多约 $100\mu\text{m}$ 、约 $50\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ 、约 $1\mu\text{m}$ 或约 $0.5\mu\text{m}$ 或更小。另选地或附加地,规则图案中的平均特征部间距可为至少约 $0.5\mu\text{m}$ 、约 $1\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ 、约 $50\mu\text{m}$ 或约 $100\mu\text{m}$ 或更大。这些范围也可适用于规则图案的最大或最小间距。例如,规则图案的最大特征部间距可为至多约 $100\mu\text{m}$ 、约 $50\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ 、约 $1\mu\text{m}$ 或约 $0.5\mu\text{m}$ 或更小;并且/或者规则图案中的最小特征部间距可为至少约 $0.5\mu\text{m}$ 、约 $1\mu\text{m}$ 、约 $5\mu\text{m}$ 、约 $10\mu\text{m}$ 、约 $50\mu\text{m}$ 或约 $100\mu\text{m}$ 或更大。

[0049] 图案化表面上的特征部的密度也可根据每单位面积存在的特征部数量来理解。例如,图案化表面上的特征部的平均密度可为至少约 1×10^3 个特征部/ mm^2 、约 1×10^4 个特征部/ mm^2 、约 1×10^5 个特征部/ mm^2 、约 1×10^6 个特征部/ mm^2 、约 1×10^7 个特征部/ mm^2 、约 1×10^8 个特征部/ mm^2 或约 1×10^9 个特征部/ mm^2 或更高。另选地或附加地,图案化表面上的特征部的平均密度可为至多约 1×10^9 个特征部/ mm^2 、约 1×10^8 个特征部/ mm^2 、约 1×10^7 个特征部/ mm^2 、约 1×10^6 个特征部/ mm^2 、约 1×10^5 个特征部/ mm^2 、约 1×10^4 个特征部/ mm^2 或约 1×10^3 个特征部/ mm^2 或更低。

[0050] 设置在图案化表面上的特征部可具有多种形状、横截面和布局中的任一种。例如,当在二维平面内(诸如在表面上)观察时,特征部可具有圆形、环形、椭圆形、矩形、正方形、对称、不对称、三角形、多边形等的周边。特征部可以规则重复图案布置,包括例如六边形或直线形图案。可选择图案以实现期望的填充水平。例如,圆形特征部以六边形布置进行最佳填充。其他填充布置也可用于圆形特征部,并且反之亦然。

[0051] 一般而言,图案化表面可根据在形成图案的最小几何单元的子集中存在的特征部的数量来表征。该子集可包括例如至少2、3、4、5、6、10个或更多个特征部。根据特征部的尺寸和密度,几何单元可占据小于约 1mm^2 、约 $500\mu\text{m}^2$ 、约 $100\mu\text{m}^2$ 、约 $50\mu\text{m}^2$ 、约 $10\mu\text{m}^2$ 、约 $1\mu\text{m}^2$ 、约 500nm^2 、约 100nm^2 、约 50nm^2 或约 10nm^2 或更小的面积。另选地或附加地,几何单元可占据大于约 10nm^2 、约 50nm^2 、约 100nm^2 、约 500nm^2 、约 $1\mu\text{m}^2$ 、约 $10\mu\text{m}^2$ 、约 $50\mu\text{m}^2$ 、约 $100\mu\text{m}^2$ 、约 $500\mu\text{m}^2$ 或约 1mm^2 或更大的面积。几何单元中的特征部的特征(诸如形状、尺寸、间距等)可选自本文针对设置在图案化表面上的特征部更一般地阐述的那些特征。

[0052] 具有特征部的规则图案的表面关于特征部的相对位置可以是有序的,但关于每个特征部的一个或多个其他特征是随机的。例如,就核酸测序表面而言,核酸特征部关于其相对位置可以是有序的,但关于人们对存在于任何特征部处的核酸物质的序列的了解是随机的。作为更具体的示例,通过用模板核酸接种特征部的重复图案,并在每个特征部处扩增模板以在特征部处形成模板的拷贝(例如,经由簇扩增或桥式扩增)形成的核酸测序表面将具有核酸特征部的规则图案,但关于核酸序列在整个图案中的分布将是随机的。因此,在表面

上检测核酸物质的存在可产生特征部的重复图案,而序列特异性检测可产生信号在整个表面上的非重复分布。

[0053] 应当理解,本文提供的对图案、顺序、随机性等的描述不仅涉及对象上的特征部(例如,具有此类特征部的固体基底,诸如固体支持物或表面上的特征部),而且还涉及图像数据或从此类图像数据生成的图像,该图像数据包括或描绘具有如本文所述的特征部的此类对象。因此,图案、顺序、随机性等可以用于存储、操纵或传送图像数据的多种格式中的任何一种存在,包括但不限于计算机可读介质或计算机部件,诸如图形用户界面或其他输出设备。

[0054] 如本文所用,术语“基准点”旨在表示对象(诸如具有用于待分析的分子材料的位点的支持物或基底,诸如流通池表面)中或对象上以及所获取的对象的图像数据中的可区分的参考区域(例如,点或区域)。基准点可以是例如标志、对象、形状、边缘、区域、不规则物、通道、凹坑、柱子,或者在许多情况下可用作参考的位于已知位置、几何形状和/或配置处的特征部的集合。可在对象的图像中或者在从检测(例如,成像)对象得到的另一数据集中检测基准点。

[0055] 基准点被包括在本公开所设想的图案化表面上或图案化表面中以及位点和分子的图像数据中,以便于识别和定位图案化表面上的单独特征部,包括分子所处的位点。基准点适用于配准位点或特征部的空间位置,因为基准点为此类位点或特征部的相对位置提供了参考区域或参考点。基准点适用于以下应用:其中重复地检测支持物和位点,以跟踪随时间和连续处理循环而在单独位点处发生的变化。例如,基准点可允许通过在多个测序循环中获得的连续图像跟踪单独核酸簇,使得可准确地确定存在于单独簇处的核酸物质的序列。

[0056] 考虑到前述内容,在某些真实世界的实施方式中,本技术便于生成图案化流通池基底上的荧光发射器的图像的聚焦质量的定量测量,其可使用核酸测序仪或类似的基于图像的系统来处理。在此类语境下,可使用本文所述的度量来量化聚焦质量,而不管仪器或仪器类型、流通池类型或流通池上的位置如何。举例来说,可通过测序仪(即,测序系统)获取流通池的荧光图像。可定义荧光图像的子区域,并且对于子区域中的一个或多个子区域,可计算相应离散傅立叶变换和功率谱密度。在一个此类示例中,计算所得功率谱的径向均值(或其他集中趋势量度,诸如中值或众数)。生成最小二乘拟合(或其他合适的拟合量度),以将分段函数拟合到功率谱(例如,积分功率与半径的散点图),并且拟合的函数用于导出以下各项中的一者或多者的值:(1)与聚焦质量对应的径向斜率;(2)转角频率,该转角频率确定找到聚焦信息的最大空间频率;和(3)本底噪声,低于该本底噪声则得不到有用的信息。

[0057] 在此类测序仪语境下,并且如本文所讨论的,导出的聚焦质量度量(即,径向斜率)在很大程度上对图案化表面上的荧光发射器的强度不敏感。结果是,在移植和模板杂交过程中观察到的正常可变性以及激发强度的不均匀性的存在下,聚焦质量度量是稳健的。此外,由于本方法在此类测序语境下依赖于从视场中的数千至数万个荧光发射器生成的周期性信息,因此其对所获取的荧光图像中的正常不均匀性不敏感。附加益处还可包括生成关于生成图像的光学系统的点扩散函数(PSF)(例如,基于洛伦兹分布曲线)的附加诊断数据以及关于样本平面倾斜(即,与正在成像的基底或表面相关联的焦平面的倾斜)的信息。此类信息作为初始或一次性校准的一部分、作为周期性执行的校准或重新校准的一部分或作

为在相应扫描操作期间每隔一段时间(例如,每10、20、30、40或50个循环)执行的重复或运行时重新校准的一部分可能是有价值的,以便初始化、更新或校准用于在整个扫描过程中维持聚焦质量的聚焦模型。另外,在本文所述的聚焦质量量化技术的某些实施方式中,没有假设PSF具有高斯分布曲线(与其他常规方法不同)。实际上,在某些实施方案中,洛伦兹分布曲线可更好地描述PSF。因为没有假设高斯分布,所以本文公开的聚焦质量量化技术在它们的应用中比依赖于此类假设的其他方法更灵活。

[0058] 考虑到前述内容,本文将关于聚焦度量和/或使用此类度量参数化或校准的聚焦模型的生成和使用以及关于它们在分析系统和方法中的使用来描述若干示例。应当理解,还提供了用于以自动或半自动方式执行这些方法的系统,并且此类系统将包括处理器、数据存储设备和用于图像分析的程序,该程序包括用于执行一种或多种方法的处理器可执行指令,该一种或多种方法被提供用于使用离散傅立叶变换来生成聚焦度量,并且在诸如核酸测序语境等真实世界的成像语境下使用此类聚焦度量。因此,本文所讨论的方法可在例如具有此类目的所需的部件和可执行例程的计算机上执行。

[0059] 本文所述的方法和系统可用于分析多种材料中的任一种,这些材料为诸如生物样本和分子,它们可位于多种对象上或对象中。有用的对象是具有附着的分析物的固体支持物或固相表面。当与在x平面、y平面中具有特征部的重复图案的对象一起使用时,所描述的方法和系统可在评估和校正成像器聚焦质量方面提供优势,该对象诸如为具有附着的分子的集合的图案化流通池,该分子诸如为DNA、RNA、来自病毒的生物材料、蛋白质、抗体、碳水化合物、小分子(诸如药物候选物)、生物活性分子或任何其他感兴趣的分析物。

[0060] 前述内容提供了关于术语和过程的有用背景和语境,而下文提供了可利用或处理样本基底并受益于如本文所述的聚焦质量度量的合适系统和功能工作流程的示例。举例来说,图1描绘了光学图像扫描系统10(诸如测序系统)的示例,其可与所公开的聚焦质量量化技术结合使用以处理生物样本。关于此类成像系统10,应当理解,此类成像系统通常包括保持待成像的样本或其他对象(例如,具有间隔开的样本位点的图案化表面的流通池或测序盒)的样本台或支持物以及包括用于成像操作的光学器件的光学台。此类成像系统10的聚焦操作通常涉及相对于样本台移动光学台。作为其操作的一部分,此类成像系统可在一种模式下操作以生成聚焦模型,诸如通过将样本台相对于光学台保持在固定位置处持续一段时间以获取聚焦信息。如本文所讨论的,作为聚焦模型生成(或重新校准)的一部分,可生成如本文所述的聚焦质量度量,以参数化或更新聚焦模型。在单独的测序操作模式中,可使用经校准的聚焦模型来执行快速聚焦调整,以维持足够的通过量。

[0061] 转向图1,示例性图像扫描系统可包括用于获得或产生诸如流通池的图块、子图块或线(例如,样本位点行或像素行)等区域的图像的设备。图1中所示的示例示出了以背光操作配置来配置的示例性图像扫描系统。在所描绘的示例中,对象样本位于样本容器110上,该样本容器定位在物镜142下方的样本台170上。光源160和相关联光学器件将光束(诸如激光或超辐射发光二极管(SLED))引导到样本容器110上的选定样本位置。样本发出荧光,并且所得光由物镜142收集并被引导到光电探测器140以检测荧光。样本台170相对于物镜142移动以将样本容器110上的下一个样本位置定位在物镜142的焦点处。样本台170相对于物镜142的移动可通过移动样本台本身、物镜、整个光学台或这些结构的任何组合来实现。另外的示例还可包括将整个成像系统移动到固定样本上。

[0062] 如下文更详细讨论的,流体递送模块或设备100将试剂(例如,荧光核苷酸、缓冲液、酶、裂解试剂等)流引导到(并通过)样本容器110和废液阀120。在一些应用中,样本容器110可被实施为流通池,该流通池包括在样本容器110上的多个样本位置处的核酸序列簇。待测序的样本可与其他任选组分一起附着到流通池的基底。在实践中,设置在流通池的表面上多个样本位置可被布置为间隔开的样本位点,这些样本位点又可被细分为图块区域、子图块区域和线区域,它们各自包括多个样本位置的对应子集。

[0063] 所描绘的示例性图像扫描系统10还包括可任选地调节样本容器110内的流体条件的温度的温度站致动器130和加热器/冷却器135。可包括相机系统(例如,光电探测器系统140)以监测和跟踪样本容器110的测序。光电探测器系统140可被实施为例如CCD相机,其可与过滤器切换组件145内的各种过滤器、物镜142交互。光电探测器系统140不限于CCD相机,并且可使用其他相机和图像传感器技术。还可提供聚焦组件(例如,聚焦发射器150(例如,聚焦激光器或SLED)和聚焦检测器141),其结合聚焦模型(如本文所讨论的)操作以基于聚焦组件到聚焦模型的校准来提供快速或实时聚焦测量。

[0064] 可包括光源160(例如,任选地包括多个发射器的组件内的激发发射器(例如,激光器或SLED)),以经由通过光纤接口161(其可任选地包括一个或多个重新成像透镜、光纤安装件等)的照射来照射样本内的荧光测序反应。低瓦特灯165和反向分色镜185也在所示出的示例中呈现。在一些应用中,聚焦发射器150可在成像期间关闭。在其他应用中,另选聚焦配置可包括第二聚焦相机,该第二聚焦相机可以是象限检测器、位置敏感检测器或类似的检测器,以在数据收集的同时测量从表面反射的散射光束的位置。在此类另选配置中,仍可采用如本文所讨论的聚焦模型来校准快速聚焦检测机构的操作。

[0065] 尽管示出为背光设备,但其他示例可包括来自激光器、SLED或其他光源的光,该光通过物镜142被引导到样本容器110上的样本上(即,前光配置)。样本容器110可安装在样本台170上,以提供样本容器110相对于物镜142的移动和对准。样本台170可具有一个或多个致动器,以允许其以三个方向中的任一者移动。例如,就笛卡尔坐标系而言,可提供致动器以允许该样本台相对于物镜142在x、y和z方向上移动。这可允许样本容器110上的一个或多个样本位置定位成与物镜142光学对准。

[0066] 聚焦部件175在该示例中被示出为被包括在内以控制光学部件在聚焦方向(通常称为z轴或z方向)上相对于样本容器110的定位。聚焦部件175可包括一个或多个物理耦合到光学台或样本台或两者的致动器,以相对于光学部件(例如,物镜142)移动样本台170上的样本容器110,以为成像操作提供适当的聚焦。例如,致动器可物理耦合到相应样本台,例如通过机械、磁性、流体或其他附着或者直接或间接接触该样本台或与其接触。该一个或多个致动器可被构造成在z方向上移动样本台,同时将样本台维持在同一平面中(例如,维持垂直于光学轴的水平或水平姿态)。该一个或多个致动器还可被配置为使该样本台倾斜。例如,这可以进行,使得样本容器110可动态地调平以考虑其表面上的任何斜率。

[0067] 系统的聚焦通常是指将物镜142的焦平面与待成像的样本在选定的样本位置处对准。然而,聚焦也可指对系统的调整,以获得或增强样本表示的期望特征,诸如测试样本图像的期望清晰度或对比度水平。由于物镜142的焦平面的可用景深可能很小(有时为大约 $1\mu\text{m}$ 或更小),因此聚焦部件175紧密地跟随正在成像的表面。由于样本容器可能并非如固定在仪器中那样完全平坦,因此聚焦部件175可被设置为在沿着扫描方向(通常称为y轴)移动时

遵循该曲线。

[0068] 在正在成像的样本位置处从测试样本发出的光可被引导到一个或多个光电探测器140。光电探测器可包括例如CCD相机。可包括并定位光圈以仅允许从聚焦区域发出的光传递到光电探测器。可包括光圈以通过过滤掉从聚焦区域之外的区域发出的光的分量来提高图像质量。发射过滤器可包括在过滤器切换组件145中,可选择该过滤器来记录确定的发射波长并阻挡任何杂散光。

[0069] 在各种示例中,样本容器110(例如,流通池)可包括在其上提供样本的一个或多个基底。例如,在用于分析大量不同核酸序列的系统的情况下,样本容器110可包括待测序的核酸在其上结合、附着或相关的一个或多个基底。在各种示例中,该基底可包括核酸可附着到其上的任何惰性基底或基质,诸如玻璃表面、塑料表面、胶乳、葡聚糖、聚苯乙烯表面、聚丙烯表面、聚丙烯酰胺凝胶、金表面和硅晶片。在一些应用中,该基底在位于样本容器110上以矩阵或图案形成的多个位置处的通道或其他区域内。

[0070] 可提供一个或多个控制器190(例如,基于处理器或ASIC的控制器)来控制扫描系统(诸如参考图1所述的示例性图像扫描系统10)的操作。控制器190可被实施为控制系统操作的各方面,诸如扫描、聚焦(例如,聚焦质量的测量或量化、聚焦的调整等)、样本台移动和调整以及成像操作。在各种应用中,控制器可使用硬件、软件或前述硬件和软件的组合来实施。例如,在一些实施方式中,控制器可包括一个或多个CPU或具有相关联存储器的处理器。作为另一示例,控制器可包括硬件或其他电路以控制操作。例如,该电路可包括以下各项中的一者或多者:现场可编程门阵列(FPGA)、专用集成电路(ASIC)、可编程逻辑设备(PLD)、复杂可编程逻辑设备(CPLD)、可编程逻辑阵列(PLA)、可编程阵列逻辑(PAL)或其他类似的处理设备或电路。作为又一示例,控制器可包括该电路与一个或多个处理器的组合。

[0071] 尽管本文中聚焦质量度量的生成和/或使用以及利用或基于此类度量的聚焦模型可在该示例性系统的语境下描述和讨论,但这仅是可实施这些技术的一个示例。在阅读本说明书之后,本领域普通技术人员将理解本文所述的系统和方法可如何利用该扫描仪和其他扫描仪、显微镜以及其他成像系统来实施。

[0072] 前述描述覆盖了诸如测序系统等光学图像扫描系统10的部件和特征部,而图2在功能工作流程的语境下讨论了此类系统10的使用。提供该讨论以便为聚焦质量度量的生成和使用的后续讨论提供有用的真实世界的语境。以此方式,希望随后描述的聚焦质量度量的使用和重要性将被更充分地理解。

[0073] 考虑到这一点,并且转向图2,提供了结合系统部件示出了示例性工作流程的框图。在该示例中,工作流程和对应系统部件可适于处理图案化流通池(诸如用于生物应用)、对图案化流通池表面进行成像以及分析从成像导出的数据。

[0074] 在示出的示例中,分子(诸如核苷酸、寡核苷酸和其他生物活性试剂)可被引入到可预先制备的相应样本容器110中。如本文所述,此类样本容器110可包括流通池、测序盒或具有基底的其他合适结构,该基底涵盖用于成像的样本位点。所描绘的具有系统部件的工作流程可用于合成生物聚合物,诸如DNA链,或用于对生物聚合物进行测序。然而,应当理解,本技术不限于测序操作、基因表达操作、诊断应用等,而是可更一般地用于处理所收集的图像数据以导出聚焦质量度量,诸如针对从样本或样本保持器的成像检测到的扫描带或区域,如下文所述。含有图案化或以其他方式可检测的特征部的其他基底可类似地与所公

开的技术及系统一起使用。

[0075] 在本发明的语境下, 示例性生物聚合物可包括但不限于核酸, 诸如DNA、RNA或DNA或RNA的类似物。其他示例性生物聚合物可包括蛋白质(也称为多肽)、多糖或它们的类似物。尽管可根据所描述的技术处理多种生物聚合物中的任一种, 但为了便于和简化解释, 将关于核酸的处理来描述在示例性语境下用于处理和成像的系统和方法。一般而言, 所描述的工作流程将处理样本容器110, 样本容器中的每一个样本容器可包括反应位点的图案化表面。如本文所用, “图案化表面”是指支持物或基底的表面, 该表面具有大量不同的离散并且间隔开的反应位点, 使得不同反应位点可根据其相对位置而彼此区分。单一种类的生物聚合物可附着到每个单独反应位点。然而, 一种生物聚合物的多个拷贝可附着到反应位点。作为整体来看, 该图案可包括附着在多个不同位点处的多种不同生物聚合物。反应位点可位于同一基底上的不同可寻址位置处。另选地, 图案化表面可包括各自形成不同反应位点的单独基底。这些位点可包括附着在特定的已知位置处的DNA片段, 或者可以是孔或纳米孔, 在该孔或纳米孔中待合成目标产物。在一些应用中, 系统可被设计成用于连续合成分子或对分子进行测序, 诸如基于常见核苷酸的聚合分子。

[0076] 在图2的图解表示中, 分析系统可包括处理系统224(例如, 测序系统或站), 其被设计成处理在样本容器110(诸如可包括图案化表面)内提供的样本, 并且生成表示图案化表面上的单独位点以及位点之间的空间的图像数据, 以及设置在图案化表面中或表面上的基准点的表示。数据分析系统226接收图像数据并根据本公开处理图像数据, 以从成像数据提取有意义的值, 如本文所述。然后, 下游处理/存储系统228可接收该信息并且在需要时将该信息与成像数据一起存储。下游处理/存储系统228可进一步分析图像数据或从图像数据导出的经处理的数据, 诸如以诊断生理状况、编译测序列表、分析基因表达等。

[0077] 关于可能与本发明的语境相关的数据分析系统226和/或下游处理/存储系统228, 可使用为Illumina测序仪市售的实时分析(RTA)协议来分析图像数据。黑暗(非信号产生区域或像素)和光亮(信号产生区域或像素)可分别被分配0和255的强度水平, 或者这些强度水平之间的任何期望的其他水平。

[0078] 处理系统224可采用生物分子试剂递送系统(在图2的示例中示出为核苷酸递送系统230), 以用于随着处理的进行而将各种试剂递送至样本容器110。生物分子试剂递送系统可与图1的流体递送模块或设备100对应。处理系统224可执行多个操作, 样本容器110和对应样本通过这些操作前进。这种前进可以多种方式实现, 包括例如样本容器110到不同站的物理移动, 或样本容器110(诸如流通池)在系统中的装载, 在该系统中样本容器110被移动或光学系统被移动或这两者均被移动, 或流体的递送经由阀致动来执行。系统可被设计成用于循环操作, 其中用单核苷酸或寡核苷酸促进反应, 随后进行冲洗、成像和去封闭, 以为随后的循环做准备。在实际系统中, 样本容器110和对应样本被设置在处理系统224中, 并且在从测试样本提取所有有用的信息之前, 在多个连续循环中执行用于反应、冲洗、成像、去封闭等的自动或半自动操作序列。同样, 应当注意, 图2中所示出的工作流程并非限制性的, 并且本技术可对从用于任何应用的任何合适系统获取的图像数据进行操作。应当注意, 虽然在本公开中引用了“成像”或“图像数据”, 但是在许多实际系统中, 这将需要实际光学成像以及从电子检测电路(例如, 相机或成像电子电路或芯片)提取数据, 但也可采用其他检测技术, 并且表征感兴趣的分子的所得电子或数字检测数据也应当被认为是“图像”或“图

像数据”。

[0079] 在图2中所示的示例中,核苷酸递送系统230向样本容器110提供工艺流232。来自样本容器110(例如,流通池)的流出物流234可例如在核苷酸递送系统230中被重新捕获和再循环。在示出的示例中,流通池的图案化表面可在冲洗站236处被冲洗(或者在许多情况下通过致动适当的阀(诸如图1的废液阀120)来冲洗),以移除附加试剂并澄清样本容器110内的样本以用于成像。然后通过成像系统10(其可在同一设备内)对样本容器110进行成像,诸如使用线成像或区域成像技术。由此生成的图像数据可被分析,例如以用于确定渐进地构建的核苷酸链(诸如基于模板)的序列。在一个可能的实施方案中,成像系统10可采用共聚焦线扫描以产生渐进的像素化图像数据,可分析该渐进的像素化图像数据以定位图案化表面上的单独位点并且确定最近附着或结合到每个位点的核苷酸的类型。也可适当地采用其他成像技术,诸如采用“步进拍摄”或其他基于区域的成像方法的技术。

[0080] 如上所述,成像系统10的成像部件可更一般地被认为是“检测装置”,并且可采用能够对表面进行高分辨率成像的任何检测装置。在一些示例中,检测装置将具有足够的分辨率,从而以本文阐述的密度、间距和/或特征部尺寸来区分特征部。检测装置的示例是被构造在获得区域图像时使对象和检测器维持已知几何关系的那些装置。如上所述,可使用线扫描装置(例如,时间延迟和积分(TDI)扫描装置),以及获得连续或接续区域图像的系统(例如,“步进拍摄”检测器)。线扫描检测器可被构造扫描流通池(或其他样本保持基底)上的交叉样本(常规地表示为x维度)中的线,同时流通池在扫描方向(常规地表示为y维度)上渐进地移动。应当理解,可移动检测设备、对象或两者以实现扫描检测。适用于例如核酸测序应用的检测装置在以下文献中有所描述:美国专利申请公开号2012/0270305A1;2013/0023422A1;和2013/0260372A1号;以及美国专利号5,528,050;5,719,391;8,158,926和8,241,573,所有这些文献的全部内容以引用方式并入本文以用于所有目的。

[0081] 在一个示例中,并且如本文更详细讨论的,在本文阐述的方法或系统中使用的成像系统10可沿着图案化表面的y维度扫描,在该过程中扫描图案化表面的位点的平行扫描带或线。图案化表面可包括粗略对准标志物,该粗略对准标志物区分沿着x维度的位点的扫描带的相对位置。当使用粗略对准标志物时,这些粗略对准标志物可与检测装置协作,诸如以确定位点的扫描带中的至少一个扫描带的位置。任选地,检测装置和/或具有图案化表面的样本容器110的相对位置可基于针对扫描带确定的位置来调整。在一些示例中,可由处理器或计算机(诸如用于执行配准或特征部识别的计算机)通过算法来执行扫描带的位置的确定。因此,系统可用于在计算机上执行算法,以确定图像数据中的特征部的位置,以及表征每个位点处的分子。

[0082] 在成像之后(例如,在成像系统10处),样本容器110可前进到去封闭站240以进行去封闭,在此期间封闭分子或保护基与标志染料一起从最后添加的核苷酸上裂解。举例来说,如果处理系统224用于测序,则来自成像系统10的图像数据将被存储并转发到数据分析系统226。

[0083] 数据分析系统226可包括通用或专用编程计算机,该计算机提供用户界面和图像数据的自动或半自动分析,以确定四种常见DNA核苷酸中的哪一种可能最后添加到了图案化表面上的位点中的每一个位点处,如下文所述。如本领域技术人员将理解的,此类分析可基于四种常见DNA核苷酸中的每一种核苷酸的独特标记染料的色彩来执行,并且因此,可针

对图案化表面的每个成像区域获得一个或多个光频率或光频率组合下的多个图像。该图像数据可由下游处理/存储系统228进一步分析,该下游处理/存储系统可存储如下文所述从图像数据导出的数据以及适当情况下的图像数据本身。同样,测序应用旨在作为一个示例,并且可执行其他操作,诸如诊断应用、临床应用、基因表达实验等,这些操作将生成由本技术操作的类似成像数据。

[0084] 如上所述,在一些实施方式中,具有图案化表面的样本容器110(例如,流通池)可保持在固定位置,并且所引用的“站”可包括如上所述作用于样本容器110的集成子系统(例如,用于引入以及与期望的化学物质反应、冲洗、成像、图像数据收集等)。数据分析可与其他处理操作同时执行(即,“实时”执行),或可通过从适当的存储器(在同一系统中或别处)访问图像数据或从图像数据导出的数据来进行后处理。在许多应用中,图案化表面“容器”将包括盒或流通池,图案化表面存在于该盒或流通池中,并且期望的化学物质通过该盒或流通池循环。在此类应用中,可通过并经由流通池进行成像。流通池可适当地定位(例如,在x-y平面中),并且根据成像的需要进行移动(例如,在x、y和z方向上)。当将流通池安装在装置中时,可直接与流通池进行期望的化学物质连接。此外,根据所使用的设备设计和成像技术,包封在流通池中的图案化表面可初始位于x-y平面中,并且在成像期间在该平面中移动,或者成像部件可在成像期间平行于该平面移动。一般而言,本文的“x-y平面”也是支撑位点的图案化表面的平面,或平行于该平面的平面。因此,可以说流通池在x-y平面中延伸,其中x方向是横穿样本的方向,并且y方向对应于扫描方向,流通池在扫描操作期间在该扫描方向上经历相对运动。然而,应当理解,这种取向可颠倒或以其他方式变化。流通池和对应图案化表面还可在z方向上移动,z方向是聚焦方向,通常与由x和y维度限定的平面正交。此类移动可适用于将流通池固定在适当位置,以用于形成到流通池的流体连接,以及用于成像(例如,将用于对位点进行成像的光学器件聚焦在精确的z深度处)。在一些应用中,光学器件可在x方向上移动以用于精确成像。

[0085] 考虑到前述内容,图3示出了图案化表面288的示例,该图案化表面可作为样本容器110的一部分存在或存在于该样本容器内。如图3所示,可提供多个网格或扫描带290(本文描绘为y维度上的竖直扫描带),使得每个网格或扫描带包括待成像的大量单独图块294。每个图像图块294又包括大量样本位点(例如,捕获或反应位点),它们可在处理操作(例如,测序操作)的不同循环时显示感兴趣的活动。如本文所述,图案化表面288的大范围的布局是可能的,并且本技术不旨在限于任何期望的或特定的布局。在渐进线扫描语境下,随着成像的进行,样本容器110(或其中的图案化表面288)将在索引方向上经历相对运动,使得可对扫描带290中的每一个扫描带进行成像。应当注意,在图3的视图中,未示出图案化表面288可能位于其中的周围流通池。

[0086] 图4在一定程度上更详细地示出了扫描带290中的多个样本位点340(例如,孔或纳米孔)上的扫描线310。举例来说,在流通池的语境下,位点340可以是凝胶填充的孔,每个孔被核酸(例如,DNA)集落占据。如上所述,在一些实施方式中,位点340可以任何合适的网格图案布置。在示出的示例中,位点340以六边形图案布置,但也可采用矩形图案(例如,直线图案)以及其他图案。参考一个或多个基准点或参考特征部,诸如网格的边缘342或图案化表面的一部分,每个位点340的位置将是已知的。

[0087] 图5表示一种类型的示例性图像的一部分,该图像可基于通过对图案化表面的感

感兴趣的区域进行渐进扫描而收集的图像数据来生成。实际图像350由大量像素352组成,这些像素中的每一个像素由成像系统10分配数字值。在所设想的语境下,表示图像350的像素数据可编码与明亮或光亮像素354和较暗像素356对应的值。举例来说,黑暗(即,非信号产生区域或像素)和光亮(即,信号产生区域或像素)可分别被分配0和255的强度水平,或者这些强度水平之间的任何期望的其他水平。在实践中,可采用各种灰度级或甚至色彩编码,使得可通过检测像素之间的对比度或色彩值差异来识别单独位点340,如由它们的单独数字值所指示的。应当注意,在本文所述的测序语境下,并且与其他常规成像操作相反,所讨论的图像350没有被完全解析,并且可能由于感兴趣的特征部(例如,样本孔或位点340)的尺寸、像素352的尺寸以及在形成图像350时可能执行的混叠而对应地欠采样。由于图像350没有被完全解析,因此使用常规方法可使聚焦质量的评估进一步复杂化,尽管如本文所讨论的那样导出的聚焦质量度量适于与此类图像350一起使用。

[0088] 根据前述背景讨论和语境可理解,聚焦操作可以是成像过程的重要部分,该成像过程用于生成流通池或其他基底的图案化表面的图像数据,是测序或其他分析或诊断操作的一部分。如前所述,并且如本文所讨论的,可为成像操作(例如,处理流通池的测序运行)准备聚焦模型,并且然后可使用聚焦模型在成像操作期间相对于图案化表面上的样本初始定位、监测和校正物镜142的位置。聚焦模型可在操作期间与由聚焦发射器150生成的聚焦光束结合使用,聚焦光束从样本位置反射以测量所需的聚焦,并且样本台相对于光学台移动以将光学台聚焦到当前样本位置上。举例来说,相对于聚焦模型来校准聚焦光束,使得在操作期间聚焦光束的给定测量可用于验证在样本位点处的聚焦或者提供对聚焦高度的所需校正的指示。如本文所讨论的,对于给定的测序运行,聚焦质量度量可被初始地或周期性地计算并用于参数化或重新校准聚焦模型。

[0089] 在成像期间样本台170相对于光学台的用于聚焦调整的移动通常被描述为沿着z轴或在z方向上的移动。术语“z轴”和“z方向”旨在与它们通常在显微镜和成像系统领域中的使用保持一致,在这些领域中z轴是指焦轴。因此,z轴平移导致焦轴的长度增加或减少。例如,可通过相对于光学台移动样本台170(例如,通过移动样本台或光学元件或两者)来执行z轴平移。因此,z轴平移可通过驱动物镜142、光学台或样本台170或前述各项的组合来执行,它们中的任一者可通过致动与物镜142或样本台170或两者功能性连通的一个或多个伺服器或马达或其他致动器来驱动。在实践中,样本台可相对于光学台倾斜,以例如在垂直于光学成像轴的平面上有效地调平样本容器(例如,流通池)。尽管本公开采用了术语z轴和方向,但是应当理解,这样做是为了描述的清楚和以及与常规术语的一致性。本文所公开的原理不依赖于这些助记符,并且可使用其他术语来描述x、y和z方向上的移动。

[0090] 图6是示出了用于聚焦操作的示例性聚焦控制系统的框图,该示例性聚焦控制系统可使用本文所讨论的聚焦模型作为输入或基线。该示例性聚焦控制系统包括聚焦跟踪电路380,该聚焦跟踪电路被构造成确定用于生成驱动信号的当前聚焦设置,该驱动信号驱动z台384中的聚焦跟踪反馈回路。如图6的示例中所示,基于聚焦设置差异的命令396被馈送到z台384,以控制z台384的移动。

[0091] 在该示例中,z台384被构造成驱动物镜142。致动器394响应于由z台放大器390提供的驱动信号而移动光学台,特别是物镜142。如上所述,致动器394可包括压电致动器、音圈致动器、马达或其他类似致动器。位置编码器392提供关于致动器位置及其移动的信息。

该编码器信息400可通过z台控制器388反馈到聚焦跟踪电路380并且可用于确定误差信号。

[0092] 用于控制移动的控制器的使用具有前馈的比例、积分和微分 (PID) 控制器来实施, 包括位置和速度控制器。它们可包括用于误差信号和前馈控制分支两者的比例、积分和微分控制。一些示例还可包括附加过滤器和轨迹生成, 该过滤器和轨迹生成可用于根据用例来提高系统的稳定性。

[0093] 图7是示出了根据本文所述的系统和方法的一个示例的z台控制器的示例性架构的图解。该示例性控制器结合了前馈和反馈控制两者, 以生成驱动信号来控制样本台致动器394。在一些示例中, 这可被实施为针对控制系统的误差信号和前馈控制分支中的任一者或两者的PID控制。如该示例中所示, 计算靶标z位置 (即, 聚焦设置) 420与实际z位置424之间的差异并将其馈送到控制块432。位置信息也经由前馈路径428发送, 并被添加到控制块432的输出信号中。来自控制块432内的驱动电路的该输出信号提供用于驱动致动器394的控制输出信号。如图所示, 经由前馈路径428提供靶标聚焦位置与实际位置之间的差异的量值, 以调整控制输出信号。

[0094] 前述讨论涉及诸如测序系统等光学图像扫描系统的实施方式的各个方面, 以及可在此类系统中采用的聚焦控制系统和逻辑的示例。如本文所讨论的, 聚焦评估、调整和控制与基于图像的核酸测序操作中的多个步骤相关, 诸如测序运行期间的流通池配准、聚焦模型生成、焦平面映射和聚焦跟踪。常规方法依赖于Brenner图像处理来评估聚焦。然而, 如本文所述, 当跨流通池表面的荧光团的强度不均匀和/或随时间变化时 (即, 当存在空间和/或时间强度不均匀性时), 基于Brenner分数的方法缺乏稳健性。对应地, Brenner分数不稳健, 因为它们不允许 (由于与强度相关) 跨仪器或流通池或甚至在一些情况下跨图像子图块进行比较。

[0095] 考虑到该语境, 本文描述了用于导出聚焦质量度量的各种技术, 该聚焦质量度量与强度无关并且可被用于建立、验证和维持聚焦质量以作为成像操作的一部分, 该成像操作包括对在核酸测序中使用的流通池执行的成像操作。如下文更详细地描述的, 本文公开的方法利用离散傅立叶变换 (DFT) 或其他合适的变换来提供用于量化流通池表面上的荧光发射器的聚焦质量的与强度无关的技术。因为该技术对于强度波动是稳健的, 所以它可用于表现出光漂白或其他强度变化动态的图像。

[0096] 如下文所讨论的, 本文所述的技术利用与图案化流通池相关联的规则图案化 (例如, 周期性图案化) 表面与离散傅立叶变换的组合, 以生成对应于聚焦的与强度无关的测量。该方法允许聚焦质量的量化, 而不管仪器、流通池类型或流通池上的位置 (例如, 图像图块或子图块) 如何。然后, 这样获得的量化的聚焦质量 (即, 聚焦质量度量) 可用于参数化或校准在测序操作期间使用的聚焦模型, 以用于在测序操作期间监测和调整聚焦。

[0097] 转向附图, 图8至图11示出了根据所公开的技术生成聚焦质量度量的各方面。特别地, 图8是根据一个可能的实施方式的可在生成聚焦质量度量时采用的步骤的一般化处理流程, 而图9至图11以图形方式示出了该处理流程的各方面。转向图8, 所描绘的过程开始于图像的获取 (步骤450), 诸如流通池或其他结合或含有表面的样本的图像。举例来说, 图像可部分地或整体地对应于图案化表面288的图像、此类表面的网格或扫描带290、此类扫描带290内的图像图块294、选自较大图块294的子图块、像素352的行或图像内的样本位点340的行。此外, 图像可由成像区域的单次拍摄或获取组成, 或者作为逐行执行的时间延迟积

分,或者可经由组合过程来构造,诸如以将多阶段获取组合成单个图像以供处理,诸如经由跨多阶段获取进行平均来生成图像。

[0098] 如前所述,在核酸测序操作的语境下,图案化表面的每个区域可被成像多于一次(即,每个色彩通道成像一次,诸如蓝色通道和绿色通道),其中不同的样本位点在给定的成像循环中基于用于生成相应图像的光频率而“开启”或“关闭”。结果是,每个区域可具有多于一个的图像,其中每个图像对应于不同的色彩或强度通道并且具有不同的活性或非活性的样本位点。在实践中,每个色彩通道可具有单独的最佳聚焦。考虑到这一点,并且关于本技术,可针对仅针对一个色彩通道(例如,蓝色通道或绿色通道)导出的图像生成聚焦质量度量,诸如针对被确定为足以维持系统的聚焦的色彩通道。另选地,可针对色彩通道中的两个或更多个色彩通道分别生成聚焦质量度量(例如,蓝色通道聚焦度量和绿色通道聚焦度量)并且确定对于使用每个色彩通道的成像而言可接受的中间聚焦高度。以此方式,可确定可用于使用(在该示例中)蓝色通道和绿色通道两者来获取图像的单个聚焦高度。

[0099] 在所描绘的处理流程中,可选择(步骤458)或识别图像的子区域,以用于后续处理步骤,从而针对经处理的子区域生成聚焦质量度量。举例来说,可选择一行像素或像素行或 256×256 像素、 512×512 像素、 1024×1024 像素等像素区域或窗口来进行处理。还应当理解,根据图像的尺寸,可处理图像本身而不是子区域。在实践中,图像(例如,没有被完全解析的图像)和图像子区域包括单独像素,每个像素具有空间位置和相关联的灰度或色彩强度值(例如,红色、绿色或蓝色强度值,这取决于与图像相关联的色彩通道)。在所描绘的处理流程中,在步骤466处提供图像子区域作为傅立叶变换(例如,离散傅立叶变换(DFT))的输入,该傅立叶变换输出图像子区域的对应傅立叶变换。

[0100] 该步骤在图9中以图形方式描绘,其中描绘了流通池的一部分(例如,图像图块294或像素线)的图像454(例如,荧光图像),从中选择图像454的子区域462用于处理。在所描绘的示例中,可使用一个或多个基准点468(例如,靶心基准点)来定位或以其他方式识别子区域462,因此可选择相同子区域462以用于在一系列成像运行中进行处理。

[0101] 对图像子区域462内的数据(即,与图像子区域462对应的空间位置和强度数据)执行离散傅立叶变换操作(步骤466)。在该步骤处输出所得傅立叶变换470(以及对应功率谱密度)。如本文所述,给定的图像454和子区域462可以是针对多通道成像语境下的给定灰度强度或给定色彩通道(例如,红色、绿色或蓝色)的,并且对应变换因此可涉及给定色彩或整体灰度图像以及相应激发频率的活性/非活性样本孔的对应图案。

[0102] 返回到图8,可计算均值(或中值)径向强度(从傅立叶变换470的中心测量)(步骤474),这提供了量值随距离减小的速度的量度。可根据径向均值(或中值)强度来确定功率谱(步骤480)。这在图10中以图形方式图示,其中示出了傅立叶变换的输出,根据该输出确定径向均值强度(步骤480)并将其用于功率谱482的计算,在该功率谱中针对每个 r 绘制了积分功率。

[0103] 然后计算功率谱482的若干参数,每个参数提供有用的信息,包括与聚焦质量对应的定量度量。举例来说,并且转向图8,从功率谱482导出径向斜率、转角频率和/或本底噪声中的一者或多者(步骤484)。举例来说,在一个实施方式中,并且如图11中所示,分段函数(例如,包括两个或更多个单独拟合分段)可拟合到功率谱482。然后可确定分段函数的与径向斜率、转角频率和/或本底噪声对应的各种度量。

[0104] 举例来说,并且如图11所示,可使用最小二乘拟合方法或其他合适的拟合方法将分段函数拟合到功率谱482。在所描绘的示例中,分段函数包括两个线性分段。拟合的水平分段500对应于本底噪声,低于该本底噪声则得不到信息,并且其中所测量的信号与电子噪声或其他噪声对应。分段500的y截距给出了本底噪声的值。

[0105] 另一分段502以一定角度与本底噪声分段500相交,并且与非噪声有用信号对应。分段502的斜率是径向斜率并且取决于聚焦质量,使得径向斜率的测量提供聚焦质量的定量度量。即,在本发明的语境下,分段502的斜率包括聚焦质量度量,通过该聚焦质量度量,与功率谱482对应的输入图像子区域462的聚焦可被评价和/或与其他子区域462进行比较。如前所述,其他方法假设点扩展函数具有高斯分布曲线,因为它涉及径向斜率。然而,在本文公开的方法中没有做出此类假设。实际上,在某些实施方案中,点扩散函数的洛伦兹分布曲线以及径向斜率的对应含义可能替代地是合适的。

[0106] 分段500和502的交点504出现在转角频率处,该转角频率与最大空间频率对应,针对该最大空间频率确定聚焦信息并且该最大空间频率可提供有用的诊断信息。可能感兴趣并且可被计算的其他度量包括观察到值的本底噪声之上的最高频率,其提供了关于所观察到的观察信号强度范围的信息,以及分段500和502中的一者或两者的拟合优度,其可通过量化测量数据的可变性被模型拟合函数解释的程度来提供关于所讨论的相应度量的质量或可靠性的信息。

[0107] 在核酸测序语境下,将斜率用作聚焦质量度量对图案化表面上的信号强度的变化(例如,荧光团强度的变化)(诸如在图案化表面上的不同位置处的图像图块之间)基本上不敏感。对应地,将斜率用作聚焦质量度量对于在与核酸测序操作相关联的移植和模板杂交过程的语境下观察到的正常可变性以及对于与此类操作中的激发强度相关联的不均匀性是稳健的。此外,因为本文公开的方法依赖于从视场中的数千至数万个荧光发射器生成的周期性信息,所以聚焦质量度量也对在测序操作中获取的图像中观察到的正常不均匀性不敏感。另外,本文所述的聚焦质量度量的生成和使用还提供关于用于生成图像数据的光学成像系统的点扩散函数(PSF)的附加诊断数据。如本文所述,本文所述的聚焦质量度量的方法没有假设光学PSF具有高斯分布,这使得该方法比需要此类假设的常规方法更灵活。最后,还可导出关于样本平面倾斜的详细信息,因为可使用图案化表面上的不同位置处的聚焦质量度量的值来确定不同位置处的实际焦平面,并因此识别样本表面的倾斜。

[0108] 考虑到前述内容,执行实验以评价如本文所述的聚焦质量度量。在第一实验设置中,获取在沿着流通池表面的z维度的不同高度处获取的图像堆栈。在该设置中,从设置在流通池表面上的自动定心十字基准点并使用两个色彩通道(蓝色和绿色)获得z维度上的图像堆栈。以 $0.1\mu\text{m}$ 增量在z维度上获取图像。在附加方面,一旦确定了优化聚焦的焦平面高度,z维度上的高度就被固定,并且也在该最佳聚焦高度处获取图像,同时在基准点上滴定激发激光功率和曝光量。对于所有图像,对以自动定心十字基准点为中心的 $256\text{像素}\times 256\text{像素}$ 区域进行裁剪并分析聚焦质量。

[0109] 转向图12A至图12C和图13A至图13C,结合径向斜率(上部散点图520)和转角频率(下部散点图524)的相应散点图描绘了针对在图像的z堆栈内的不同高度处获取的图像获得的一系列分段函数。对于z维度上不同高度处的对应图像子区域图像462,计算傅立叶变换和相应功率谱482,并确定相应径向斜率和转角频率。在所描绘的示例中,图12A、图12B和

图12C描绘了在z维度上不同高度处获取的六个不同子区域图像462的相应功率谱、径向斜率(相对于线分段502)和转角频率504的代表性散点图,而图13A、图13B和图13C描绘了计算了径向斜率和转角频率的对应图像子区域462。在所描绘的示例中,所描绘的功率谱和散点图520和524是针对单个色彩通道(蓝色通道)的。

[0110] 如图12A、图12B和图12C所示,在z堆栈中较高和较低高度处获取的图像数据具有较陡的斜率,其对应于较低的斜率值(由于斜率的负值度)和较差的聚焦质量。相反,较高的斜率值与优良的聚焦质量相关联,这里对于朝向图像的z堆栈的中间获取的图像数据观察到这一点。图13A、图13B和图13C描绘了与图12A至图12C的相应功率谱482和径向斜率对应的子区域图像数据。如前所述,转角频率(在图像的z堆栈中的高度范围上的下部散点图中示出)对应于最大空间频率,针对该最大空间频率确定聚焦信息并且该最大空间频率可提供有用的诊断信息。

[0111] 虽然图12A至图12C和图13A至图13C示出了在单个色彩通道(例如,蓝色通道)上获取的图像的结果,但是在实践中,可能期望针对在成像操作中采用的每个色彩通道(例如,蓝色、绿色、红色等)计算聚焦质量度量。然后可确定中间或“折衷”聚焦高度,该聚焦高度为每个色彩通道提供足够的聚焦,从而允许在对两个色彩通道进行成像时使用相同的聚焦高度。此类方法可通过允许对多个色彩通道采用单个聚焦高度来节省计算和系统时间和资源。

[0112] 举例来说,转向图14,针对蓝色通道和绿色通道一起示出和绘制了在所描述的实验设置中获取的图像的z堆栈的径向斜率和转角频率结果。蓝色通道和绿色通道的图像的z堆栈的径向斜率在上部散点图530中示出和绘制,而蓝色通道和绿色通道的图像的z堆栈的转角频率在下部散点图534中示出和绘制。如该示例中所示,对于蓝色通道和绿色通道,径向斜率和转角频率两者都随着高度而变化(例如,与z维度上的高度相关或者可与z维度上的高度相关),如先前所述。关于径向斜率,蓝色通道和绿色通道两者似乎在z维度上的类似高度处(即,在约-0.02和-0.03处或之间)具有聚焦质量的局部最佳值。因此,基于时间或计算约束,可通过评价两个或更多个色彩通道的聚焦质量度量并确定为所有色彩通道提供足够聚焦质量的聚焦高度来建立或验证成像操作的聚焦高度。相反,在不存在时间或计算约束的情况下和/或如果确定需要针对每个色彩通道单独优化聚焦,则可针对每个色彩通道单独并且独立地计算聚焦质量度量(即,径向斜率)以确定每个通道的最佳聚焦高度。

[0113] 关于本文公开的聚焦质量度量(即,径向斜率)相对于常规方法的性能,图15描绘了图像数据的Brenner分数形式的聚焦质量量度的散点图(底部散点图560),其中如本文所讨论的径向斜率也被计算为斜率质量度量(上部散点图564)。关于这些散点图,针对绿色通道和蓝色通道两者并且在确定为最佳聚焦高度的z维度上的固定高度处,获取所获取的用于评估聚焦质量的图像数据。滴定激发激光功率和曝光量,并在不同的“激光功率×曝光量”值下获取图像。因此,在该实验设置中,尽管在每个图像中处于相同的固定z值和相同的子区域,但像素强度在图像之间变化。

[0114] 如本文所述,Brenner分数与强度相关,并且因此基于底层图像内的强度或强度变化而波动。对应地,并且如底部散点图560中所示,在蓝色通道和绿色通道两者上观察到的Brenner分数变化很大,尽管各自的图像都是在z维度上的相同高度处(即,在相同聚焦处)获取的。

[0115] 相反,如上部散点图564所示,从绿色通道和蓝色通道导出并针对它们绘制的径向斜率基本上与强度无关,表明在采样的“激光功率×曝光量”的范围上几乎没有变化。即,对于在z维度上的固定高度处获取的图像数据,作为聚焦质量度量的聚焦斜率随着像素强度的变化表现出相对较小的变化。

[0116] 类似地,转向图16,示出了实验结果,其示出径向斜率确实随着z维度上的高度而变化,证实了径向斜率与聚焦质量对应。如图所示,没有明显的非局部最大值。此外,对于成像的流通池,斜率曲线在不同的y坐标处保持类似,即,通过该方法识别的聚焦高度似乎适于图案化表面上的其他位置。结果是,可使用基于所示类型的散点图的校准曲线来确定图像上的不同位置距离最佳聚焦有多远。

[0117] 在类似的语境下,并且通过进一步的实验数据,使用相应测序仪系统对多个流通池进行成像。对于相应子区域图像区域,计算径向斜率和转角频率。转向图17,针对每个流通池绘制了相应径向斜率和转角频率值(分别为上部散点图580和下部散点图584),其中流通池标识符(FCID)沿着散点图的底部。如图所示,对于相应测序仪设备,径向斜率在各流通池间基本上恒定,这是可预期的,因为径向斜率和聚焦质量可与仪器相关,使得相同的仪器在各次序列运行之间应当具有相同的聚焦特征。应当注意,描绘了对应于流通池标识符12VA1COMC的一个离群值。在对应于该离群值的测序运行中,对流通池进行失焦成像,以便证明对径向斜率的对应影响。

[0118] 如本文先前所述,可使用如本文所讨论的聚焦质量度量导出的其他信息包括整个表面(例如,流通池的图案化表面)上或此类表面的区域或一部分的聚焦高度的变化或一致性。在实践中,这可等同于表面或台的“倾斜”或其他不规则性的存在或不存在,其对应于焦平面与样本平面之间的差异。举例来说,并且转向图18,描绘了对应于图像454的表示。在该示例中,将图像454分割成子区域462(即,子图块,此处具有128像素×128像素的尺寸),如本文所讨论的那样处理这些子区域中的每一个子区域,以计算子区域462的径向斜率。图18描绘了子区域462的表示,这些子区域根据它们在x维度和y维度上的位置来布置,并且被视觉编码以对应于它们的计算的径向斜率值。如图所示,计算的径向斜率可以系统性方式在整个成像表面上变化,这可指示向载玻片或台的倾斜。此类倾斜可在随后的测序运行期间通过适当改变聚焦高度来解决。

[0119] 应当注意,如上所讨论的聚焦质量的评估可被进一步一般化。特别地,前述讨论通常假设傅立叶变换470径向对称。当存在或假设此类径向对称性时,此类径向对称允许傅立叶变换470在一维(例如,z维度)中拟合,如上文所讨论的。然而,此类径向对称性可以是特殊情况,或者如果傅立叶变换基本上接近径向对称,则可假设此类径向对称性。

[0120] 在更一般化的语境下,傅立叶变换470可沿着对角线伸长(例如,可不展现径向对称性)并且可被表征为“像散”。这种情况的示例在图19中示出,其中结合对应功率谱482描绘了径向不对称傅立叶变换470A。此类径向不对称性可指示在一个维度(例如,x维度)上的聚焦不同于在不同维度(例如,y维度)上的聚焦。在此类情况下,分析或量化两个维度上的聚焦以获得附加聚焦信息可能是有用的。即,可在两个维度上拟合傅立叶变换470,以在傅立叶变换470没有径向对称性的情况下更全面地表征聚焦。

[0121] 前述讨论涉及基于所获取的图像的子区域基于子区域图像数据的傅立叶变换来计算聚焦质量度量的各方面,而以下示例涉及该方法的另外的方面,其中子区域为图像内

的线性子区域(例如,像素行)。虽然以下示例和实施方案落入前述讨论的范围内,但是由于对线数据执行一维(1D)傅立叶变换(例如,快速傅立叶变换(FFT))而不是对图像数据的区域执行二维(2D)傅立叶变换的益处,某些方面可被省略或修改。举例来说,在基于图像的面积子区域计算聚焦质量度量的语境下,并且如本文所述,所执行的步骤可包括:选择图像的子区域用于处理;对图像数据的子区域执行2D FFT;基于傅立叶变换确定径向平均值;基于径向平均值确定功率谱;将分段函数拟合到功率谱;以及确定分段函数的相关分段的斜率,其中该斜率与感兴趣的聚焦质量度量对应。相反,在以下讨论的示例中,对其执行傅立叶变换的图像的子区域是线性分段,例如像素行,使得傅立叶变换可以是1D傅立叶变换(例如,FFT)。此类1D傅立叶变换可以固件或硬件实施(诸如使用现场可编程门阵列(FPGA)、专用集成电路(ASIC)、可编程逻辑设备(PLD)、复杂可编程逻辑设备(CPLD)、可编程逻辑阵列(PLA)、可编程阵列逻辑(PAL)或其他类似处理设备或电路),以提高计算效率和系统性能。

[0122] 举例来说,并且转向图20,描绘了可在基于一个或多个像素行生成聚焦质量度量时采用的步骤的一般化处理流程。转向图20,所描绘的过程开始于图像的获取(步骤450),诸如流通池或其他结合或含有表面的样本的图像。举例来说,图像可部分地或整体地对应于图案化表面288的图像、此类表面的网格或扫描带290、此类扫描带290内的图像图块294或选自图像内的较大图块294的子图块。此外,图像可由成像区域的单次拍摄或获取组成,或者作为逐行执行的时间延迟积分,或者可经由组合过程来构造,诸如以将多阶段获取组合成单个图像以供处理,诸如经由跨多阶段获取进行平均来生成图像。

[0123] 如前所述,在核酸测序操作的语境下,图案化表面的每个区域可被成像多于一次(即,每个色彩通道成像一次,诸如蓝色通道和绿色通道),其中不同的样本位点在给定的成像循环中基于用于生成相应图像的光频率而“开启”或“关闭”。结果是,每个区域可具有多于一个的图像,其中每个图像对应于不同的色彩或强度通道并且具有不同的活性或非活性的样本位点。在实践中,每个色彩通道可具有单独的最佳聚焦。考虑到这一点,并且关于本技术,可针对仅针对一个色彩通道(例如,蓝色通道或绿色通道)导出的图像生成聚焦质量度量,诸如针对被确定为足以维持系统的聚焦的色彩通道。另选地,可针对色彩通道中的两个或更多个色彩通道分别生成聚焦质量度量(例如,蓝色通道聚焦度量和绿色通道聚焦度量)并且确定对于使用每个色彩通道的成像而言可接受的中间聚焦高度。以此方式,可确定可用于使用(在该示例中)蓝色通道和绿色通道两者来获取图像的单个聚焦高度。

[0124] 在所描绘的处理流程中,可选择(步骤600)或以其他方式识别图像的像素行(或此类行的一部分)以在后续处理步骤中使用,从而生成与该行或该行和其他行的组合相关的聚焦质量度量,该其他行与该行进行平均或以其他方式组合。举例来说,可选择或识别给定宽度(例如,128像素、256像素、512像素、1024像素、2048像素等)的一行像素或像素行以进行处理。在实践中,如此选择或识别的每个像素行包括单独像素,每个像素具有空间位置和相关联的灰度或色彩强度值(例如,红色、绿色或蓝色强度值,这取决于与图像相关联的色彩通道)。在所描绘的处理流程中,在步骤602处提供所选择的像素行作为一维(1D)傅立叶变换(例如,1D快速傅立叶变换(FFT))的输入,该傅立叶变换输出像素行的对应傅立叶变换。

[0125] 这些步骤在图21中以图形方式描绘,其中描绘了流通池的一部分的图像454(例如,荧光图像),从该图像选择图像454的像素行604(步骤600)用于处理。一个或多个基准点

468 (例如,靶心基准点)的存在可便于相应像素行604的选择。

[0126] 对像素行604内的数据(即,对应于像素行604的空间位置和强度数据)执行1D傅立叶变换操作(例如,1D FFT)(步骤602)。在该步骤处输出所得1D傅立叶变换470A。如本文所述,给定的图像454和像素行604可以是针对多通道成像语境下的给定灰度强度或给定色彩通道(例如,红色、绿色或蓝色)的,并且对应1D傅立叶变换470A因此可涉及给定色彩或整体灰度图像以及相应激发频率的活性/非活性样本孔的对应图案。

[0127] 返回到图20,并且如图22所示,可使用1D傅立叶变换470A来计算功率谱482,其中针对每个k值绘制了积分功率。在一个实施方案中,可通过对行604的1D傅立叶变换470A执行对数平方归一化来导出功率谱482(步骤608)。计算功率谱的k值平均值(步骤612)。如本文所讨论的,这允许通过将傅立叶变换470A的对数平方归一化的功率谱482拟合为k值或k值平方的函数来提取或以其他方式确定相关联的点扩散函数(PSF)的宽度。如本文所讨论的,均值(或中值)k值强度提供了量值随距离减小的速度的量度。

[0128] 如本文所讨论的,并且进一步参考图22,计算功率谱482的参数,其中的某些参数提供有用的信息,包括对应于如本文所讨论的聚焦质量的定量度量。举例来说,并且转向图22,使用功率谱482来导出k值斜率、转角频率和/或本底噪声中的一者或多者。举例来说,在一个实施方式中,并且如图22中所示,分段函数(例如,包括两个或更多个单独拟合分段)可拟合到功率谱482。然后可确定分段函数的与本底噪声、k值斜率(例如,本底噪声之上的区域中的功率谱的斜率)、转角频率等对应的各种度量。

[0129] 在某些实施方案中,经由生成(步骤616)积分功率与k空间图的最小二乘拟合来实现分段函数的拟合。各种实施方式可通过限制或指定拟合操作的参数(诸如通过设置执行线性拟合的固定k值范围)来提高基于硬件或固件的性能。举例来说,k值范围的下限(LL)可以是0、10、15、20、25、30等。相反,k值范围的上限(UL)可以是50、75、100、150、200等。以此方式,在基于硬件或固件的实施方式中,可限制计算空间,以便提高计算效率和性能。在一些实施方案中,可允许线性拟合范围在指定公差(例如, $LL \pm 10$ 或 ± 20 或 $UL - LL \pm 10$ 或 ± 20)内变化,以便以计算高效的方式获得有用的聚焦度量。如本文中别处所讨论的,可确定线性拟合的斜率(步骤620)并且可将其用作聚焦度量,该聚焦度量又可用于参数化或生成聚焦模型以供在扫描操作期间使用。在某些实施方式中,也可确定拟合线的拟合优度(即, R^2)并且将其用于确定给定的拟合线(以及对应聚焦质量度量)是被保留还是被排除在后续操作和计算之外。举例来说,可为被视为拟合良好并且被保留的拟合线指定高于某一阈值(例如,0.3、0.5、0.7、0.9等)的拟合优度量度。

[0130] 在某些实施方式中,在拟合分段函数之前或之后对功率谱数据进行平均可能是有益的,以便提高导出的聚焦质量度量的质量。举例来说,并且转向图23和图24,在这些附图的每一个附图中,示出了蓝色(示出为空心圆)和绿色(示出为实心圆)信号两者的积分功率与k值的散点图,其中像素行604的长度是变化的,并且对傅立叶变换信号进行平均,以便示出多行和跨图像进行平均的效果以及行长度的效果。转向图23,示出了三个散点图,它们从左到右根据被处理以用于聚焦质量度量生成的像素行604的长度而变化。最左边的散点图是256像素行的,中间的散点图是512像素行的,并且最右边的散点图是1,024像素行的。如可能预期的,沿着x轴的K值在所描绘的图表中也是变化的,在最左边的散点图中在从0到130的范围内,在中间的散点图中在从0到250的范围内,并且在最右边的散点图中在从0到

500的范围内。如前所述,为了分析和拟合的目的,可约束k值的上限和下限,以便于基于硬件或固件的实施方式,在这些实施方式中此类约束可提高计算效率。图23中的图表中的每一个图表针对在5个图像中对1行进行平均的实施方式描绘了积分功率与k值的关系。可以看出,随着行长度的增加,更容易看出数据点和趋势。

[0131] 转向图24,描绘了对应图表,然而对5个图像中的每一个图像内的20行执行平均。正如可观察到的,对每个图像内的多行进行平均减少了数据的扩散,从而提高了信号质量。也正如在前述附图中所观察到的,增加的像素行长度也提高了信号质量,尽管从计算的角度来看,超过特定行长度后,这些益处可能不太有价值。举例来说,对于实际实施方式,超过512像素可能几乎没有益处,但对于较长的行长度而言,数据仍然有所改善。

[0132] 应当理解,在真实世界的实施方式中,聚焦质量度量的值(对应于如本文所讨论的分段函数中的拟合线的斜率)被用于生成聚焦模型,然后该聚焦模型在扫描或测序操作中用于在流通池前进通过扫描时调整焦距或高度。出于实际目的,这可对应于提供z维度上的高度(深度或聚焦深度),该高度随着在扫描中到达不同的行而改变或更改,或者逐行地改变,或者在递增的或周期性的行检查点或里程标处改变(例如,每10行、20行、50行、100行、200行、500行等)。图25以图形方式示出了当以不同聚焦高度对在聚焦度量确定中使用的每个像素行成像时(即,使用在不同聚焦高度处获取的图像堆栈),蓝色和绿色荧光扫描的某些实施方式可如何实现这一点。

[0133] 在所描绘的示例中,通过乘以适于将斜率从傅立叶空间转换为像素的因子,将如本文所讨论的分段函数的拟合线的斜率形式的聚焦质量度量转换为IQS分数。该IQS值沿着示出的图表的y轴相对于沿着图表的x轴绘制的z维度上的高度(即,聚焦深度或深度)绘制。在这些示例中,可观察到,IQS分数作为z维度上的高度的函数的图表(如经由处理在不同聚焦深度处获取的图像所确定的)通常形成抛物线图。在这些散点图中,观察到的最小或最低点与相应频率的最佳聚焦深度对应。

[0134] 转向图25,基于20行增量的平均值计算IQS分数,并且以25k值的下限和200k值的上限执行分段函数的线拟合。正如可观察到的,针对每个色彩通道观察到清楚的最小值,并且每个最小值与沿x轴的聚焦深度对应,该聚焦深度可最佳地用于相应色彩通道,针对该相应色彩通道生成散点图的相应行。在实践中,可针对每个色彩通道确定最佳聚焦深度(针对相应的行集合),或者另选地,可针对所有色彩通道或色彩通道的不同子集基于它们各自的最小值确定可接受的一个或多个聚焦深度。即,如果两个或更多个色彩通道的相应最佳聚焦深度在给定公差内,则可采用单个中间聚焦深度来对所讨论的行的这些色彩通道进行成像。

[0135] 如上文所述并且如本文所讨论的,在实践中,以固件或硬件实施本文所述的技术可能是有用的。在此类实施方式中,并且如本文所讨论的,应用约束和/或指定或以其他方式设置某些参数以便优化此类硬件或固件实施方式可能是有用的。举例来说,可在此类实施方式中指定或约束的此类参数包括但不限于:像素行宽度(例如,128像素、256像素、512像素、1,024像素等)、分段函数的线拟合的k值的下限(LL)(例如,0、25、50)、分段函数的线拟合的k值的上限(UL)(例如,75、100、150、200、250、500)、分段函数的线拟合的 R^2 (即,拟合优度)(例如,0.75、0.8、0.9);聚焦质量度量的抛物线拟合的拟合优度截止值(或转换的等价物),其与以下各项有关:聚焦高度、给定图像中待分析以获得抛物线拟合的行(或行段)

的数量(例如,每一行、交替行等)、待分析的行之间的间距和/或每个聚焦深度的要进行平均的行的数量。

[0136] 虽然本文已说明和描述了本发明的仅仅某些特征,但是本领域的技术人员将想到许多修改和改变。因此,应当理解,所附权利要求书旨在涵盖落入本发明的真正精神内的所有此类修改和改变。

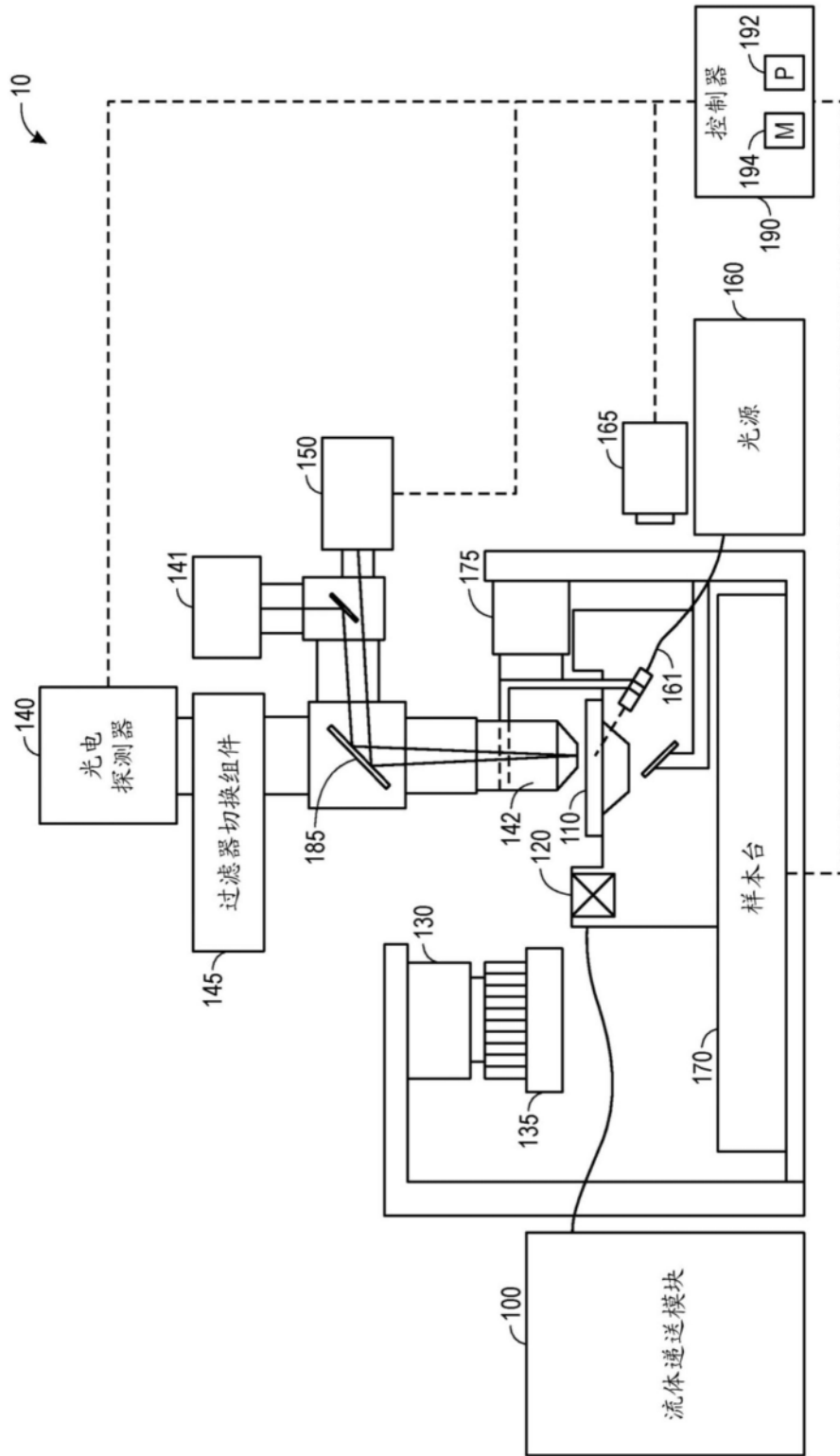


图1

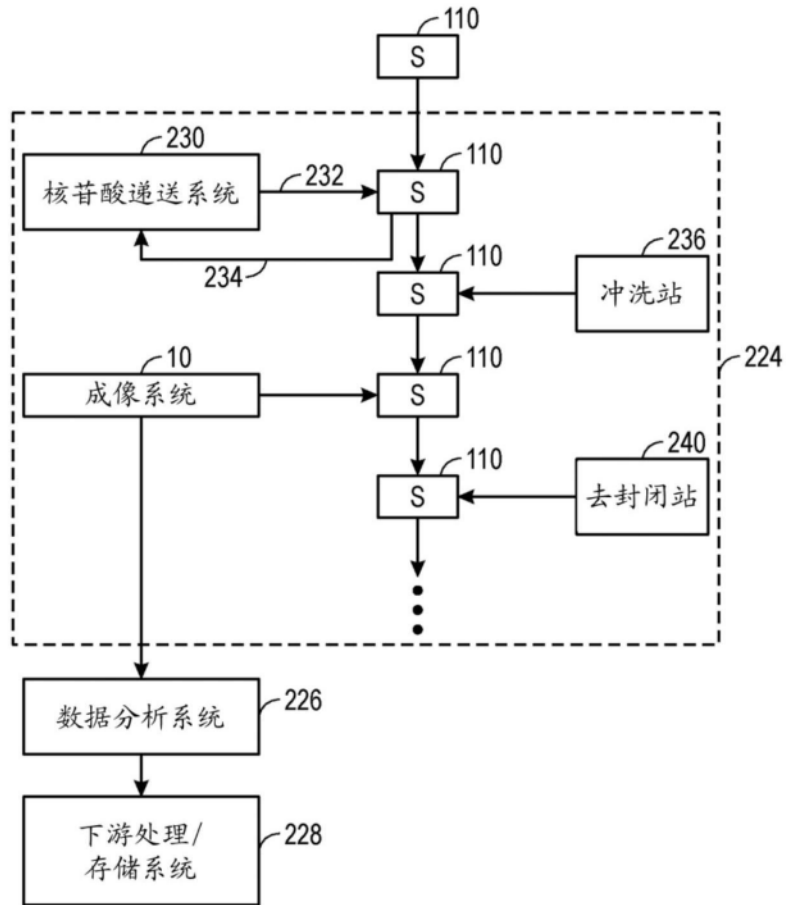


图2

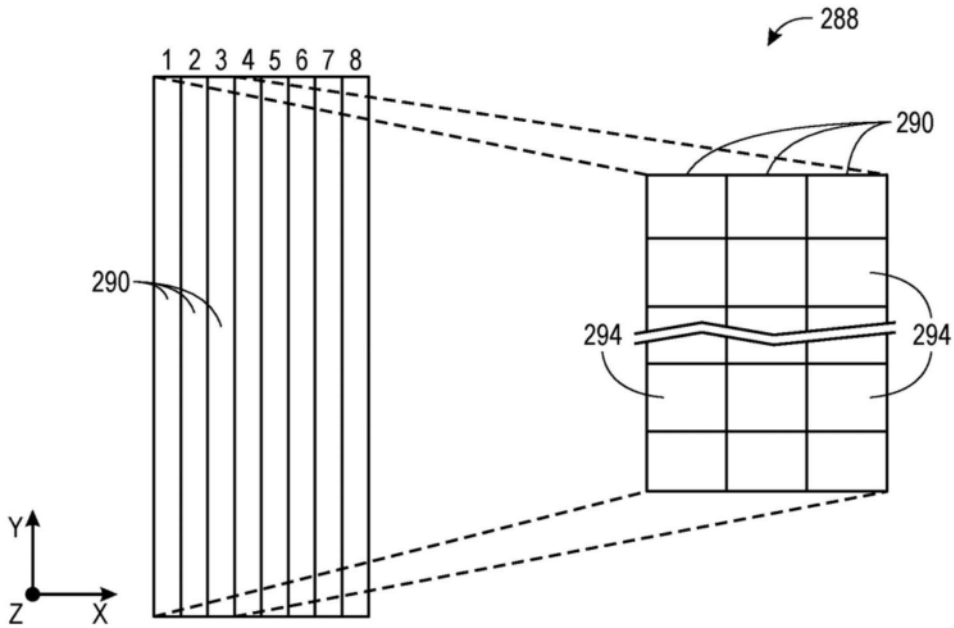


图3

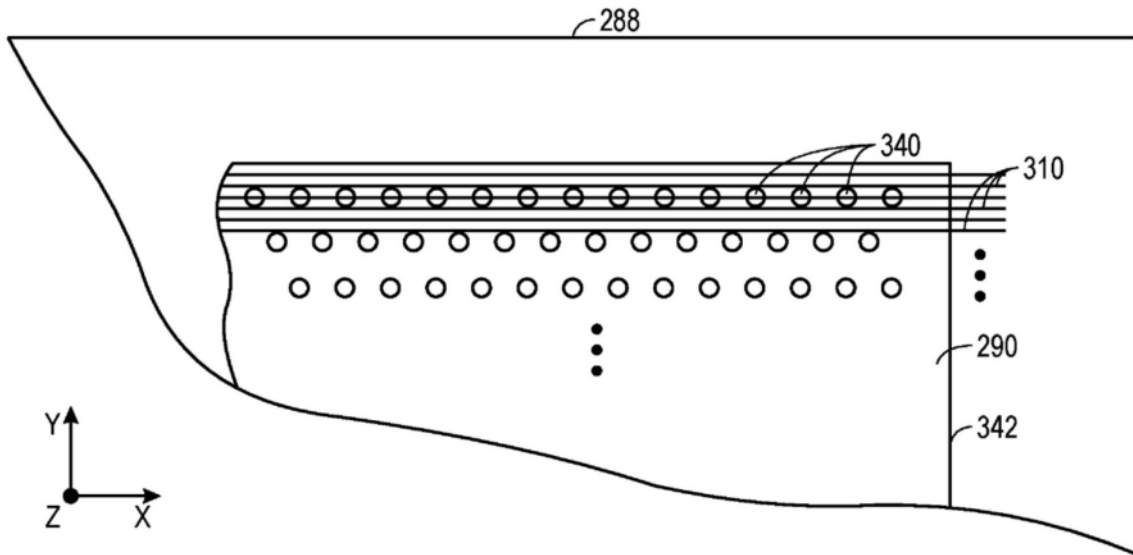


图4

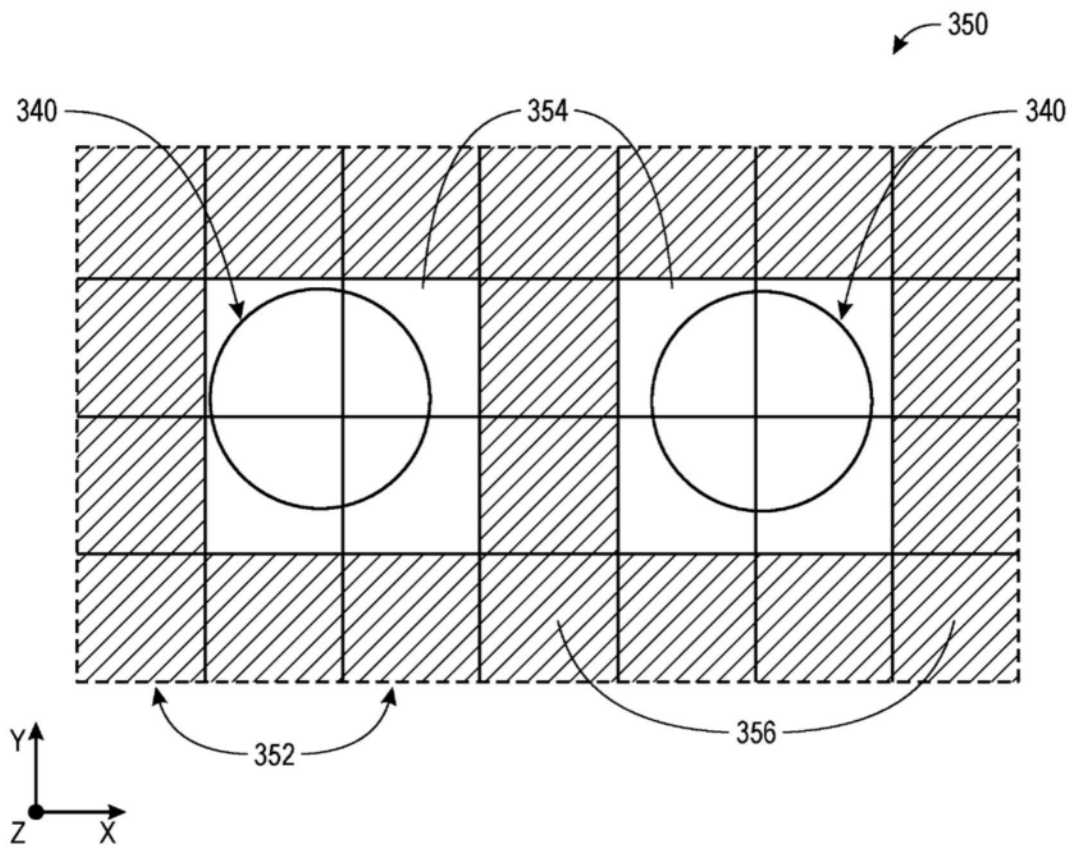


图5

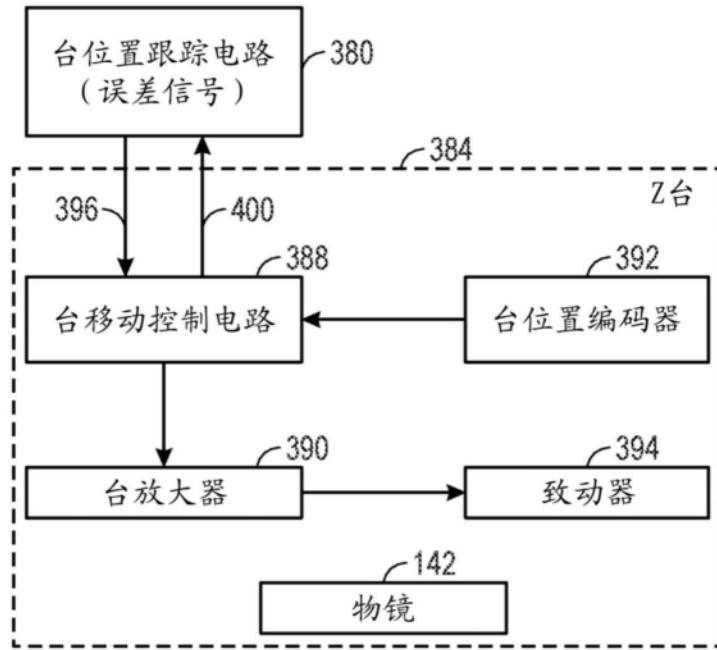


图6

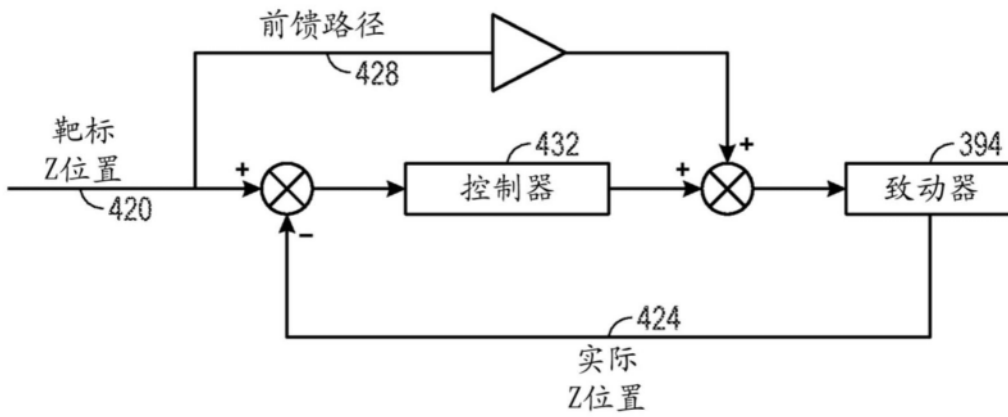


图7

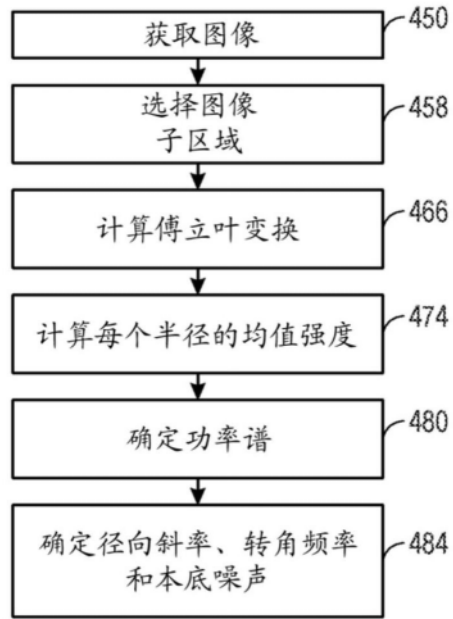


图8

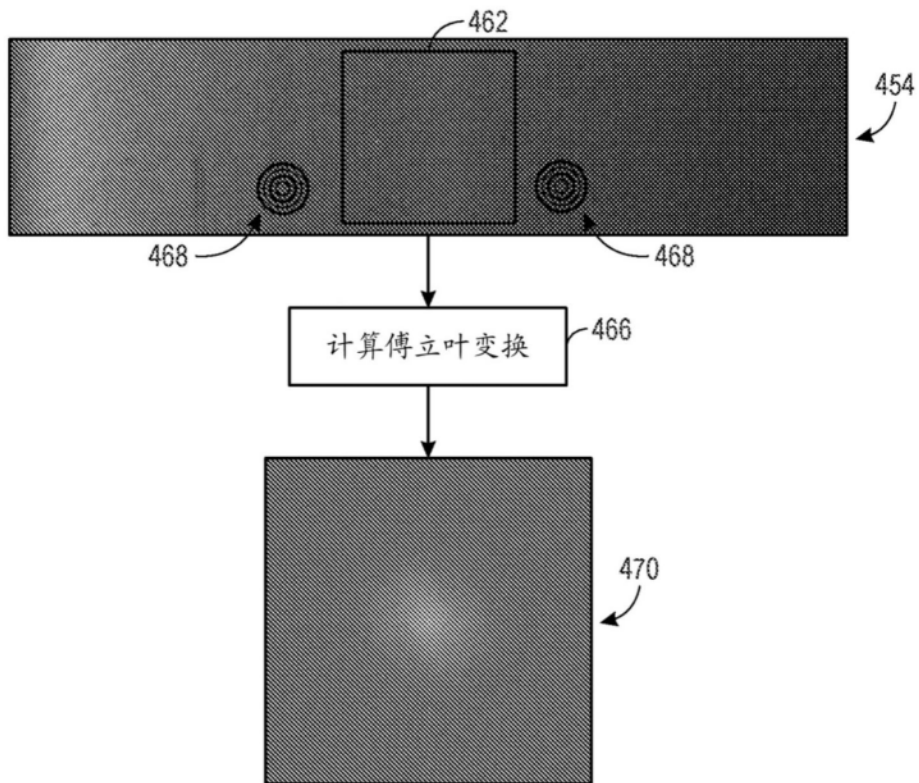


图9

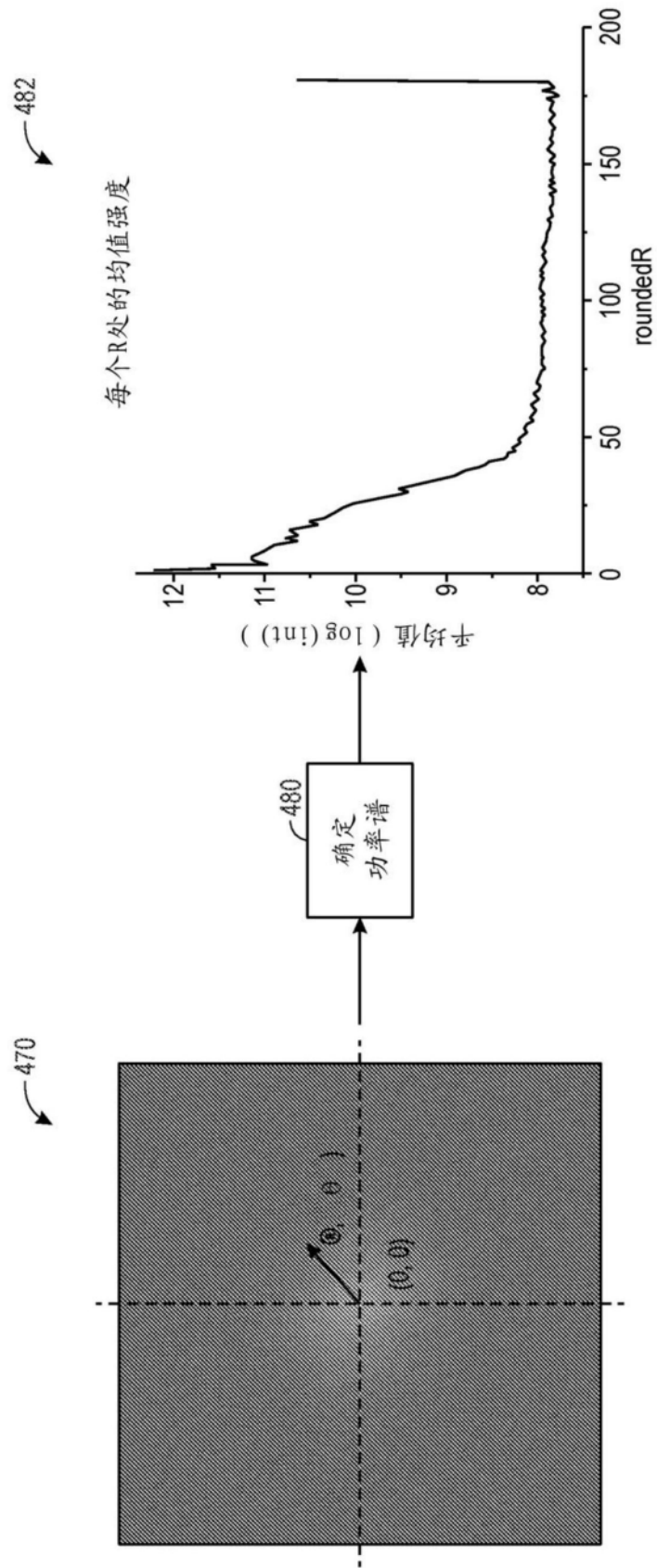


图10

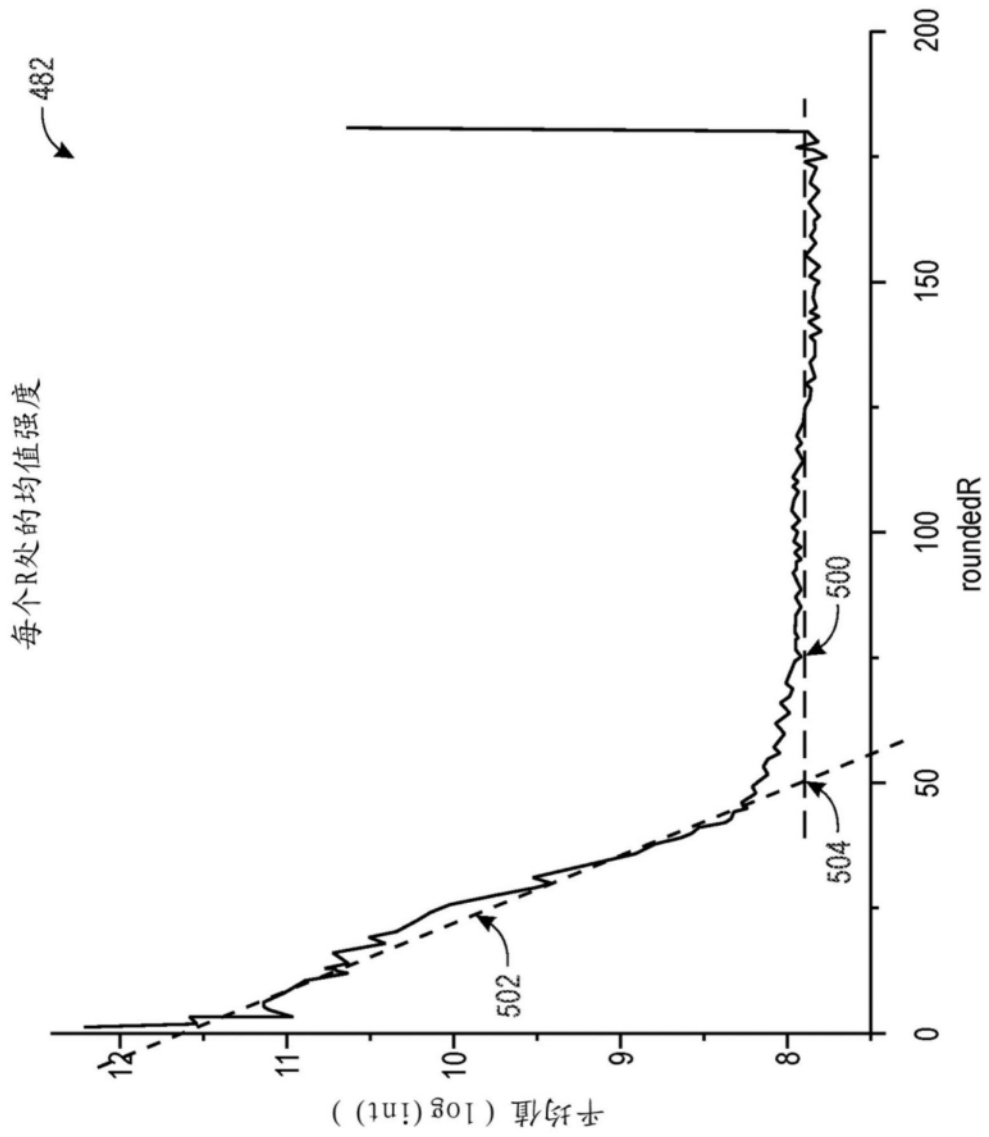


图11

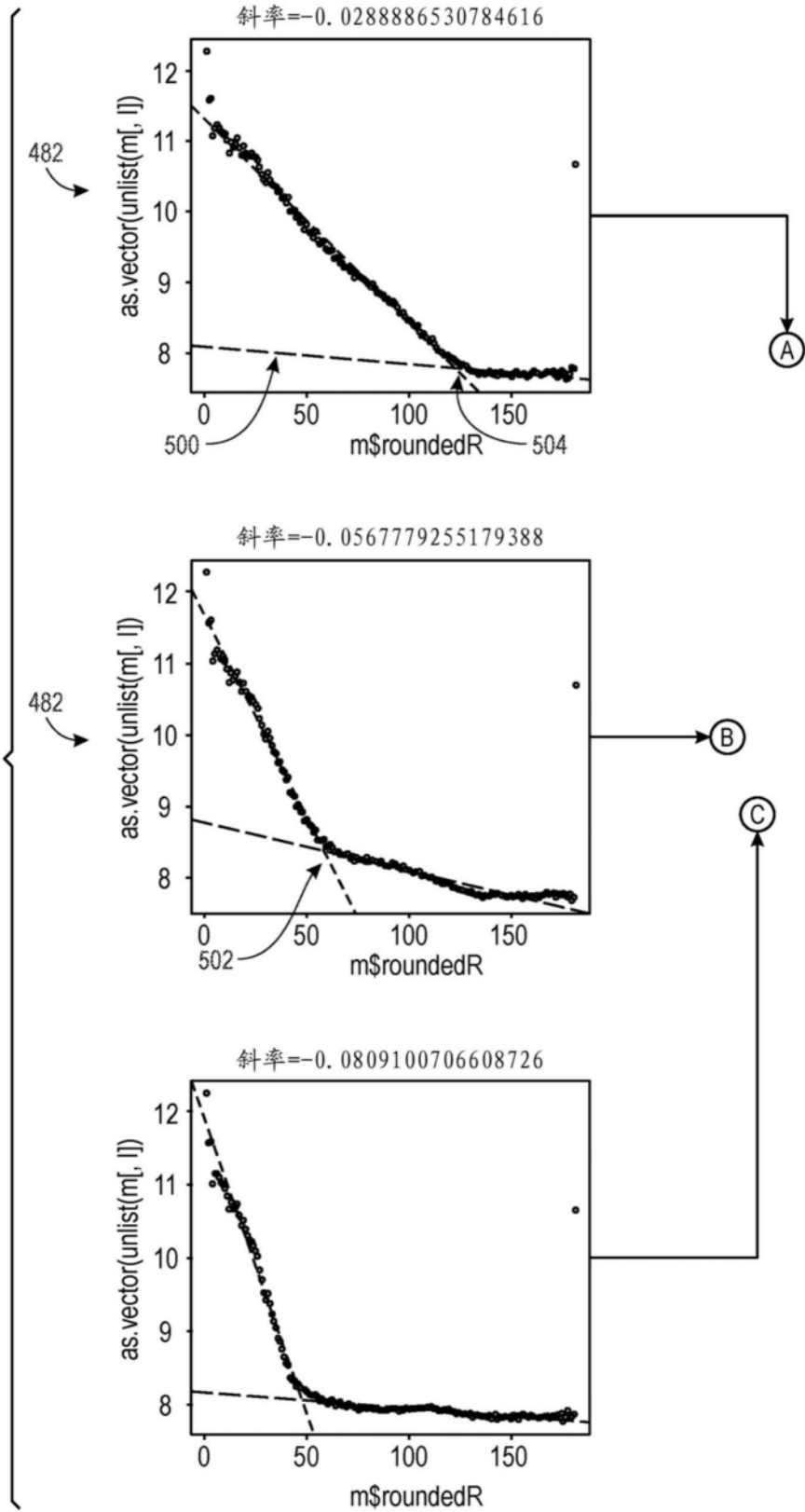


图12A

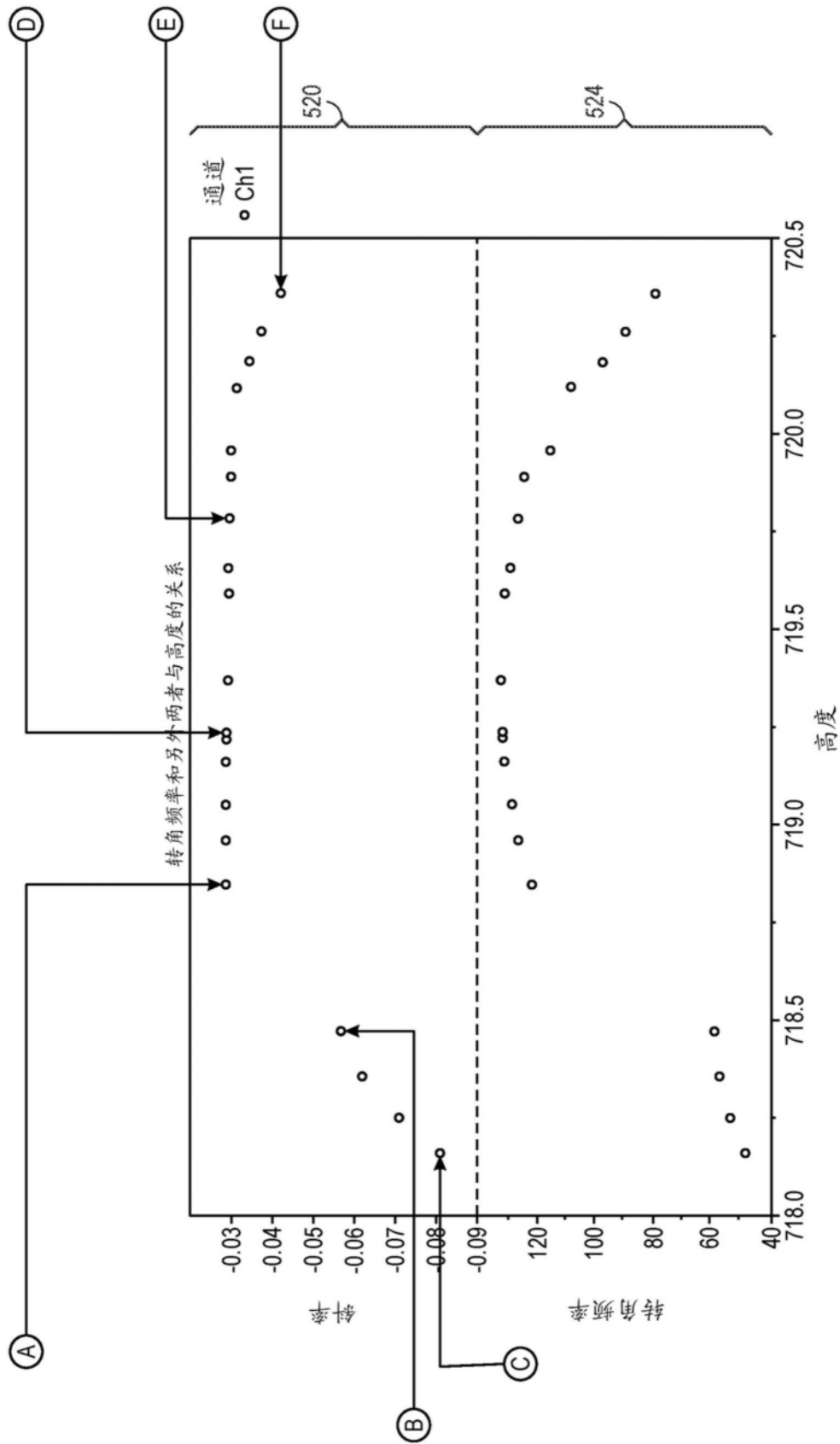


图12B

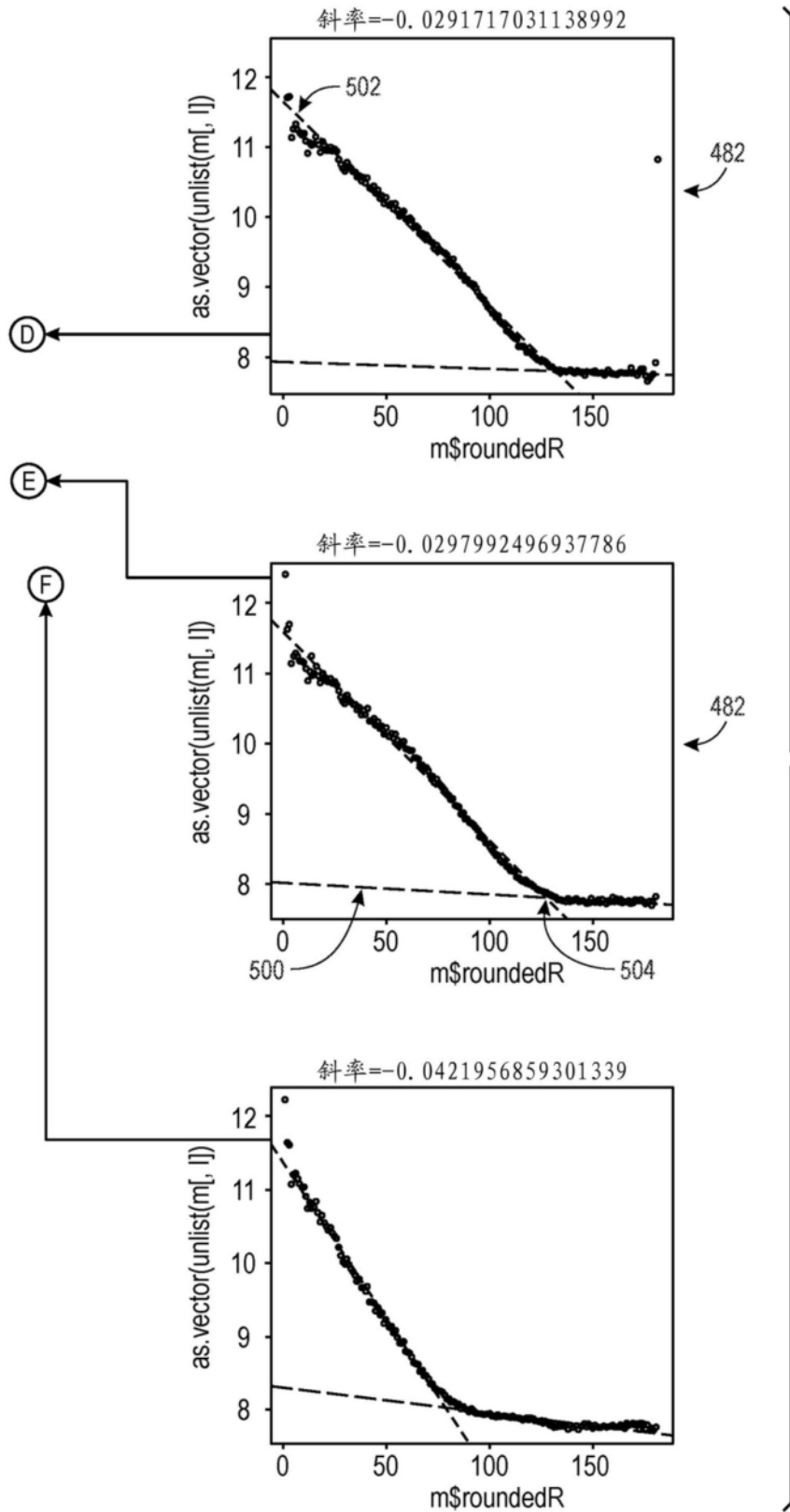


图12C

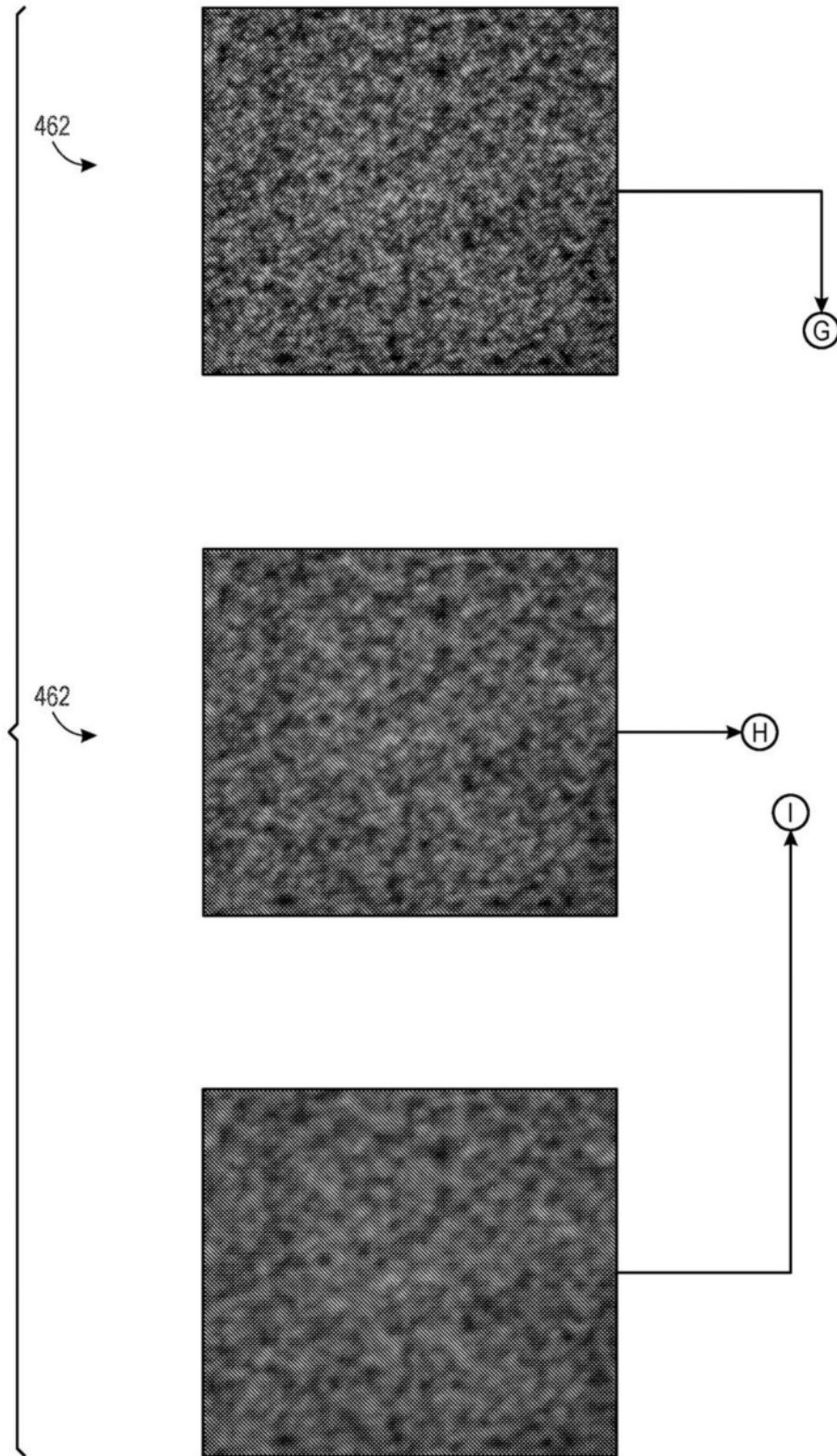


图13A

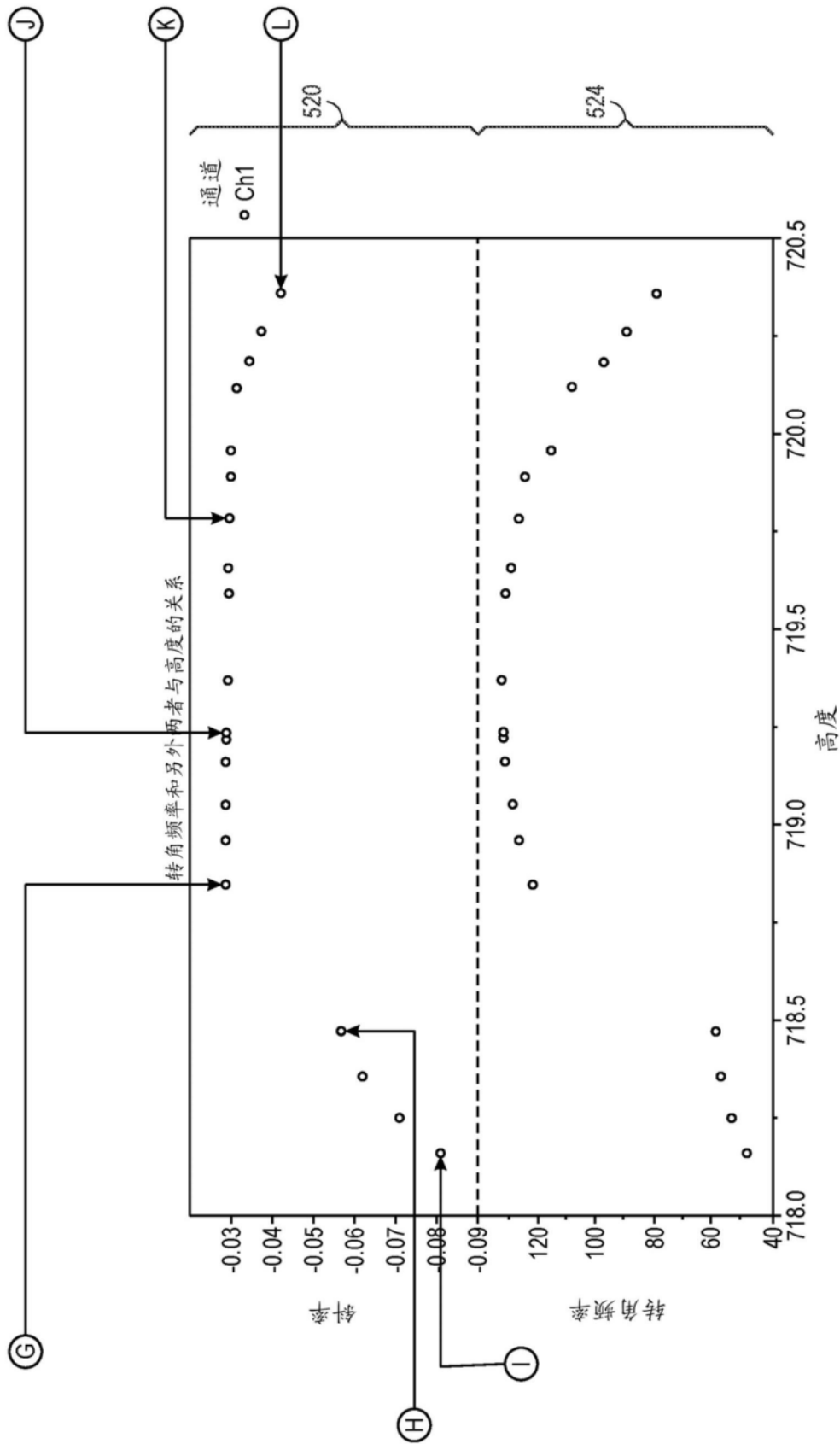


图13B

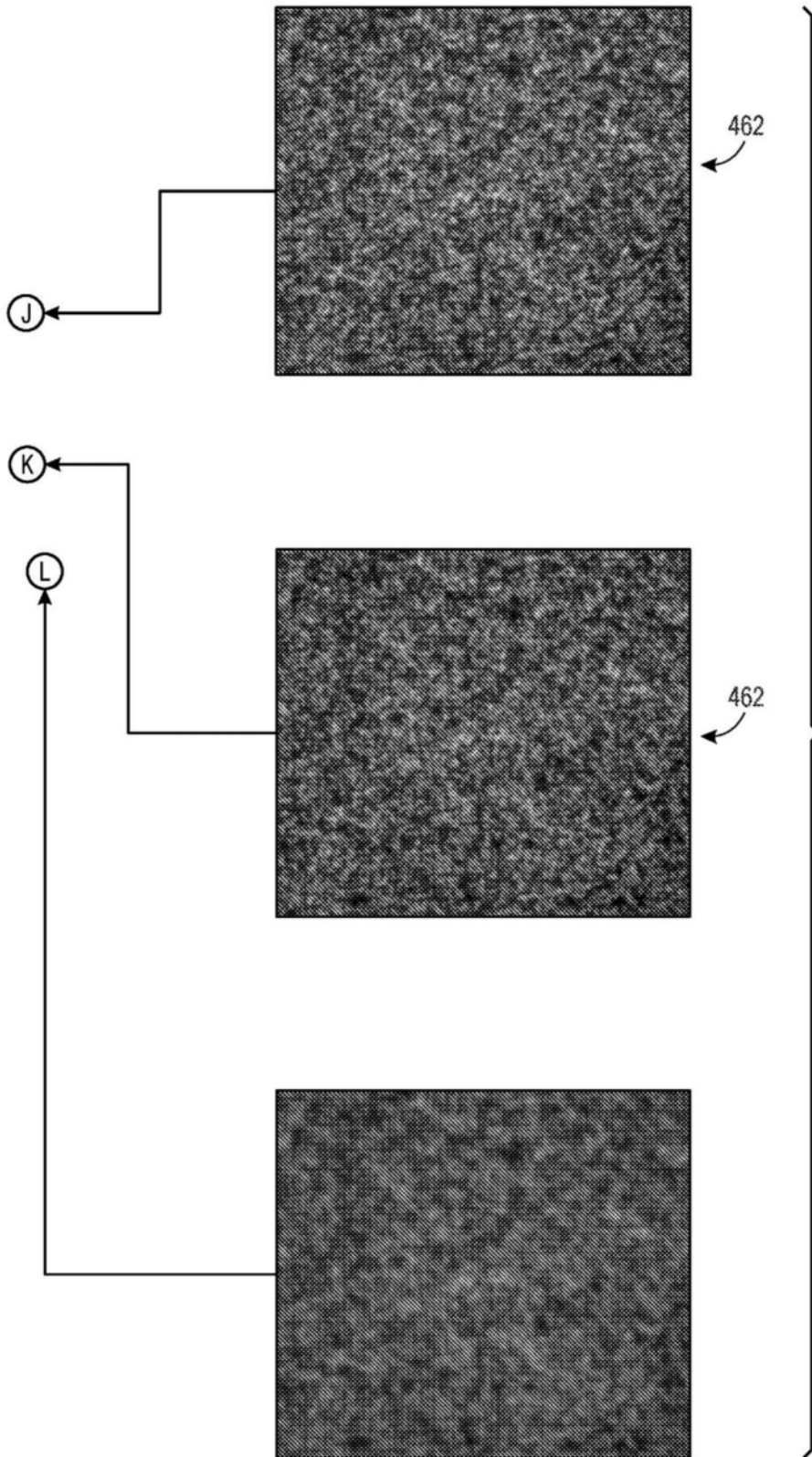


图13C

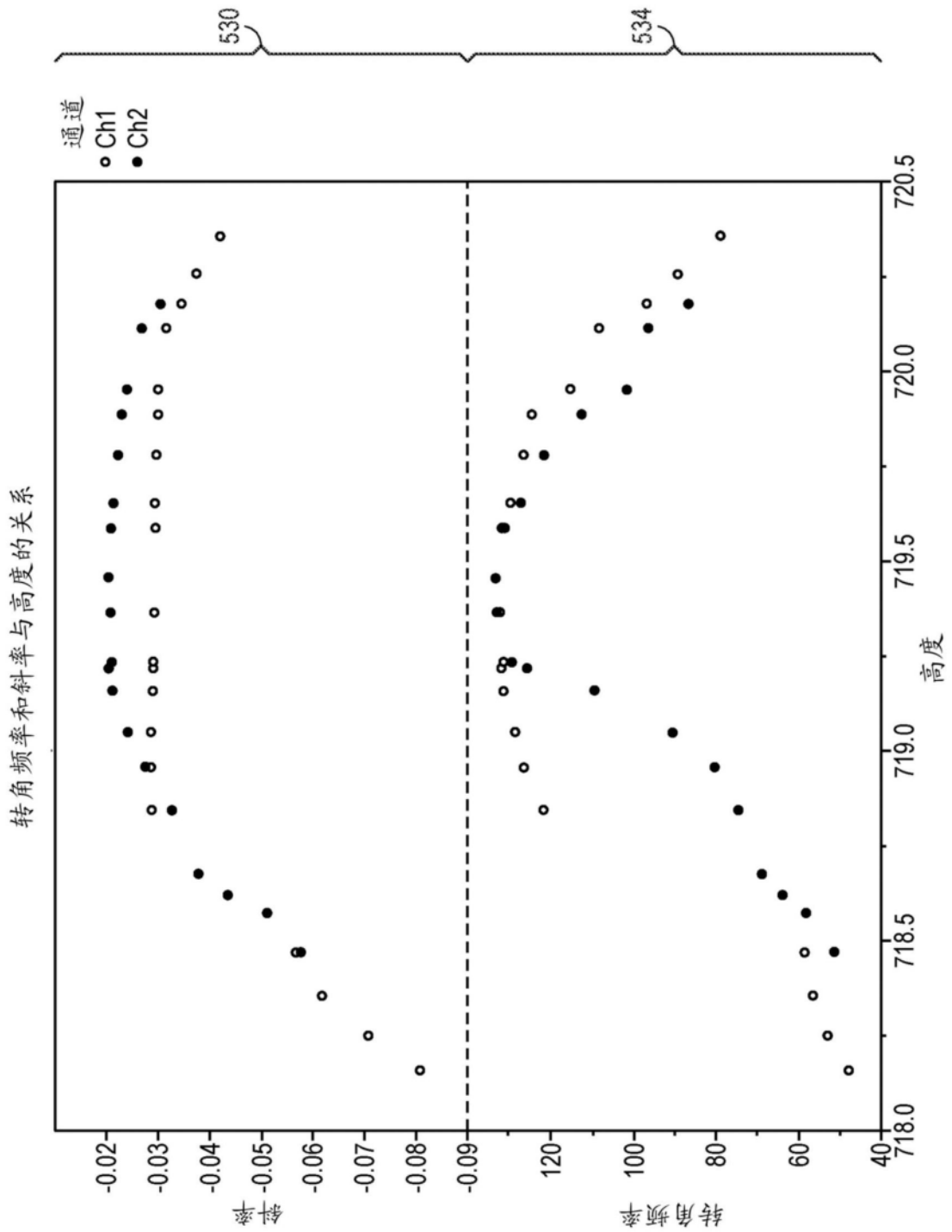


图14

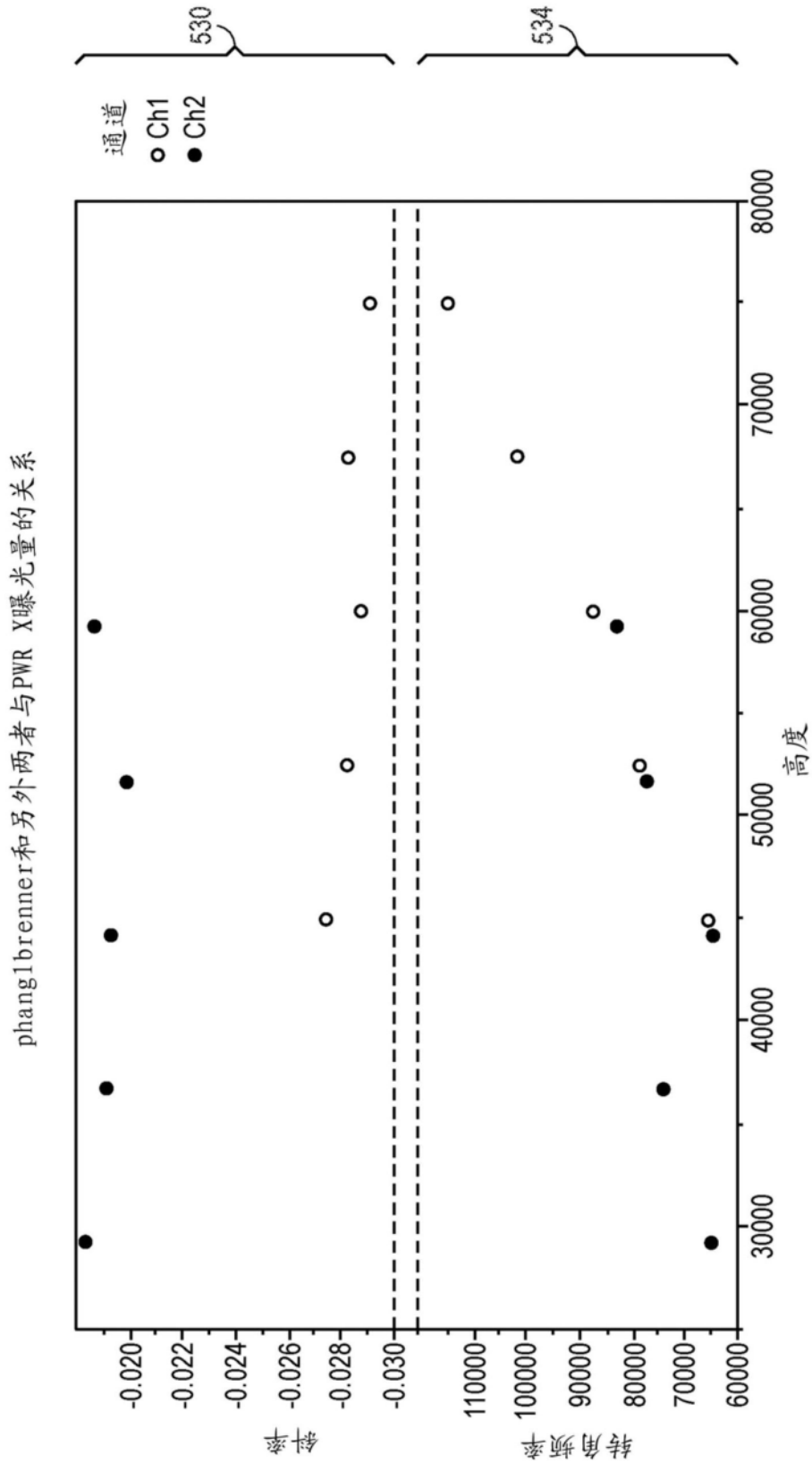


图15

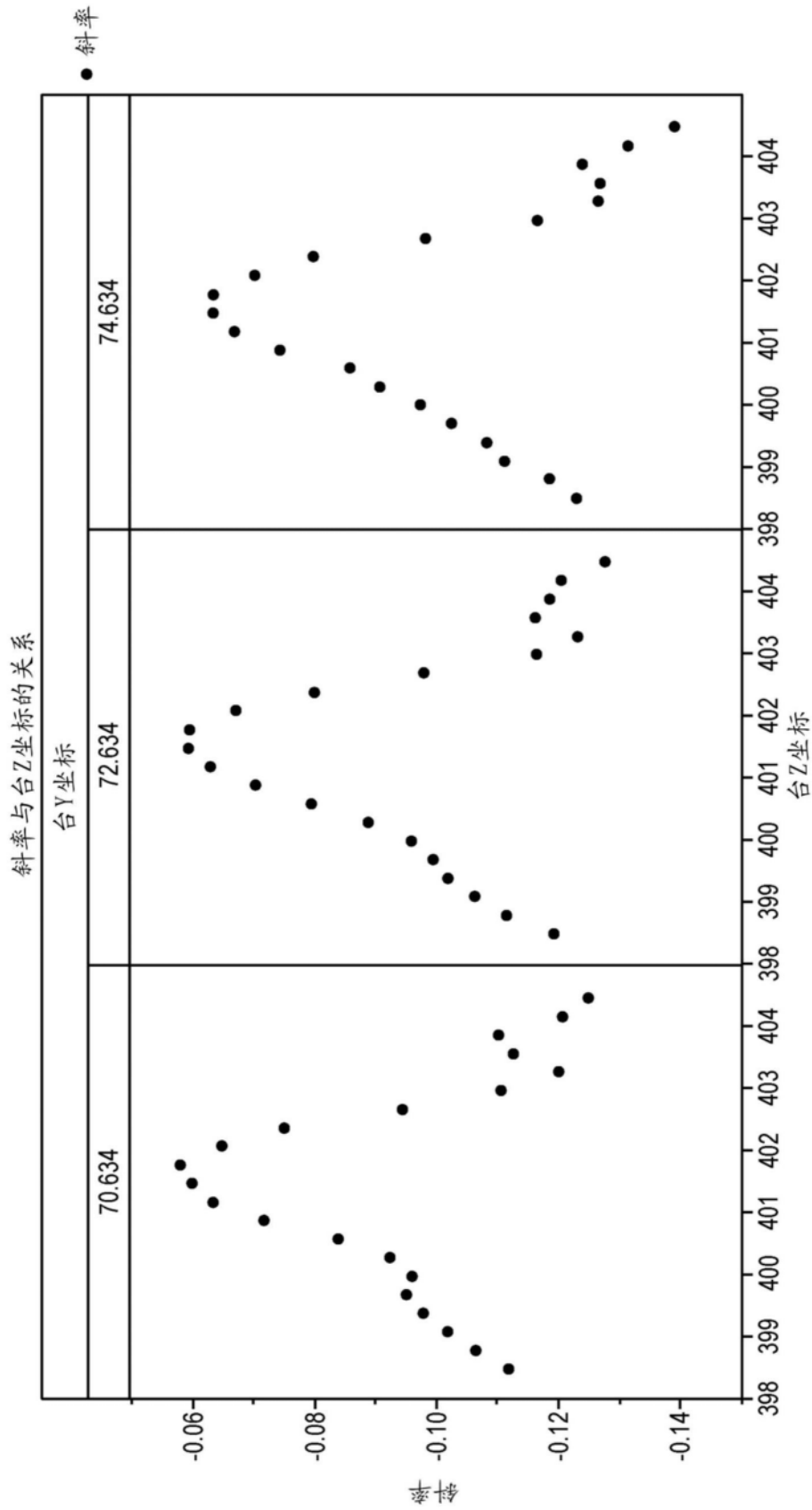


图16

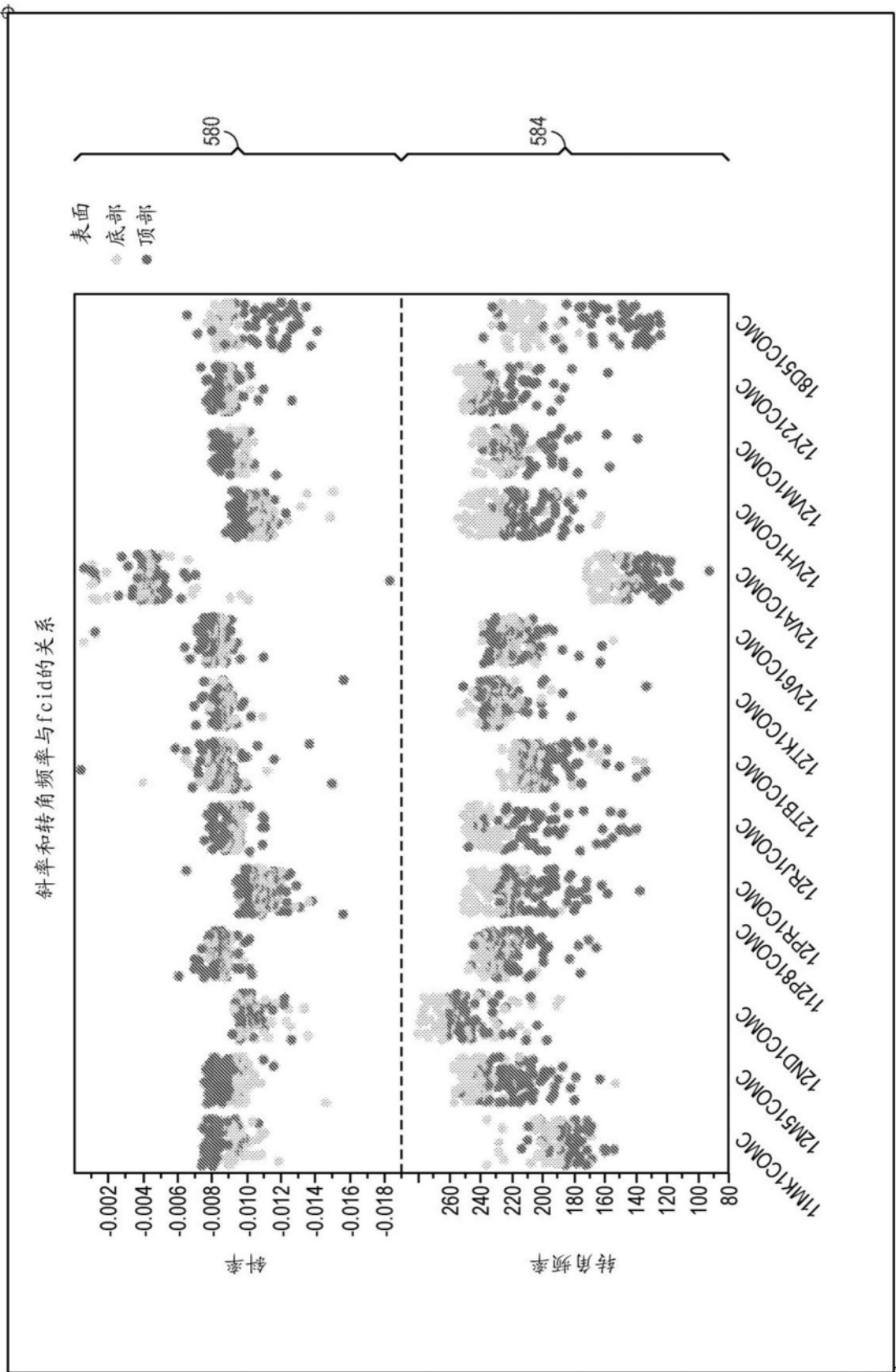


图17

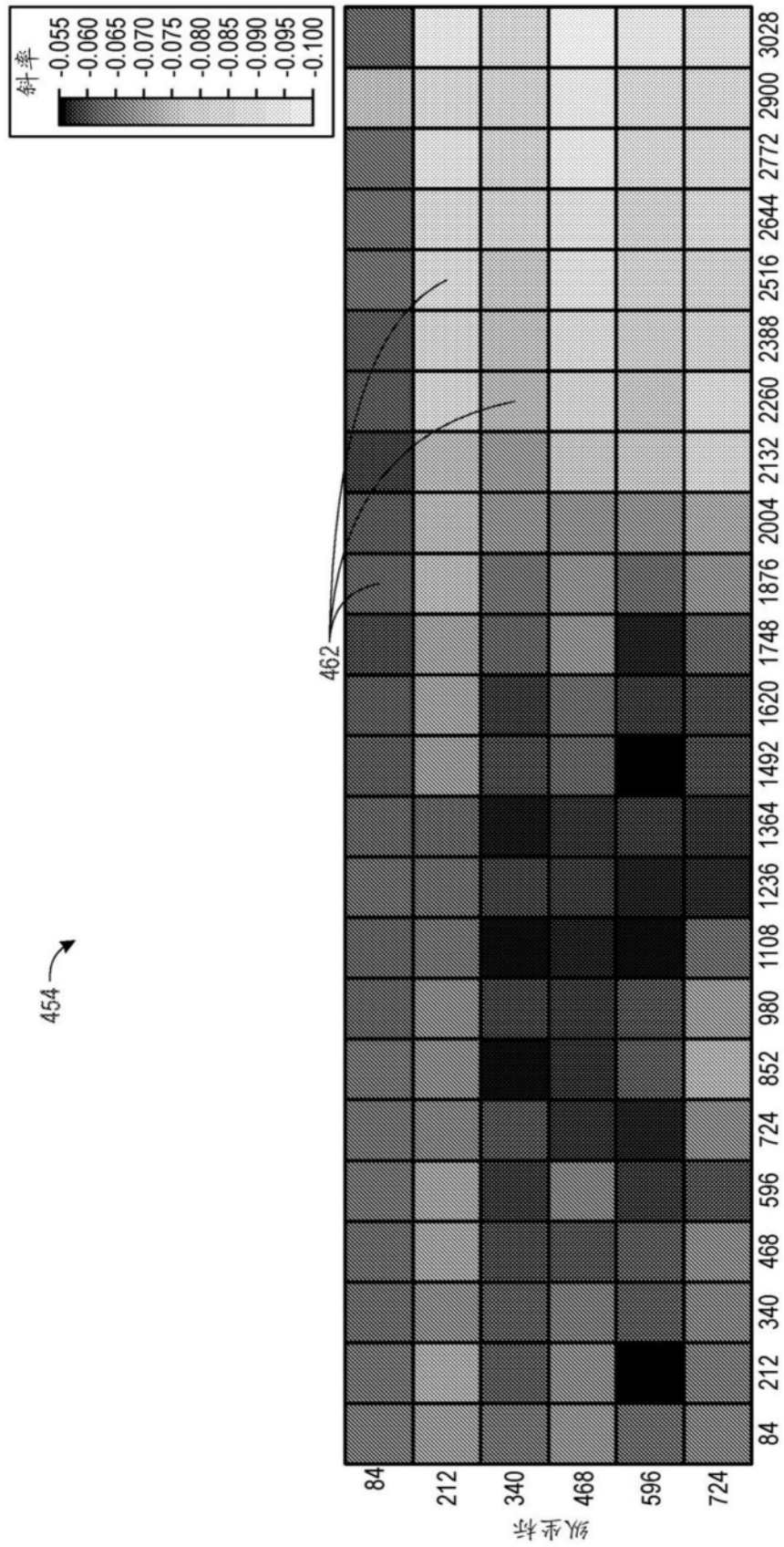


图18

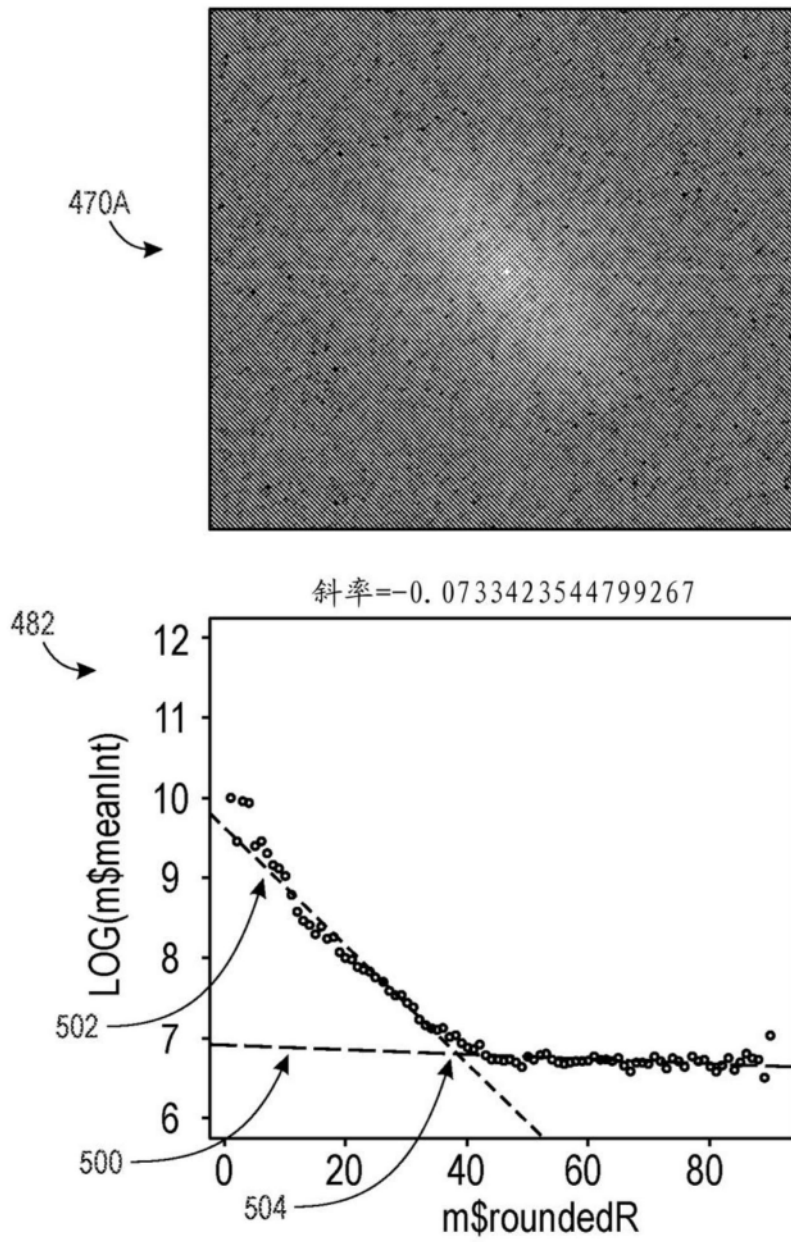


图19

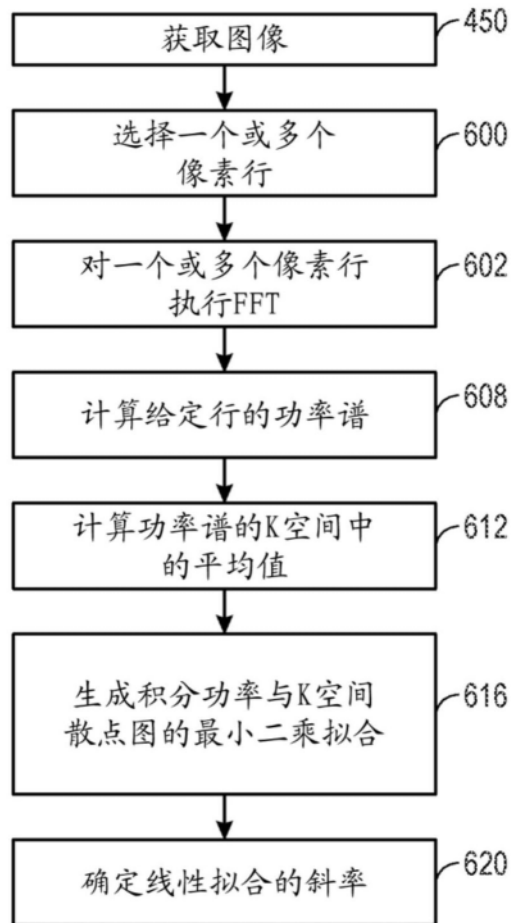


图20

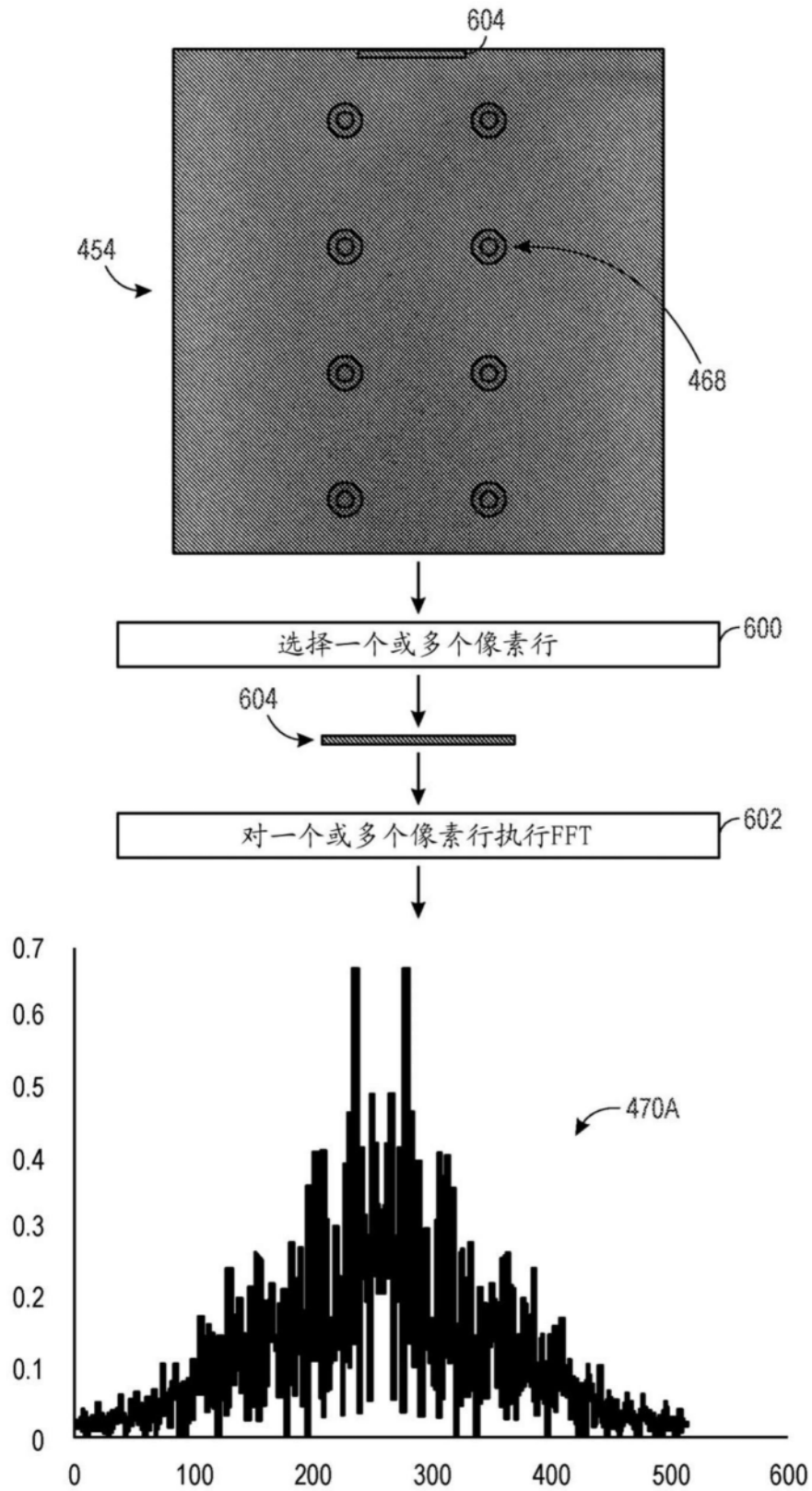


图21

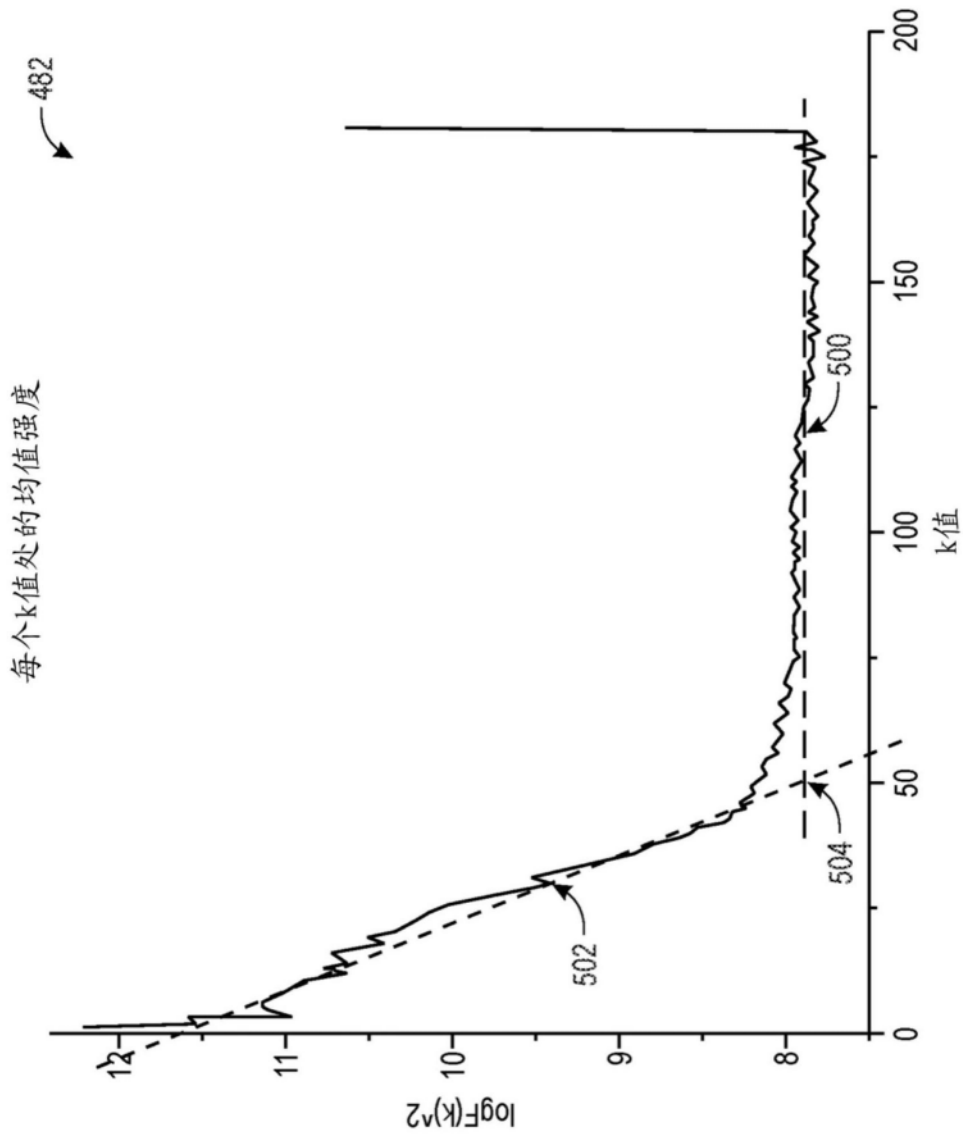


图22

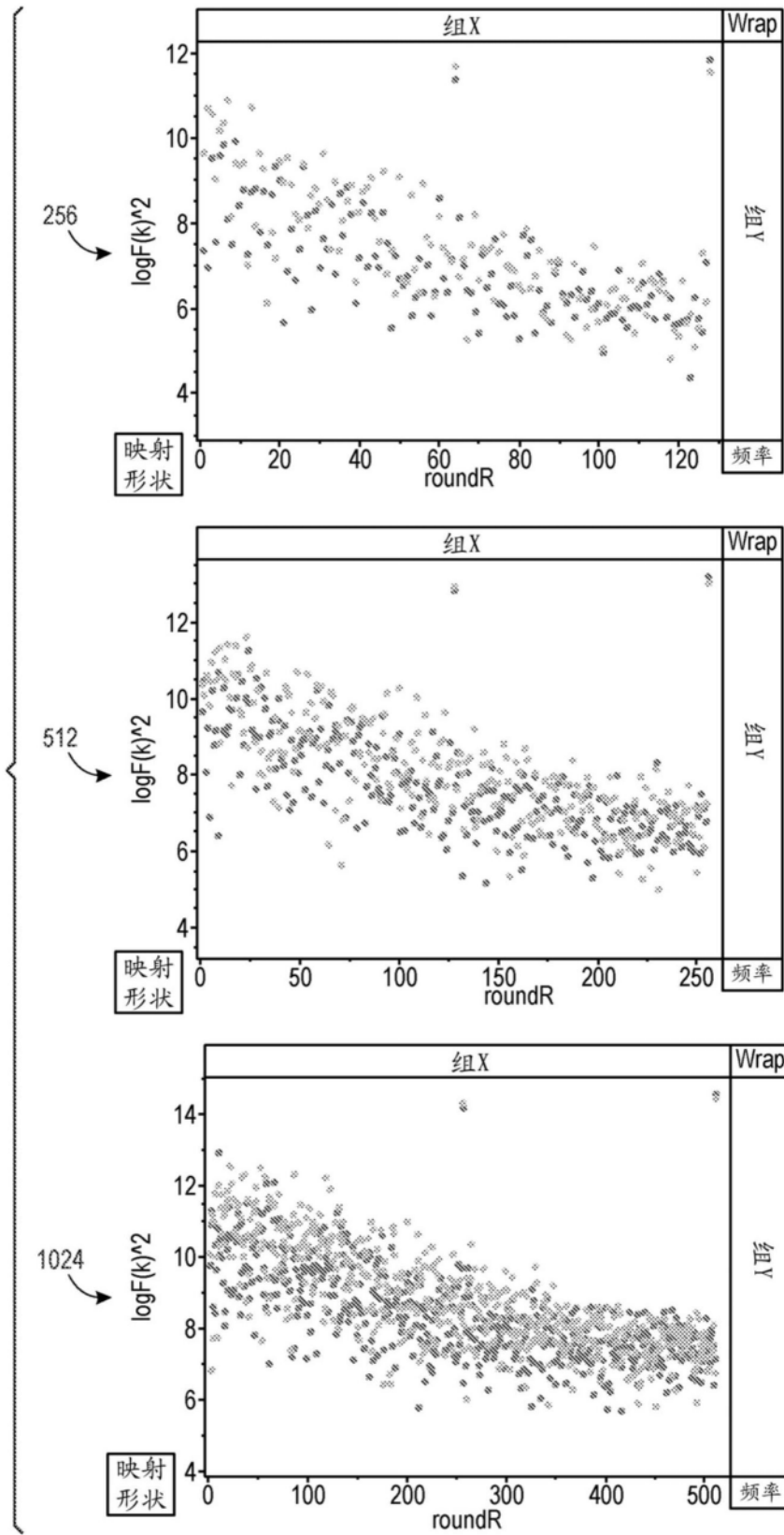


图23

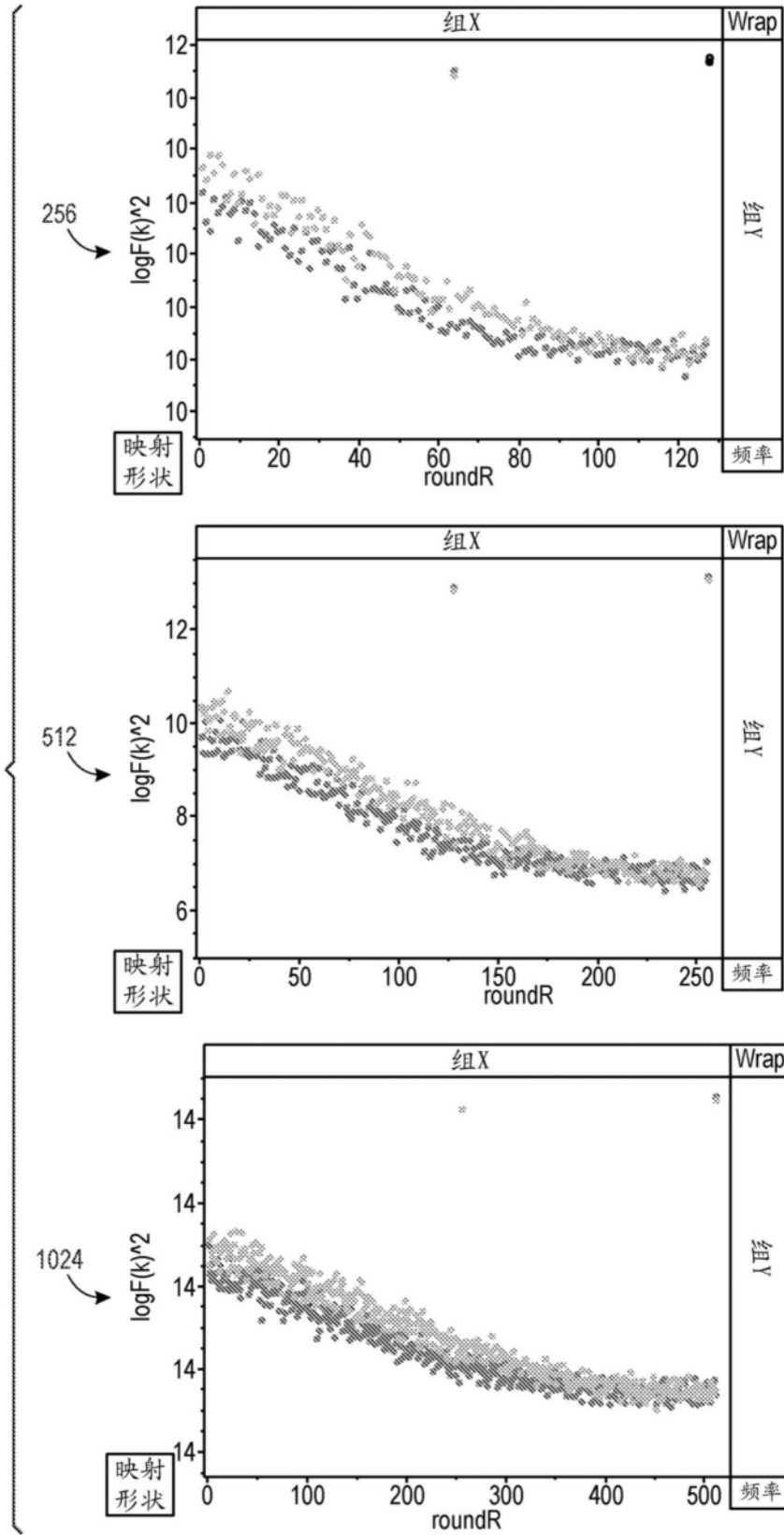


图24

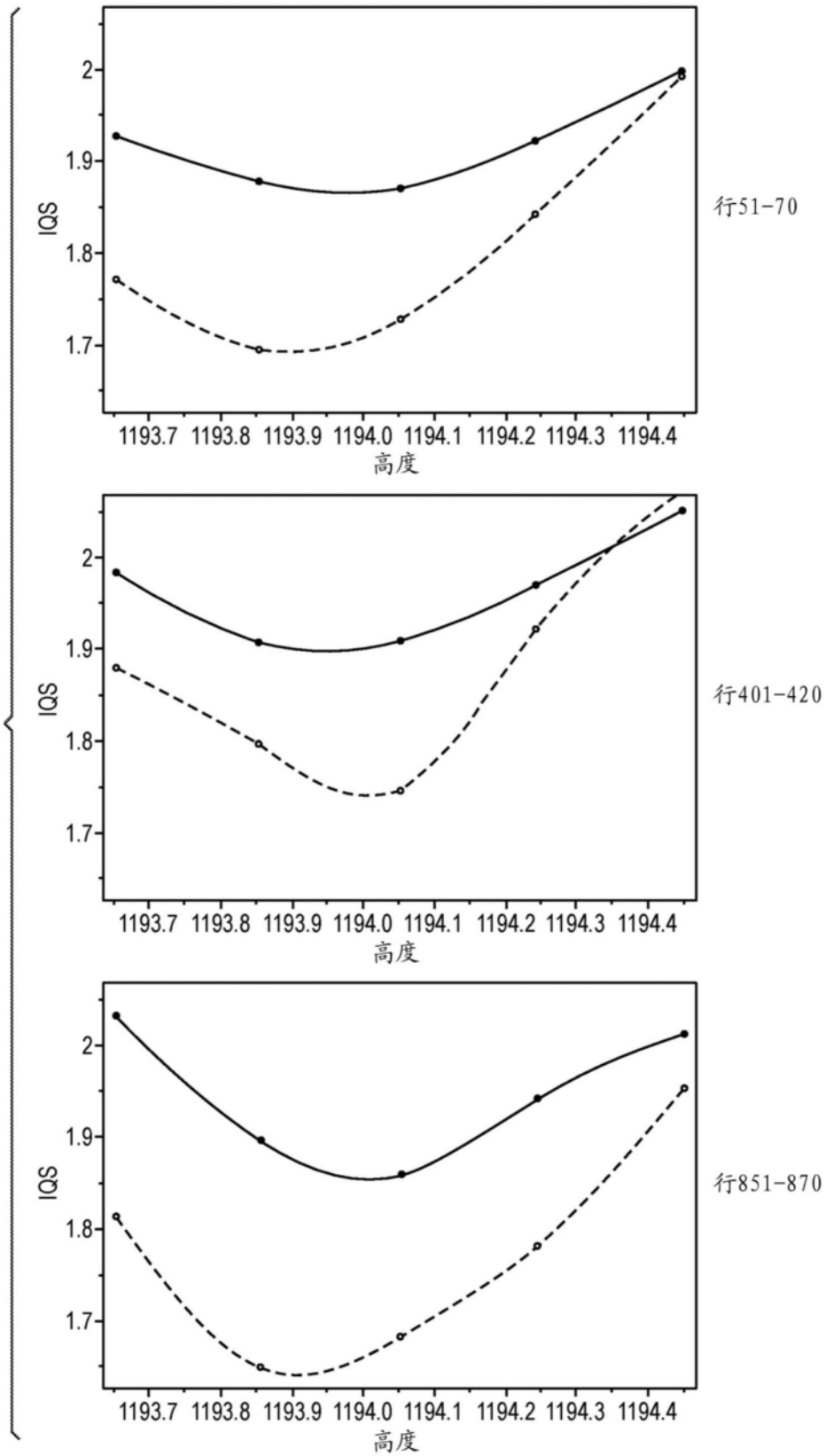


图25