



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102998240 B

(45)授权公告日 2017. 10. 31

(21)申请号 201210326660.X

(22)申请日 2012.09.05

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102998240 A

(43)申请公布日 2013.03.27

(30)优先权数据
2011-199892 2011.09.13 JP

(73)专利权人 索尼公司
地址 日本东京

(72)发明人 新田尚

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限
责任公司 11240
代理人 余刚 吴孟秋

(51)Int.Cl.

G01N 15/14(2006.01)

(56)对比文件

US 2006/0015291 A1, 2006.01.19,
CN 1680800 A, 2005.10.12,
JP 特许第3318397号 B2, 2002.08.26,
Gerald Gregori 等. Hyperspectral
Cytometry at the Single-Cell Level Using
a 32-Channel Photodetector. 《Cytometry
Part A》. 2011, 第81A卷

审查员 方东

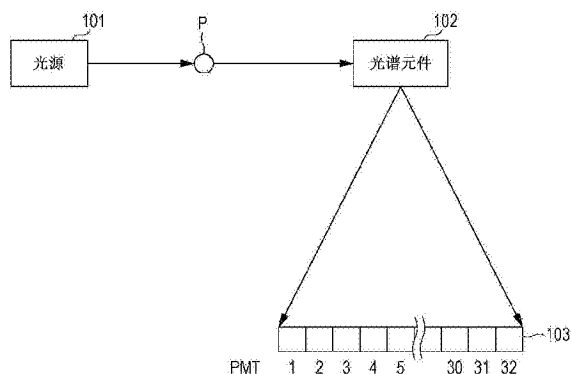
权利要求书3页 说明书11页 附图16页

(54)发明名称

微粒测量装置

(57)摘要

本发明提供了一种微粒测量装置。该微粒测量装置包括：检测单元，被配置为检测从微粒发出的光，以及处理单元，具有存储指令的存储器件，所述指令在由所述处理单元执行时，使所述处理单元计算所检测的光的校正强度值并基于校正强度值生成光谱数据。



1. 一种微粒测量装置,包括:

检测单元,被配置为检测从微粒发出的光;

处理单元,具有存储指令的存储器件,所述指令在由所述处理单元执行时,使所述处理单元:

(a) 计算所检测的光的校正强度值;并

(b) 基于所述校正强度值生成光谱数据,

其中,所述检测单元被配置为生成所检测的光的强度值;

所述检测单元包括多个受光元件;

所述处理单元基于所述多个受光元件中的各个受光元件的检测波长带宽计算所述校正强度值;

其中,所述处理单元通过将各个受光元件所检测的光的强度值除以相应受光元件的检测波长带宽来计算所述校正强度值。

2. 根据权利要求1所述的微粒测量装置,其中,所述校正强度值是第一校正强度值,并且所述处理单元基于所述多个受光元件中的各个相应受光元件的所述第一校正强度值和相对灵敏度数据计算第二校正强度值。

3. 根据权利要求1所述的微粒测量装置,其中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时使所述处理器将所述光谱数据与基准光谱数据比较的指令。

4. 根据权利要求3所述的微粒测量装置,还包括:

显示器;并且

其中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时使所述处理器显示所述光谱数据与所述基准光谱数据的比较结果的指令。

5. 根据权利要求2所述的微粒测量装置,还包括:

其中,所述处理单元形成一个坐标轴表示所述第一校正强度值或所述第二校正强度值、而另一个坐标轴表示检测波长的光谱图以将所述光谱图输出至显示单元。

6. 一种微粒测量装置,包括:

检测单元,被配置为检测从微粒发出的光;

处理单元,具有存储指令的存储器件,所述指令在由所述处理单元执行时,使所述处理单元:

(a) 计算所检测的光的校正强度值;并

(b) 基于所述校正强度值生成光谱数据,

其中,所述检测单元被配置为生成所检测的光的强度值;

所述检测单元包括多个受光元件;

所述处理单元基于所述多个受光元件中的各个受光元件的检测频率范围计算所述校正强度值。

7. 一种从检测单元接收数据的设备,所述检测单元具有被配置为检测从微粒发出的光并将所检测的光转换成相应强度值的多个受光元件,所述设备包括:

处理器;

存储器件,存储有当由所述处理器执行时使所述处理器进行下列操作的指令:

(a) 接收所检测的光的强度值;

(b) 校正所述强度值;以及

(c) 基于所述校正的强度值生成光谱数据,

其中,所述检测单元被配置为生成所检测的光的强度值;

所述处理器基于所述多个受光元件中的各个受光元件的检测波长带宽计算所述强度值;

其中,所述处理器通过将各个受光元件所检测的光的强度值除以相应受光元件的检测波长带宽来计算所述校正的强度值。

8. 根据权利要求7所述的设备,其中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时使所述处理器将所述光谱数据与基准光谱数据进行比较的指令。

9. 根据权利要求8所述的设备,还包括:

显示器;并且

其中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时使所述处理器显示所述光谱数据与所述基准光谱数据的比较结果的指令。

10. 一种从检测单元接收数据的设备,所述检测单元具有被配置为检测从微粒发出的光并将所检测的光转换成相应强度值的多个受光元件,所述设备包括:

处理器;

存储器件,存储有当由所述处理器执行时使所述处理器进行下列操作的指令:

(a) 接收所检测的光的强度值;

(b) 校正所述强度值;以及

(c) 基于所述校正的强度值生成光谱数据,

其中,所述检测单元被配置为生成所检测的光的强度值;

所述处理器基于所述多个受光元件中的各个相应受光元件的检测波长带宽或检测频率范围校正所述强度值。

11. 一种用于接收所检测的从微粒发出的光的校正强度值的设备,所述设备包括:

处理器;

存储器件,存储有当由所述处理器执行时使所述处理器进行下列操作的指令:

(a) 接收所检测的光的所述校正强度值;以及

(b) 基于所述校正强度值生成光谱数据,

其中,所述处理器基于多个受光元件中的各个受光元件的检测波长带宽计算所述校正强度值;

其中,所述处理器通过将各个受光元件所检测的光的强度值除以相应受光元件的检测波长带宽来计算所述校正强度值。

12. 根据权利要求11所述的设备,其中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时使所述处理器将所述光谱数据与基准光谱数据进行比较的指令。

13. 根据权利要求12所述的设备,还包括:

显示器;并且

其中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时使所述处理器显示所述光谱数据与所述基准光谱数据的比较结果的指令。

14. 一种数据分析方法,所述方法包括:

检测从微粒发出的光；

对所检测的光的强度值进行校正；及

基于校正强度值生成光谱数据，

其中，对所检测的光的强度值进行校正包括：通过将多个受光元件中的各个受光元件所检测的光的强度值除以相应受光元件的检测波长带宽来计算校正后的强度值。

15. 一种数据分析方法，所述方法包括：

检测从微粒发出的光；

对所检测的光的强度值进行校正；及

基于校正强度值生成光谱数据，

其中，对所检测的光的强度值进行校正的步骤是基于对应于所检测的光的检测波长带宽或检测频率范围。

微粒测量装置

技术领域

[0001] 本技术涉及一种对细胞等微粒的特性进行光学测量的微粒测量装置。

背景技术

[0002] 流式细胞仪是一种用光对在流动池(flow cell)中流动的细胞和小珠等微粒进行照射并检测从微粒发出的荧光或散射光,从而对各微粒的特性进行光学测量的装置。

[0003] 在检测细胞的荧光的情况下,例如,对用荧光染料标记的细胞利用具有合适波长和强度的激发光比如激光进行照射。然后,从荧光染料发出的荧光通过透镜等进行聚光,并利用波长选择元件比如滤波器和分色镜来选择合适波长带的光以便利用受光元件比如光电倍增管(PMT)对所选择的光进行检测。此时,通过将多个波长选择元件和受光元件组合在一起可以同时检测并分析来自标记在细胞上的多种荧光染料的荧光。此外,通过组合多个波长的激发光可以使能够被分析的荧光染料的数量增加。

[0004] 作为一种利用流式细胞仪检测荧光的方法,公开了一种测量连续波长带中的光束强度的作为荧光光谱的方法,以及利用波长选择元件比如滤波器来选择不连续波长带中的多个光束以便对各自波长带的光束的强度进行测量的方法。能够测量荧光光谱的光谱型流式细胞仪利用光谱元件比如棱镜和光栅对从微粒发出的荧光进行分光。然后,流式细胞仪利用排列有不同检测波长带的多个受光元件的受光元件阵列对所分光的光进行检测。一维排列有是PMT或光电二极管的受光元件的PMT阵列或光电二极管阵列、或者排列有是CCD或CMOS的多个独立检测通道(channel)比如二维受光元件的阵列被用作受光元件阵列。

[0005] 公开号为2003-83894的日本未审查的专利申请是相关技术的一个例子。

发明内容

[0006] 流式细胞仪的测量值包括由各种因素引起的误差。作为测量误差的校正方法,通常使用例如采用预先识别了荧光特性的标准样品的方法。在这种方法中,基于通过测量多个标准样品而得的基准值获取关于各个受光元件的电流输出值等和荧光强度之间的关系,并且基于该关系进行校准以获得测量值。

[0007] 在上述校正方法中,在每次测量时必须用流式细胞仪测量标准样品以便获取对应于激光输出和受光元件的设定值(例如在PMT的情况下,电压等)的校准信息。因此,上述方法非常复杂。

[0008] 需要提供一种可以通过简单处理就能对测量误差进行校正的微粒测量装置。

[0009] 根据实施方式,提供了一种微粒测量装置,包括检测单元,被配置为检测从微粒发出的光,以及处理单元,具有存储指令的存储器件,所述指令在由所述处理单元执行时,使所述处理单元(a)计算所检测的光的校正强度值并(b)基于校正强度值生成光谱数据。

[0010] 通过对在多个受光元件中的各个受光元件中利用对应受光元件的检测波长宽度获得的强度值进行校正,可以补偿由所述装置的光学系统的非线性引起的测量误差。

[0011] 该微粒测量装置可以是光谱型微粒测量装置,其包括被配置为对从微粒发出的光

进行分光的光谱元件、以及排列有不同检测波长带的多个受光元件的受光元件阵列,作为检测单元。尤其是,所述微粒测量装置可以是光谱型流式细胞仪。

[0012] 在该微粒测量装置中,优选所述处理单元利用各个受光元件的灵敏度数据对第一校正强度值进行校正以便对第二校正强度值进行计算。通过利用各个受光元件的相对灵敏度对第一校正强度值进行校正,可以补偿由受光元件之间的灵敏度差异引起的测量误差。

[0013] 进一步地,所述处理单元可以形成光谱图,该光谱图中的一个轴表示检测波长,另一个轴表示第一校正强度值或第二校正强度值,以将该光谱图输出给显示单元。此外,优选所述处理单元利用检测波长作为一个参数、并利用第一校正强度值或第二校正强度值作为另一个参数来生成光谱数据,并将光谱数据与存储在存储单元中的基准光谱数据作比较,以便将这两个数据彼此是否一致的情况输出给显示单元。

[0014] 在本技术的实施方式中,“微粒”广泛包括细胞、微生物和脂质体等的生理相关微粒,乳胶粒子、凝胶粒子和工业粒子等的合成粒子等。

[0015] 生理相关微粒包括构成各种不同细胞的染色体、脂质体、线粒体、细胞器等。细胞包括动物细胞(血细胞等)和植物细胞。微生物包括大肠杆菌等的细菌、烟草花叶病毒等的病毒、酵母菌等的真菌等。生理相关微粒还可以包括生理相关高分子比如核酸、蛋白质及核酸和蛋白质的复合物。工业粒子可以是有机高分子材料、无机高分子材料、金属材料等等。有机高分子材料包括聚苯乙烯、苯乙烯-二乙烯基苯、聚甲基丙烯酸甲酯等等。无机高分子材料包括玻璃、硅石、磁性材料等等。金属材料包括金胶体、铝等等。这些微粒通常为球形,但也可以为非球形。另外,这些微粒的尺寸和质量等没有特别的限制。

[0016] 根据本技术的实施方式,提供了一种在每次样品分析时可以无需测量标准样品而校正测量误差并且能够获得精确的分析结果的微粒测量装置。

附图说明

[0017] 图1为示出了根据本技术的一个实施方式的微粒测量装置的功能配置的框图;

[0018] 图2为示出了微粒测量装置的检测单元的配置的示意图;

[0019] 图3为示出了根据本技术的另一个实施方式的微粒测量装置的检测单元的配置的示意图;

[0020] 图4A为示出了在利用微粒测量装置校正处理之前基于强度值的输出数据的实例的图,图4B为示出了在利用微粒测量装置校正处理之后基于强度值的输出数据的实例的图;

[0021] 图5为示出了在实施方式中由试制的流式细胞仪确定PMT阵列的各个PMT的检测波长的结果的图;

[0022] 图6为示出了在实施方式中由试制的流式细胞仪确定PMT阵列的各个PMT的相对灵敏度的结果的图;

[0023] 图7A至图7D为示出了在实施方式中利用荧光分光光度计测量而得的荧光小珠的光谱图的图;

[0024] 图8A至图8C为示出了在实施方式中利用试制的流式细胞仪测量而得的荧光小珠FPK505的光谱图的图,其中图8A示出了校正处理之前的图,图8B示出了基于第一校正强度值的图,图8C示出了基于第二校正强度值的图;

[0025] 图9A至图9C为示出了在实施方式中利用试制的流式细胞仪测量而得的荧光小珠FPK505的光谱图的图,其中图9A示出了校正处理之前的图,图9B示出了基于第一校正强度值的图,图9C示出了基于第二校正强度值的图;

[0026] 图10A至图10C为示出了在实施方式中利用试制的流式细胞仪测量而得的荧光小珠FPK528的光谱图的图,其中图10A示出了校正处理之前的图,图10B示出了基于第一校正强度值的图,图10C示出了基于第二校正强度值的图;

[0027] 图11A至图11C为示出了在实施方式中利用试制的流式细胞仪测量而得的荧光小珠FPK549的光谱图的图,其中图11A示出了校正处理之前的图,图11B示出了基于第一校正强度值的图,图11C示出了基于第二校正强度值的图;

[0028] 图12A至图12C为示出了在实施方式中利用试制的流式细胞仪测量而得的荧光小珠FPK667的光谱图的图,其中图12A示出了校正处理之前的图,图12B示出了基于第一校正强度值的图,图12C示出了基于第二校正强度值的图。

具体实施方式

[0029] 下面将根据附图对本技术的优选实施方式进行说明。应注意的是,下述实施方式仅仅是本技术典型实施方式的实例且本技术的范围并不被限制解释为该实例。将按下列顺序进行描述。

[0030] 1、根据一个实施方式的微粒测量装置

[0031] (1)装置的构成

[0032] (2)荧光强度的校正处理

[0033] [计算第一校正强度值]

[0034] [计算第二校正强度值]

[0035] (3)数据显示

[0036] (4)数据分析

[0037] 2、根据另一个实施方式的微粒测量装置

[0038] (1)装置的构成

[0039] (2)荧光强度的校正处理

[0040] [计算第一校正强度值]

[0041] [计算第二校正强度值]

[0042] (3)数据显示

[0043] 1、根据一个实施方式的微粒测量装置

[0044] (1)装置的构成

[0045] 图1为示出了根据本技术的一个实施方式的微粒测量装置A的功能构成的框图。图2示意性地示出了微粒测量装置A的检测单元10的构成。

[0046] 微粒测量装置A包括通过用激光照射微粒来检测从微粒发出的荧光并将所检测的荧光的强度转换成电信号以输出电信号的检测单元10、CPU20、存储器30以及硬盘(存储单元)40。在所述微粒测量装置A中,所述CPU 20、所述存储器30以及所述硬盘(存储单元)40构成一个处理单元。微粒测量装置A进一步包括鼠标51、键盘52以及由显示器61和打印机62构成的显示单元60作为用户接口。

[0047] 检测单元10的构成可以具有类似于相关技术的微粒测量装置的构成。具体地讲,检测单元10由照射系统和检测系统构成,该照射系统对来自光源101的激光进行聚光并用激光照射微粒P,该检测系统包括对从微粒P发出的荧光进行分光(divide)的光谱元件以及对分光后的光(divided light)进行检测的受光元件阵列103。在微粒测量装置A中,微粒P以排成一行的方式在流动路径内流动,该流动路径形成在流动池或微芯片中。

[0048] 除光源101外,照射系统包括对激光进行聚光并用激光照射微粒P的聚光透镜、分色镜、带通滤波器等(未示出)。这里,光源101可以通过将发出彼此具有不同波长的光束的两个或两个以上光源组合在一起而得的光源。在这种情况下,利用两种以上激光进行照射的微粒P的点(spot)可以彼此相同或彼此不同。进一步地,所述检测系统可以包括对从微粒P发出的荧光进行聚光并将荧光引入光谱元件102的聚光透镜(未示出)等。在此实例中,采用一维排列地不同检测波长带的32个通道的PMT的光电倍增管(PMT)阵列的构成被描述为受光元件阵列103。这里,作所述受光元件阵列103,可以采用光电二极管阵列、或排列有诸如为CCD或CMOS的二维受光元件的不同检测波长带的多个独立检测通道的阵列。

[0049] 在微粒测量装置A中,检测单元10可以被配置为不但可以检测荧光还可以检测通过照射激光从微粒P发出的光,即散射光比如向前散射光、侧向散射光、瑞利散射、氏散射等等。而且,能够被恰当地理解的是,受光元件阵列103可以检测分光后的光的频率范围。

[0050] (2) 荧光强度的校正处理

[0051] CPU 20和存储器30与存储在硬盘40中的荧光强度校正程序41和OS 43协作基于从检测单元10输出的电信号对荧光的强度值进行校正处理。该校正处理包括利用各个受光元件(在该实例中为通道1至32的PMT)的检测波长带宽对荧光的强度值进行校正以便计算第一校正强度值的步骤以及利用各个PMT的灵敏度数据对第一校正强度值进行校正以便计算第二校正强度值的步骤。同样能合理预计的是,由于光的频率和波长之间成反比关系,因此校正强度值可以基于作为波长带宽的替代的频率范围。

[0052] [计算第一校正强度值]

[0053] 通过将将在各个PMT中获得的荧光的强度值除以相应PMT的检测波长带宽来计算第一校正强度值。

[0054] 具体地讲,在通道1至32的PMT之间的通道k的PMT上获得的第n个强度值用 $I[k, n]$ 表示,通道k的PMT的检测下限波长用 $L[k]$ 表示,检测上限波长用 $H[k]$ 表示。在这种情况下,用以下表达式计算第一校正强度值 $J_1[k, n]$ 。这里,k表示1到32之间的整数。

[0055] $J_1[k, n] = I[k, n] / (H[k] - L[k])$

[0056] 当包括光谱元件102的检测单元10的光学系统具有非线性时,在通道1至32的PMT上检测到的光束的波长带宽在PMT之间彼此不同(参照后面描述的图5)。因此,在各自PMT上获得的荧光的强度值在检测波长宽度较大的通道中比较大,而在检测波长宽度较小的通道中比较小,从而导致了测量误差。

[0057] 特别是,在利用受光元件阵列103对通过光谱元件102分光的荧光进行检测以便测量微粒P的荧光光谱的情况下,直接使用在各自PMT中获得的荧光的强度值的荧光光谱中,上述测量误差导致光谱形状扭曲。也就是,当横轴表示通道号、纵轴表示强度值的二维图(以下简称“光谱图”)与横轴表示检测波长、纵轴表示强度值的光谱图作比较时,在前一个图中,强度值在检测波长宽度较大的通道中比较大。因此,两个图的荧光光谱形状彼此不一

致。因此,在荧光光谱形状之间存在着差异(gap)。

[0058] 利用第一校正强度值,可以补偿由光学系统的这种非线性引起的测量误差,该第一校正强度值通过将各个PMT中获得的荧光的强度值除以相应PMT的检测波长带宽而获得。

[0059] 根据构成检测单元10的光学元件比如光谱元件102、聚光透光镜、分色镜及带通滤波器的类型和配置可以唯一确定各自PMT的检测波长宽度($H[k]-L[k]$) (参照稍后描述的图5)。因此,如果在包括光学元件的选择和配置的装置设计完毕的阶段获得各PMT的检测波长宽度,那么可以基于在各个PMT获得的荧光的强度值来计算第一校正强度值。

[0060] [计算第二校正强度值]

[0061] 通过将各个PMT获得的第一校正强度值除以相应PMT的相对灵敏度来计算第二校正强度值。

[0062] 具体地讲,通道1至32的PMT之间的通道k的PMT的相对灵敏度用 $S[k]$ 表示。在这种情况下,根据以下表达式计算第二校正强度值 $J_2[k,n]$ 。

[0063] $J_2[k,n]=J_1[k,n]/S[k]$

[0064] 这里,获得相对灵敏度,使得在各个通道的通过用强度和波长相同的光束照射PMT而获得的强度值表示为相对于获得最大强度值的通道的强度值的相对值。可以从根据记录了电信号量的灵敏度数据进行预先计算,所述电信号量在PMT用强度和波长相同的光束进行照射时从各通道输出。在此灵敏度数据中,反映了存在于各PMT的灵敏度差异以及由用户在各PMT设置的灵敏度差异(增益)两者。这里,用户可以改变施加电压等设定值来对该增益进行任意调整。

[0065] 由于PMT的个体差异和增益的设定差异,通道1至32的PMT的灵敏度在PMT之间彼此不同(参照稍后描述的图6)。因此,在各PMT上获得的荧光的强度值在灵敏度高的通道中比较大,而在灵敏度低的通道中比较小,也导致了测量误差。

[0066] 特别是,在利用受光元件阵列103对光谱元件102分光的荧光进行检测以便测量微粒P的荧光光谱的情况下,直接使用在各PMT中获得的荧光的强度值的荧光光谱中上述测量误差导致光谱形状扭曲。也就是,强度值在灵敏度较高的通道中比较大,使荧光光谱的形状扭曲。因此,该荧光光谱不精确。

[0067] 利用第二校正强度值,可以补偿受光元件之间由灵敏度差异引起的测量误差,该第二校正强度值通过将各个PMT的第一校正强度值除以相应PMT的相对灵敏度而获得。

[0068] (3)数据显示

[0069] 包括CPU 20、存储器30及硬盘40的处理单元形成一个光谱图,该光谱图具有所计算的第一校正强度值或第二校正强度值的坐标轴,以便将该光谱图输出给显示单元60。

[0070] 该光谱图可以被形成成为横轴表示各PMT的检测波长,而纵轴表示第一校正强度值(参照稍后描述的图8B、图9B、图10B、图11B和图12B)。进一步地,该光谱图优选被形成成为横轴表示检测波长,而纵轴表示第二校正强度值(参照稍后描述的图8C、图9C、图10C、图11C和图12C)。

[0071] 在该光谱图中,强度值可以用取决于微粒数量(事件数(number of events)或密度)的统计数字比如平均值、标准误差、中间值和四分位数表示(参照稍后描述的图9A至图9C),微粒数量在预定检测波长基于预定荧光强度值进行检测。进一步地,该光谱图可以被

显示为添加了表示事件数的坐标轴的三维图,且该三维图可以进行伪3D显示。进一步地,该光谱图可以通过反映了关于微粒数量(事件数或密度)的信息(频率信息)的色度、饱和度和/或亮度进行多色显示(参照稍后描述的图8A至图8C)。

[0072] (4) 数据分析

[0073] 包括CPU 20、存储器30及硬盘40的处理单元可以利用所计算的第一校正强度值或第二校正强度值作为第一参数并利用各个PMT的检测波长作为第二参数来生成光谱数据以便利用光谱数据执行各种分析。这里,第一参数可以通过对所测量的多个微粒P的全部或一部分进行计算而获得的统计数字比如第一校正强度值或第二校正强度值的平均值、标准误差、中间值和四分位数。

[0074] 进一步地,处理单元可以将所生成的光谱数据与存储在硬盘(存储单元)40中的基准光谱数据作比较以便对这些数据之间的一致程度进行评估。进一步地,处理单元将评估结果输出给显示单元60。这里,基准光谱数据可以是利用微粒测量装置A对包括之前识别出的荧光物质的微粒进行预先测量并进行上述校正处理而获得的光谱数据,或通过利用普通荧光分光光度计对荧光物质的荧光光谱进行测量而获得的光谱数据。这是因为可以直接将由微粒测量装置A获得的测量值与由普通荧光分光光度计获得的测量值作比较。将基准光谱数据存储在硬盘40中作为基准数据42。各检测波长的差值总和、差值的绝对值的总和或差值的平方和等可以被用作利用基准光谱数据评估一致程度的方法。

[0075] 如果将通过利用微粒测量装置A对微粒P进行测量并对测量结果进行校正而得的光谱数据与一个或两个以上基准光谱数据作比较,可以确定从所测量的微粒P发出的荧光是否类似于在基准光谱数据中所记录的任何荧光。因此,当包括在所测量微粒P中的荧光物质种类不清楚时,例如,可以从所记录的基准光谱数据中检索高相似度的荧光物质以便预测包括在微粒P中的荧光物质种类。

[0076] 进一步地,如果将通过利用微粒测量装置A对微粒P进行测量并对测量结果进行校正而得的光谱数据与通过对相同微粒P进行测量而预先获得的基准光谱数据作比较,可以对微粒测量装置A的状态进行评估。也就是,存在由于受光元件阵列的操作异常、微粒在流动池或微芯片中湍流、由于各个元件(例如透镜和光谱元件)的温度变化或振动而产生的差异(gap)等的影响而使微粒测量装置A的状态恶化的情况,因此测量精度降低。可以认为一种有效的途径是利用微粒测量装置A和荧光分光光度计对同一样品进行测量并将结果作比较以检查该装置的状态。根据本技术的实施方式,可以直接将通过微粒测量装置A而得的测量结果与荧光分光光度计的测量结果作比较,以便能够简单而准确地评估状态。

[0077] 另外,如果利用多个基准光谱数据对利用微粒测量装置A对微粒P进行测量并对测量结果进行校正而得的光谱数据进行补偿处理,可以确定包括在微粒P中的多种荧光染料的数量。例如,当微粒P被多种荧光染料 $\{D_1, D_2, \dots, D_n\}$ 染色时,优选从单独被各荧光染料 $\{D_1, D_2, \dots, D_n\}$ 染色的样品获得的荧光染料包括在用于补偿处理的基准光谱数据中。例如可以采用最小二乘法作为补偿处理的方法。

[0078] 2、根据另一个实施方式的微粒测量装置

[0079] (1) 装置的构成

[0080] 图3示意性地示出了根据本技术的另一个实施方式的微粒测量装置B的检测单元10的构成。微粒测量装置B的功能构成与根据上述实施方式的图1中的微粒测量装置A的功

能构成相同,因此省略对其进行说明。

[0081] 微粒测量装置B与对连续波长带的光束的强度进行测量的微粒测量装置A的不同之处在于微粒测量装置B利用波长选择元件比如滤波器来选择不连续波长带的多个光束并对各波长带的光束的强度进行测量。

[0082] 微粒测量装置B的检测单元10由照射系统和检测系统构成,该照射系统对来自光源101的激光进行聚光并用激光照射微粒P,该检测系统包括从微粒P发出的荧光选择预定波长的光的波长选择元件104至106以及对所选择的光进行检测的受光元件阵列107至110。在微粒测量装置B中,微粒P以排列成一行的方式在流动路径内流动,该流动路径形成在流动池或微芯片中。

[0083] 照射系统除光源101外包括对激光进行聚光并用激光照射微粒P的聚光透镜、分色镜、带通滤波器等(未示出)。这里,光源101可以通过将发出彼此具有不同波长的光束的两个或两个以上光源组合在一起而得的光源。在这种情况下,利用两种或两种以上激光进行照射的微粒P的点可以彼此相同或彼此不同。进一步地,检测系统可以包括对从微粒P发出的荧光进行聚光并将荧光引入波长选择元件104的聚光透镜(未示出)等。在该实例中,对采用不同检测波长带的光电倍增管(PMT)作为受光元件107至110的构成进行描述。下文中,受光元件107至110的通道号分别为1至4。这里,光电二极管可以用作受光元件107至110。

[0084] 在微粒测量装置B中,检测单元10可以被配置为对散射光等以及荧光进行检测,如与微粒测量装置A的情况一样。

[0085] (2) 荧光强度的校正处理

[0086] 微粒测量装置B基于从检测单元10输出的电信号对荧光的强度值进行校正处理。该校正处理包括利用每个受光元件(在该实例中为通道1至4的PMT)的检测波长带宽对荧光的强度值进行校正以便计算第一校正强度值的步骤以及利用每个PMT的灵敏度数据对第一校正强度值进行校正以便计算第二校正强度值的步骤。

[0087] [计算第一校正强度值]

[0088] 通过将将在各个PMT中获得的荧光的强度值除以相应PMT的检测波长带宽来计算第一校正强度值。

[0089] 具体地讲,在通道1至4的PMT之间的通道k的PMT获得的第n个强度值用 $I[k,n]$ 表示,通道k的PMT的检测下限波长用 $L[k]$ 表示,检测上限波长用 $H[k]$ 表示。在这种情况下,利用以下表达式计算第一校正强度值 $J_1[k,n]$ 。这里,k表示1到4之间的整数。

[0090] $J_1[k,n]=I[k,n]/(H[k]-L[k])$

[0091] 当包括波长选择元件104至106的检测单元10的光学系统具有非线性时,在通道1至4的PMT检测到的光束的波长带宽在PMT之间彼此不同。因此,在各PMT上获得的荧光的强度值在检测波长宽度较大的通道中比较大,而在检测波长宽度较小的通道中比较小,从而导致了测量误差。

[0092] 利用第一校正强度值,可以补偿由光学系统的这种非线性引起的测量误差,该第一校正强度值通过将在各个PMT中获得的荧光的强度值除以相应PMT的检测波长带宽而获得。

[0093] 根据构成检测单元10的光学元件比如波长选择元件104至106、聚光透光镜、分色镜及带通滤波器的类型和构成可以唯一确定各PMT的检测波长宽度($H[k]-L[k]$)。因此,如

果包括光学元件的选择和配置的装置设计完毕的阶段获得各PMT的检测波长宽度,那么可以基于在各个PMT上获得的荧光的强度值来计算第一校正强度值。

[0094] [计算第二校正强度值]

[0095] 通过将各个PMT获得的第一校正强度值除以相应PMT的相对灵敏度来计算第二校正强度值。

[0096] 具体地讲,通道1至4的PMT之间的通道k的PMT的相对灵敏度用 $S[k]$ 表示。在这种情况下,根据以下表达式计算第二校正强度值 $J_2[k,n]$ 。

[0097] $J_2[k,n]=J_1[k,n]/S[k]$

[0098] 由于PMT的个体差异和增益的设定差异,通道1至4的PMT的灵敏度在PMT之间彼此不同。因此,在各PMT上获得的荧光的强度值在灵敏度高的通道中比较大,而在灵敏度低的通道中比较小,也导致了测量误差。

[0099] 利用第二校正强度值,可以补偿受光元件之间由灵敏度差异引起的测量误差,该第二强度值通过将各PMT的第一校正强度值除以相应PMT的相对灵敏度而获得。

[0100] (3)数据显示

[0101] 微粒测量装置B形成一个二维图,该二维图具有所计算的第一校正强度值或第二校正强度值的坐标轴,并将该二维图输出给显示单元60。

[0102] 该二维图可以被形成横轴表示各PMT的检测波长,而纵轴表示第一校正强度值或第二校正强度值。图4A示出了在校正处理之前的图;图4B示出了基于第二校正强度值的图。图4A是横轴表示通道号k(k是1至4之间的整数)、纵轴表示在各个通道中获得的荧光的强度值($I[k]$)的对数的图。此外,图4B是横轴表示检测波长、纵轴表示在各个通道中获得的荧光强度值的校正值($J_1[k]$ 或 $J_2[k]$)的对数的图。

[0103] 通过上述校正处理,在补偿由装置的光学系统的非线性和受光元件之间的灵敏度差异引起的测量误差的状态下,微粒测量装置B可以显示利用波长选择元件选择的不连续波长带的光的强度的测量结果。

[0104] 根据本技术的实施方式的微粒测量装置可以具有下列配置。

[0105] 在一个实施方式中,一种微粒测量装置包括:检测单元,被配置为检测从微粒发出的光,以及处理单元,具有存储指令的存储器件,所述指令在由处理单元执行时,使所述处理单元计算所检测的光的校正强度值并基于校正强度值生成光谱数据。

[0106] 在所述微粒测量装置中,所述检测单元可以被配置为生成所检测的光的强度值。

[0107] 在所述微粒测量装置中,所述检测单元可以包括多个受光元件。

[0108] 在所述微粒测量装置中,所述处理单元可以基于多个受光元件中的各个受光元件的检测波长带宽对校正强度值进行计算。

[0109] 在所述微粒测量装置中,所述处理单元可以基于多个受光元件中的各个受光元件的检测频率范围对校正强度值进行计算。

[0110] 在所述微粒测量装置中,所述处理单元可以基于多个受光元件中的各个受光元件的检测波长带宽和检测频率范围中的至少一个对校正强度值进行计算。

[0111] 在所述微粒测量装置中,所述校正强度值可以是第一校正强度值且所述处理单元基于多个受光元件中的各个相应受光元件的第一校正强度值和相对灵敏度数据进一步计算第二校正强度值。

[0112] 在所述微粒测量装置中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时,可以使所述处理器将光谱数据与基准光谱数据作比较的指令。

[0113] 所述微粒测量装置可以进一步包括显示器,以及存储有当由所述处理器执行时使所述处理器显示光谱数据与基准光谱数据的比较结果的指令的存储器件。

[0114] 在另一个实施方式中,提供了一种从检测单元接收数据的设备。所述检测单元具有被配置为检测从微粒发出的光并将所检测的光转换成相应强度值的多个受光元件。所述设备包括处理器以及存储有当由所述处理器执行时使所述处理器接收所检测的光的强度值、校正所述强度值并基于校正强度值生成光谱数据的指令的存储器件。

[0115] 在所述设备中,所述处理器可以基于多个受光元件中的各个相应受光元件的检测波长带宽和检测频率范围中的至少一个对强度值进行校正。

[0116] 在所述设备中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时可以使所述处理器将光谱数据与基准光谱数据作比较的指令。

[0117] 所述设备可以进一步包括显示器,以及存储有当由所述处理器执行时使所述处理器显示光谱数据与基准光谱数据的比较结果的指令的存储器件。

[0118] 在另一个实施方式中,一种用于接收从微粒发出的所检测的光的校正强度值的设备包括:处理器,以及存储有当由所述处理器执行时使所述处理器接收所检测的光的校正强度值并基于校正强度值生成光谱数据的指令的存储器件。

[0119] 在所述设备中,所述存储器件存储有当由所述处理器执行时,可以使所述处理器将光谱数据与基准光谱数据作比较的指令。

[0120] 所述设备可以进一步包括显示器,以及存储有当由所述处理器执行时,使所述处理器显示光谱数据与基准光谱数据的比较结果的指令的存储器件。

[0121] 在另一个实施方式中,一种数据分析方法包括检测从微粒发出的光,对所检测的光的强度值进行校正,及基于校正强度值生成光谱数据。

[0122] 在所述数据分析方法中,对所检测的光的强度值进行校正的步骤基于对应于所检测的光的检测波长带宽和检测频率范围中的至少一个。

[0123] [实施例]

[0124] 试制了图2所示的包括检测单元的光谱型流式细胞仪。488nm波长的激光二极管以及638nm波长的激光二极管被用作光源。进一步地,通过将多个棱镜组合在一起而得的棱镜阵列被用作光谱元件。32个通道的PMT阵列被用作受光元件阵列并且波长为500nm至800nm的荧光被分光检测。

[0125] 图5示出了在试验装置中确定各PMT的检测波长带的结果的图。图中的“×”表示各通道的PMT的检测下限波长($L[k]$),“0”表示检测上限波长($H[k]$)。这里, k 为1至32之间的整数。可以证实的是,在各PMT的检测波长带宽($H[k]-L[k]$)中,在通道号较大的长波长侧的PMT的检测波长带宽较大。这里,在对波长大约为638nm的荧光进行检测的第21个通道附近的PMT中,所检测的荧光同样受滤光器的限制,该滤光器防止激光从波长为638nm的光源泄漏出来。

[0126] 图6示出了各PMT的相对灵敏度的计算结果的图。获得相对灵敏度,使得在各个通道上通过用强度和波长相同的光束照射PMT而获得的强度值以相对于获得最大强度值的通道32的强度值的相对值表示,通道32的强度值被设为1。

[0127] 首先,利用F-4500型荧光分光光度计(Hitachi High-Technologies Corporation)对市场上可买到的荧光小珠的荧光光谱进行测量。四种小珠被用作荧光小珠,即Spherotech公司提供的荧光粒子试剂盒(FPK) 505、FPK528、FPK549及FPK667。图7A至图7D中示出了所得的光谱图(基准光谱图)。图7A、图7B、图7C及图7D分别示出了FPK505、FPK528、FPK549及FPK667的荧光光谱。横轴表示荧光波长(500nm至800nm),纵轴表示荧光强度值(用对数表示)。这里,激光的激发波长是图7A至图7C中的488nm的波长以及图7D中的638nm的波长。

[0128] 随后利用试验装置对荧光小珠的荧光光谱进行测量。图8A至图12C中示出了所得的光谱图。图8A至图9C示出了FPK505的图,图10A至图10C示出了FPK528的图,图11A至图11C示出了FPK549的图,图12A至图12C示出了FPK667的图。在图8A至图8C中,各通道的事件数用光谱颜色显示出来。进一步地,在图9A至图9C中,强度值用基于事件数的平均值(实线)以及平均值±标准差(虚线)表示。

[0129] 图8A、图9A、图10A、图11A及图12A是横轴表示通道号,纵轴表示在每个通道中获得的荧光的强度值($I[k]$, k 表示1至32之间的整数)的对数的光谱图。

[0130] 图8A、图9A、图10A、图11A及图12A的光谱图中所示的光谱形状明显不同于图7A至图7D中所示的基准光谱图的光谱形状。这表示光谱形状在直接利用在PMT获得的荧光的强度值($I[k]$)而得的荧光光谱中由于所述装置的光学系统的非线性和受光元件之间的灵敏度差异引起的测量误差而导致扭曲。

[0131] 图8B、图9B、图10B、图11B及图12B是横轴表示检测波长,纵轴表示在各个通道获得的荧光强度值的第一校正值($J_1[k]$, k 表示1至32之间的整数)的对数的光谱图。通过将各个PMT中获得的荧光的强度值($I[k]$)除以相应PMT的图5中所示的检测波长带宽($H[k]-L[k]$)来获得第一校正强度值 $J_1[k]$ 。更具体地,将在通道 k 的PMT获得的第 n 个强度值 $I[k,n]$ 除以相应PMT的检测波长带宽($H[k]-L[k]$)以获得第一校正强度值 $J_1[k,n]$,并在横轴的 $L[k]$ 至 $H[k]$ 范围内绘制出 $J_1[k,n]$ 的分布以便形成光谱图。

[0132] 图8B、图9B、图10B、图11B及图12B的光谱图中所示的光谱形状与图7A至图7D的基准光谱图的光谱形状大致一致。这表示通过将各个PMT获得的荧光的强度值($I[k]$)除以相应PMT的检测波长带宽($H[k]-L[k]$)的校正处理补偿了由所述装置的光学系统的非线性引起的测量误差,并能够校正光谱形状的扭曲。

[0133] 图8C、图9C、图10C、图11C及图12C是横轴表示检测波长,纵轴表示在各个通道中获得的荧光强度值的第二校正值($J_2[k]$, k 表示1至32之间的整数)的对数的光谱图。通过将第一校正强度值($J_1[k]$)除以相应PMT的图6中所示的相对灵敏度($S[k]$)获得了第二校正强度值 $J_2[k]$ 。

[0134] 图8C、图9C、图10C、图11C及图12C的光谱图中所示的光谱形状与图7A至图7D所示的基准光谱图的光谱形状基本一致。特别是,虽然在图8B、图9B、图10B、图11B及图12B的基于第一校正值($J_1[k]$)的光谱图中的大约500nm的波长区域中观察到似乎是由PMT的灵敏度差异引起的光谱形状的扭曲,但该扭曲在图8C、图9C、图10C、图11C及图12C的基于第二校正值($J_2[k]$)的光谱图中被校正。这证明通过将第一校正值($J_1[k]$)除以相应PMT的相对灵敏度($S[k]$)的校正处理补偿了由受光元件之间的灵敏度差异引起的测量误差,并且光谱形状的扭曲能够被校正。

[0135] 从上述结果可以了解到,根据本技术实施方式的微粒测量装置可以测量出微粒的光谱形状,并且该光谱形状与通过普通荧光分光光度计测量而得的基准光谱图基本一致。

[0136] 因此,在根据本技术实施方式的微粒测量装置中,在记录有事先识别的荧光的光谱形状的数据库(基准数据)中检测其标记荧光染料的类型或数量未被事先识别的样品的光谱形状,能够对在样品上标记的荧光染料的类型或数量进行预测。

[0137] 进一步地,在根据本技术实施方式的微粒测量装置中,可以利用预先测量的各种荧光染料的光谱来进行对多种荧光染料标记的样品进行分析时进行的补偿计算,而无需进行在相关技术中的对被各种荧光染料单独染色的样品的测量。因此,可以减少样品分析的工作和时间以及试剂源等。

[0138] 本发明包含与日本专利局于2011年9月13日提交的日本在先专利申请JP 2011-199892中公开的主题相关的主题,其整体内容通过引用并入本文。

[0139] 本领域的技术人员应理解可根据设计要求和因素进行各种修改、组合、子组合以及变更,各种修改、组合、子组合以及变更均应包含在所附权利要求或其等方案的范围内。

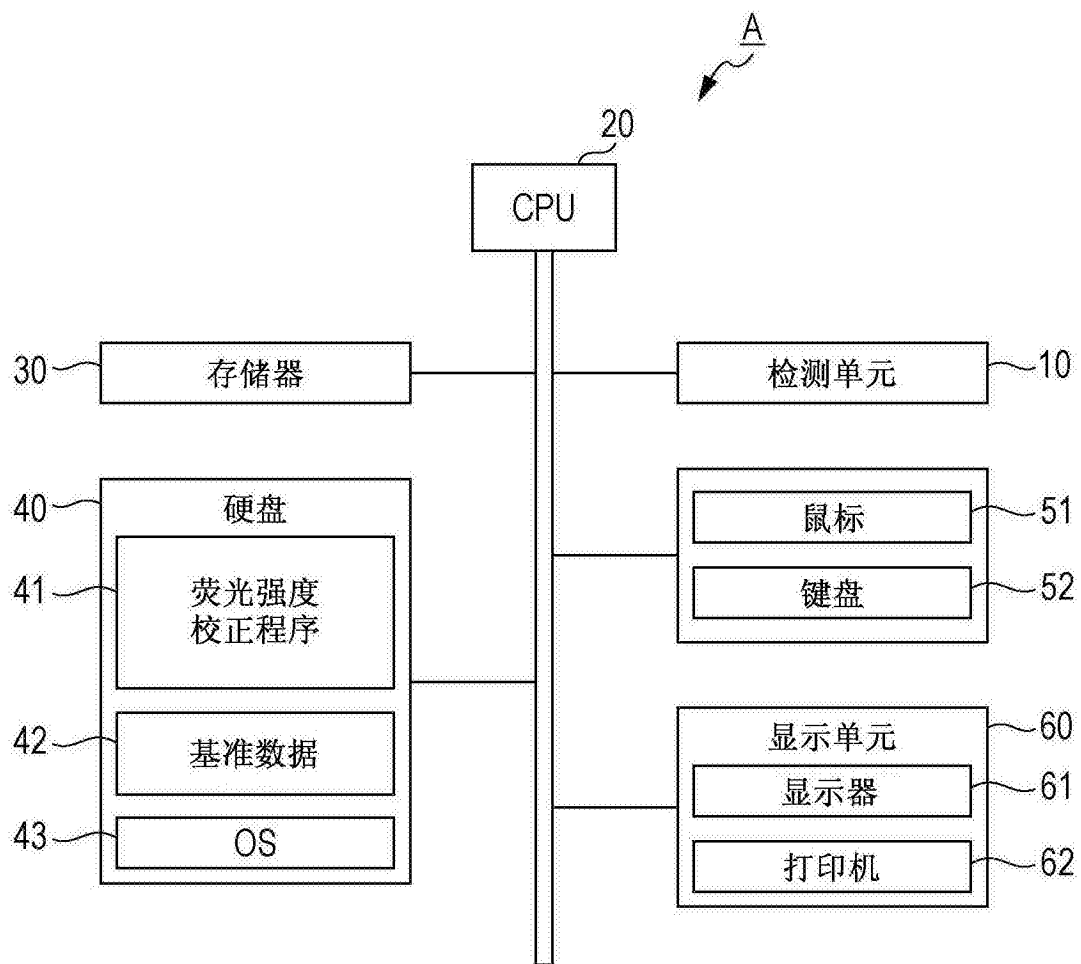


图1

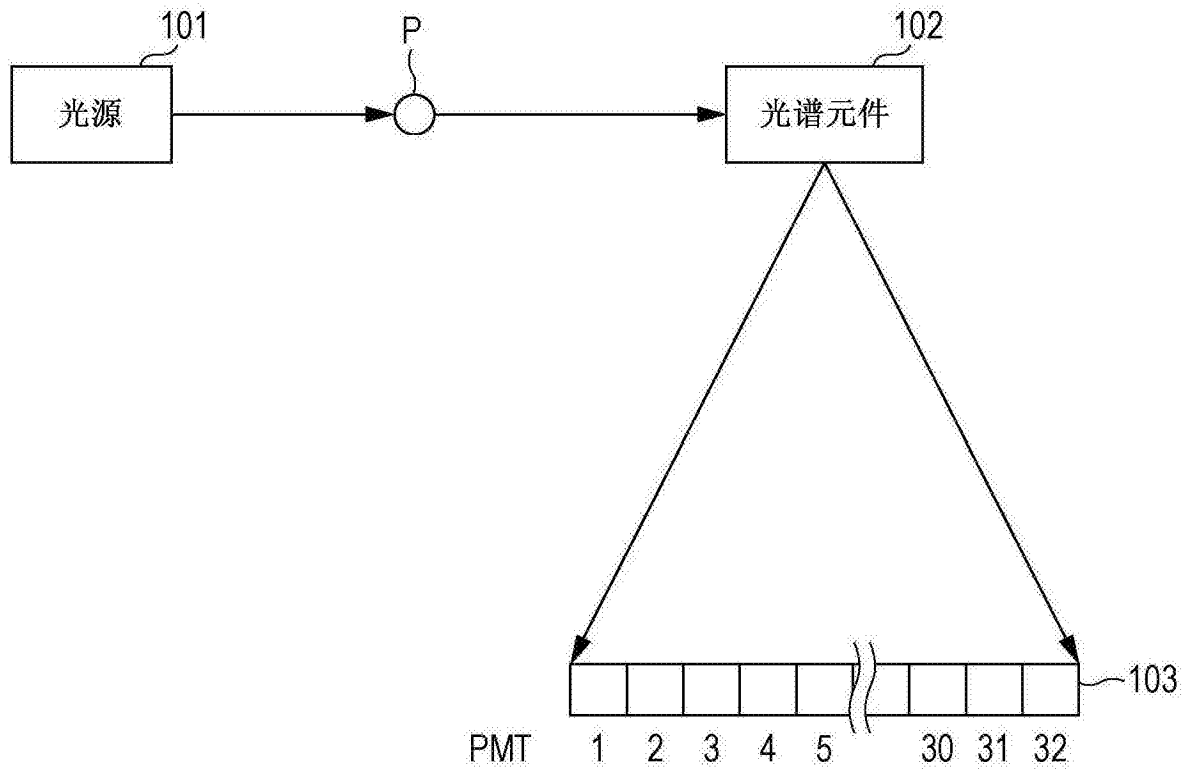


图2

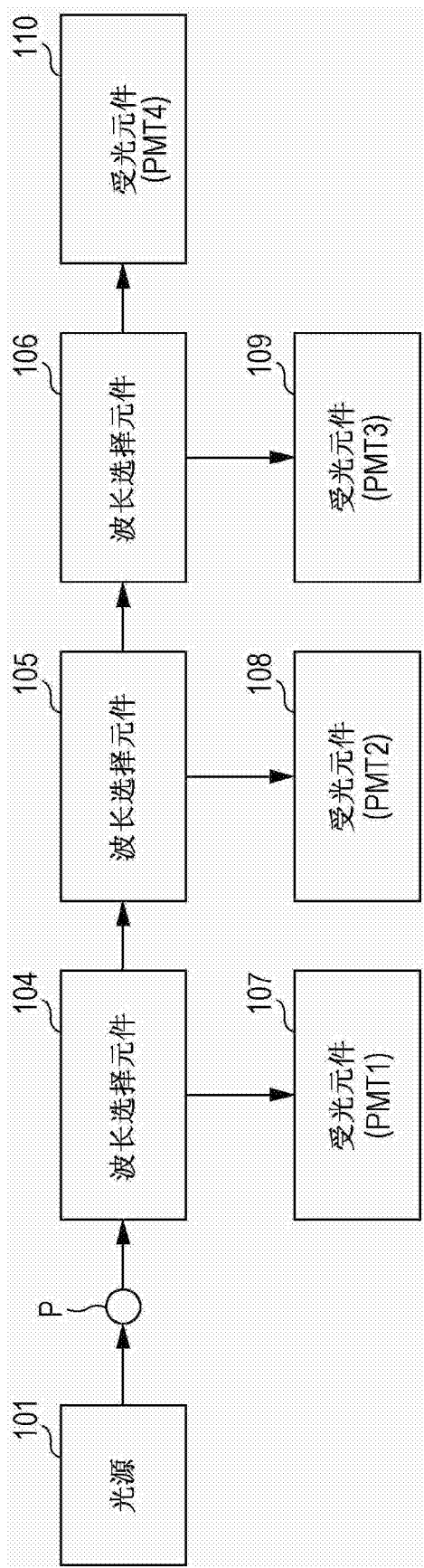


图3

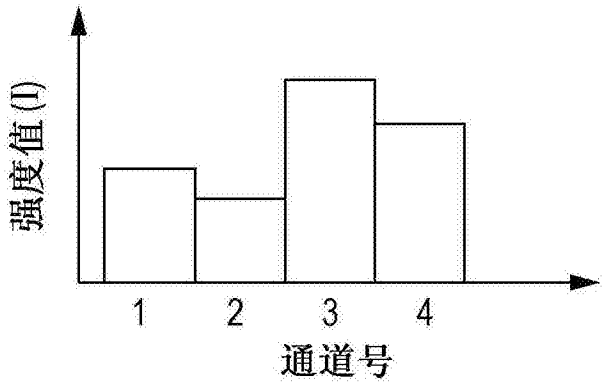


图4A

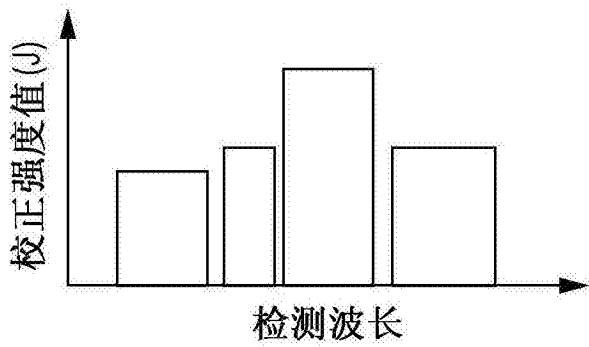


图4B

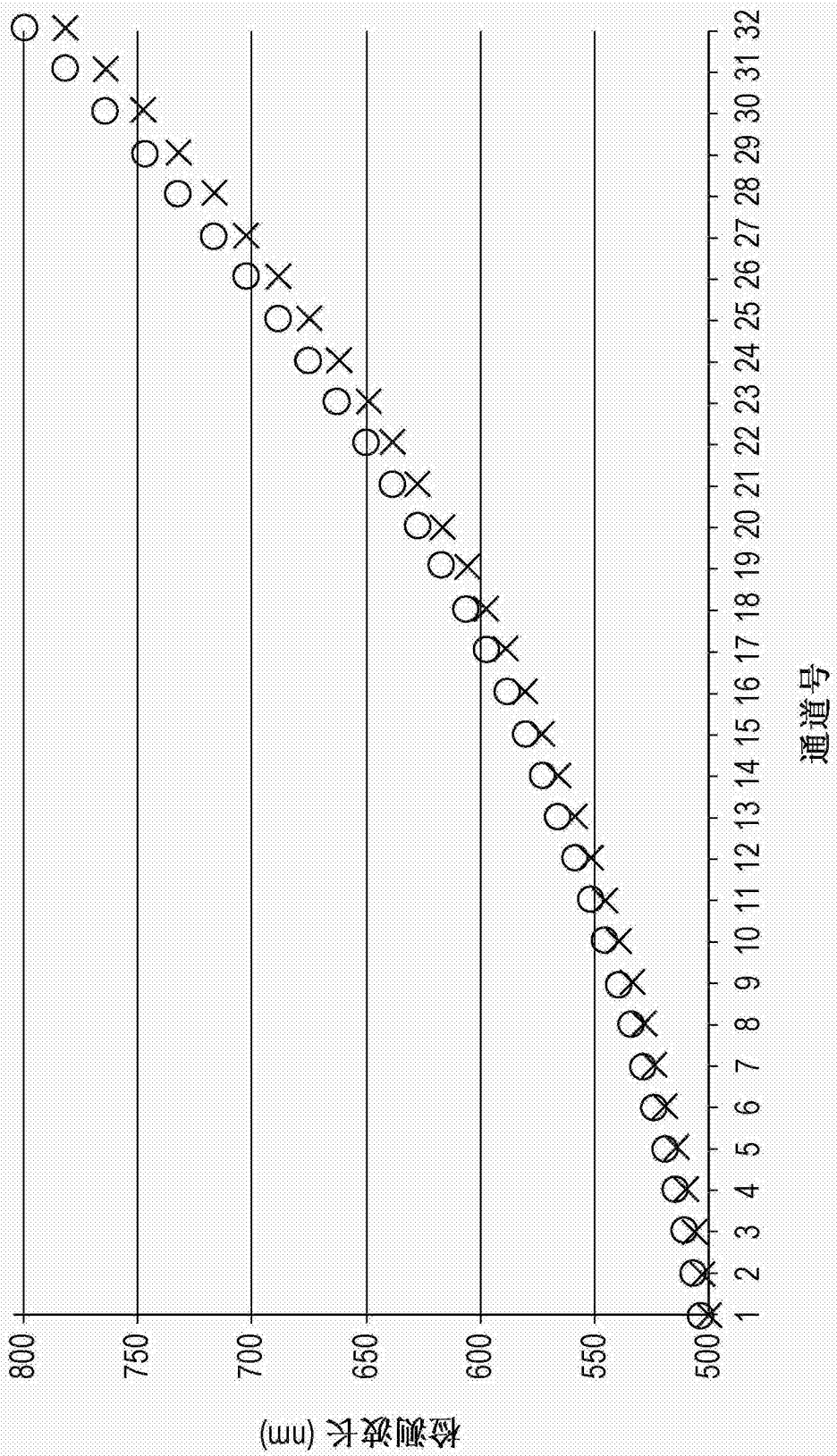


图5

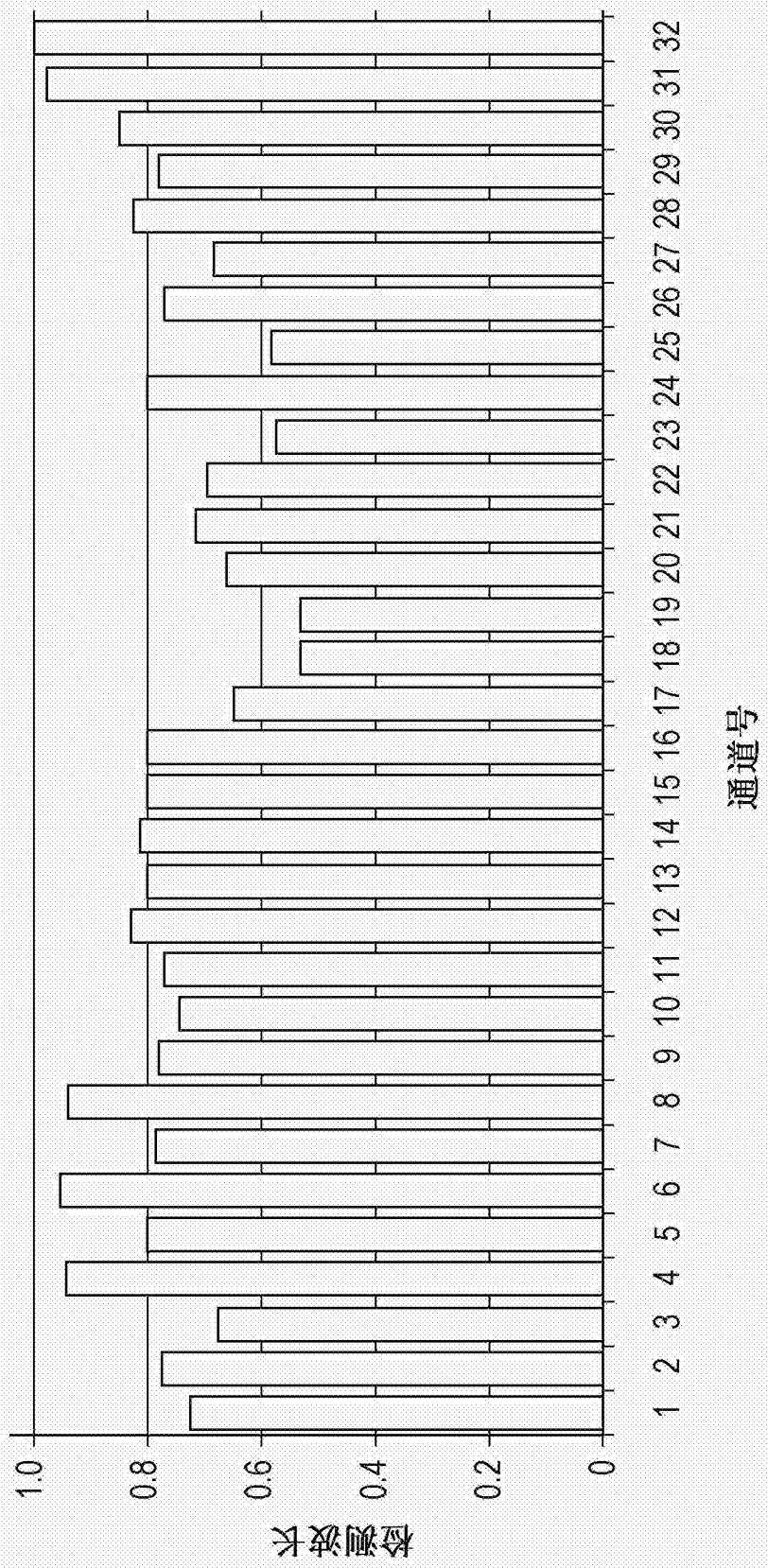


图6

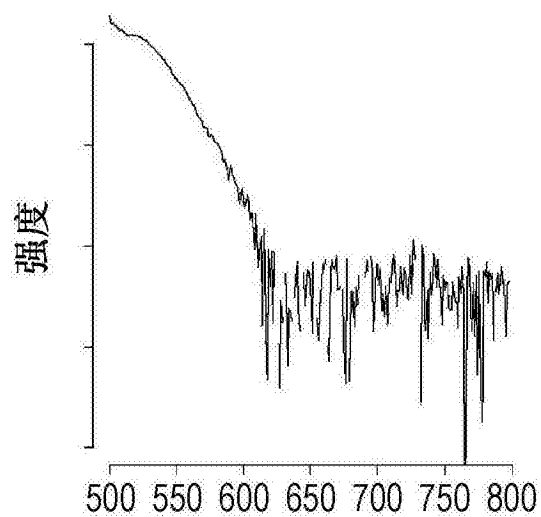


图7A

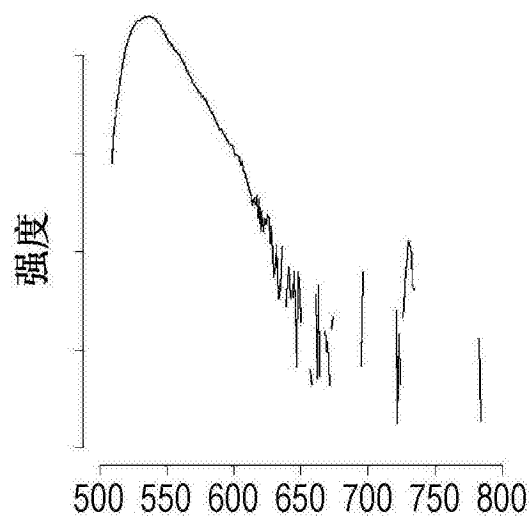


图7B

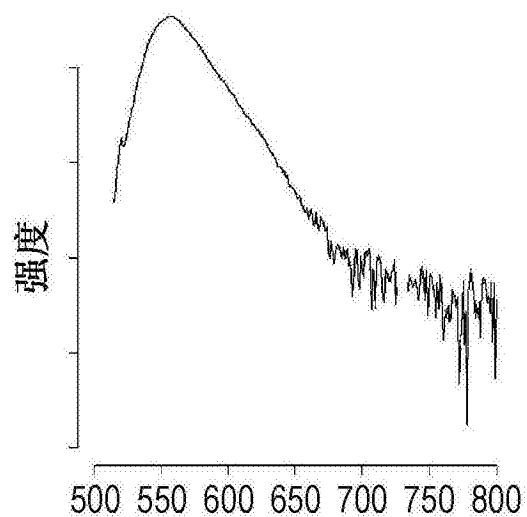


图7C

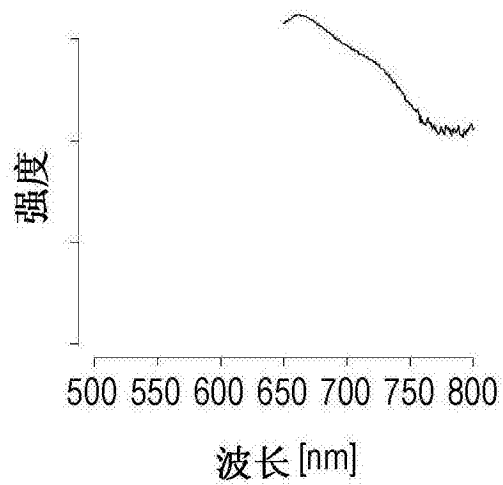


图7D

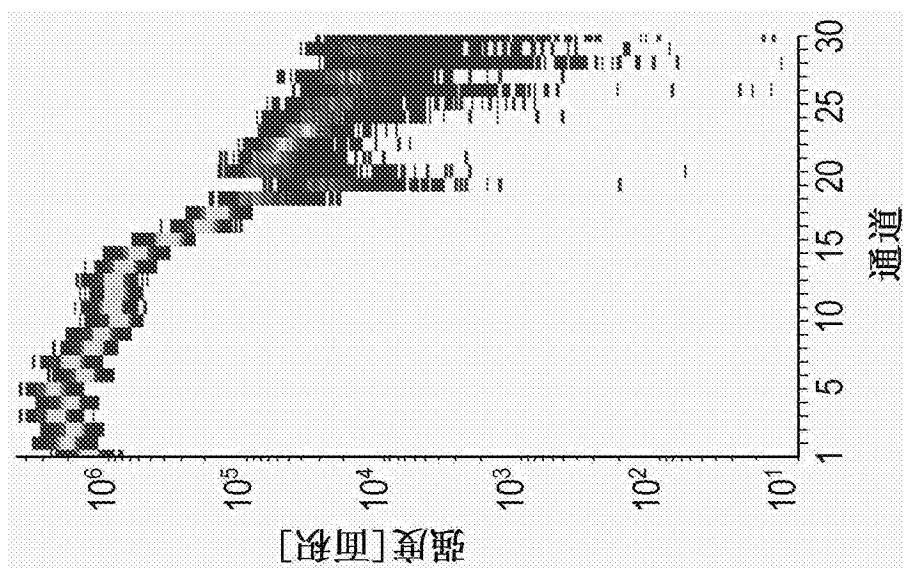


图8A

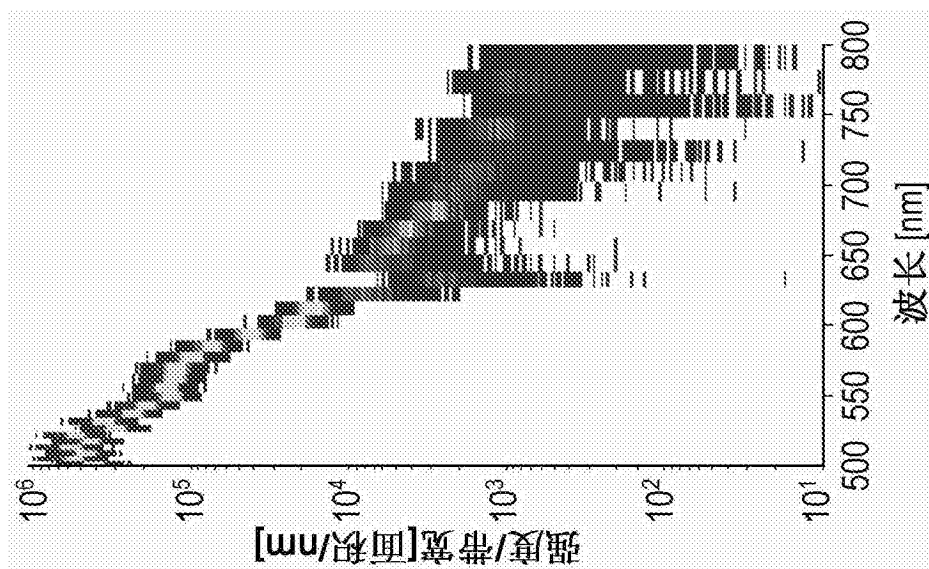


图8B

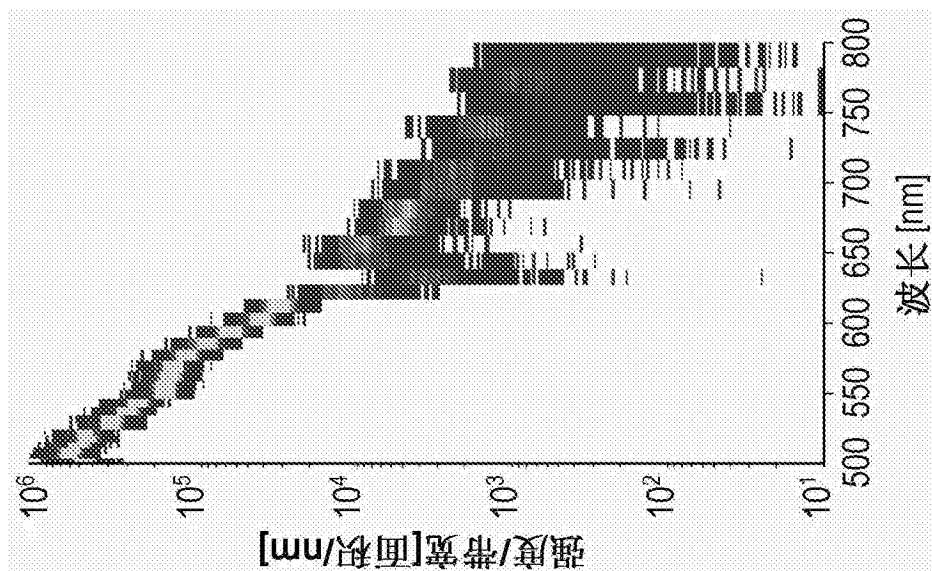


图8C

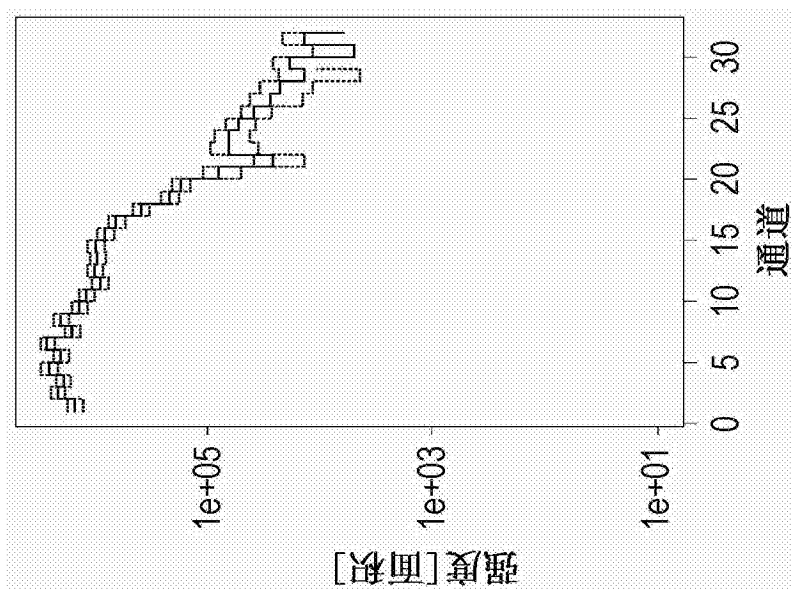


图9A

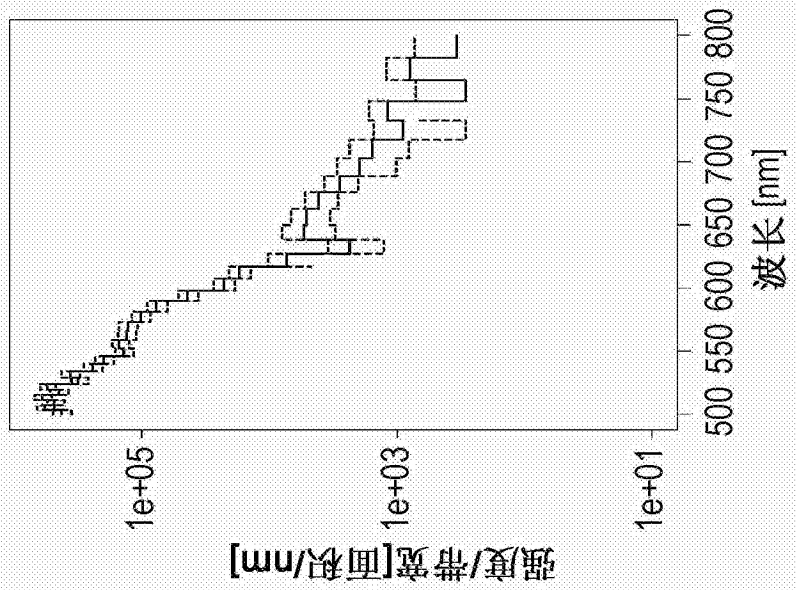


图9B

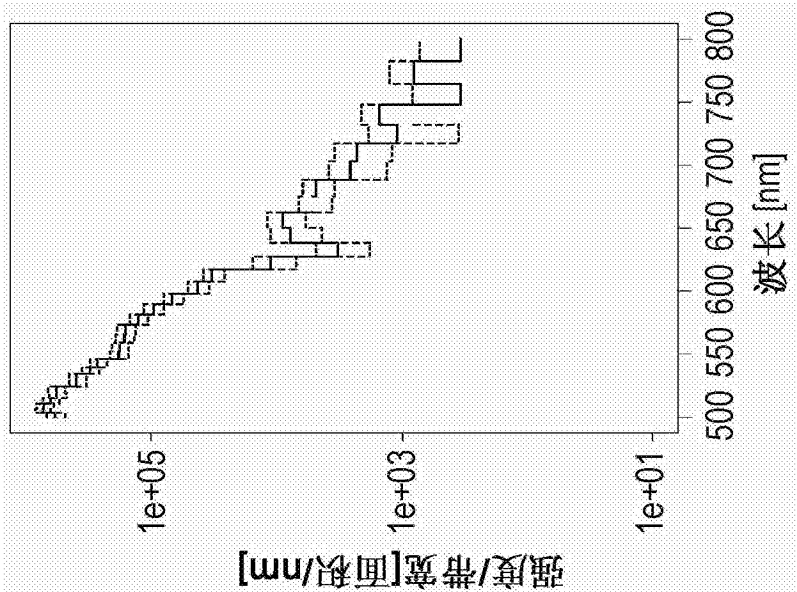


图9C

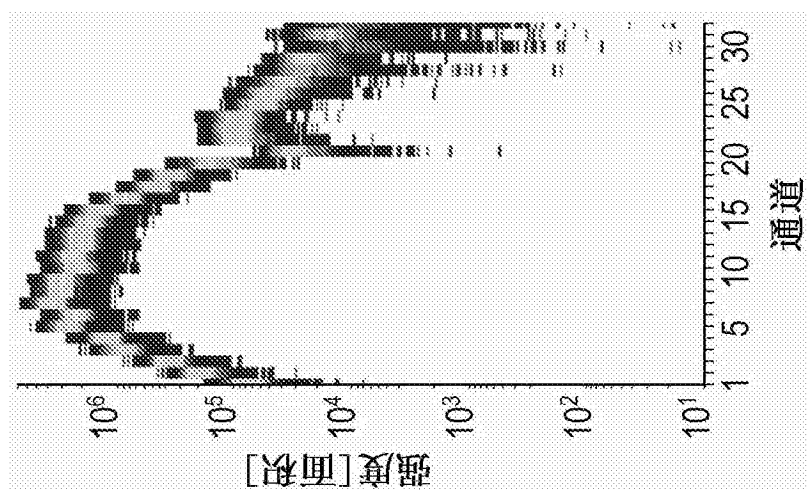


图10A

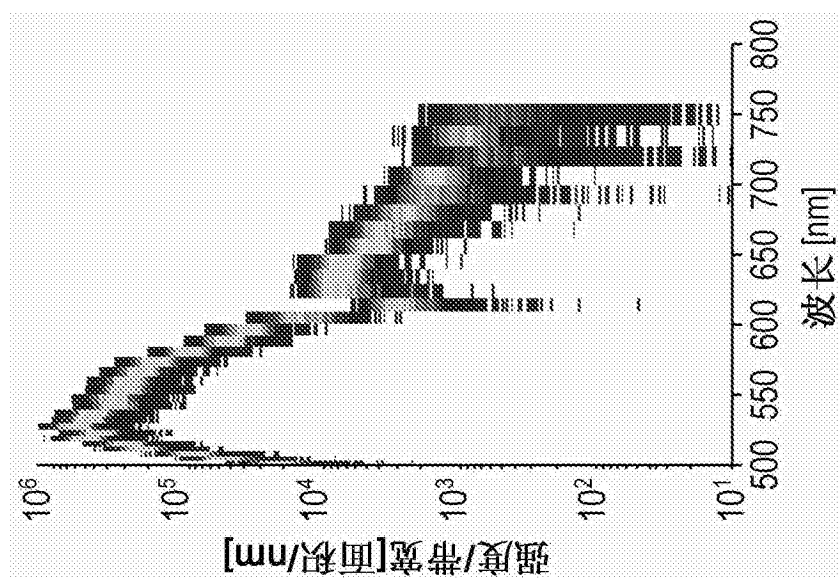


图10B

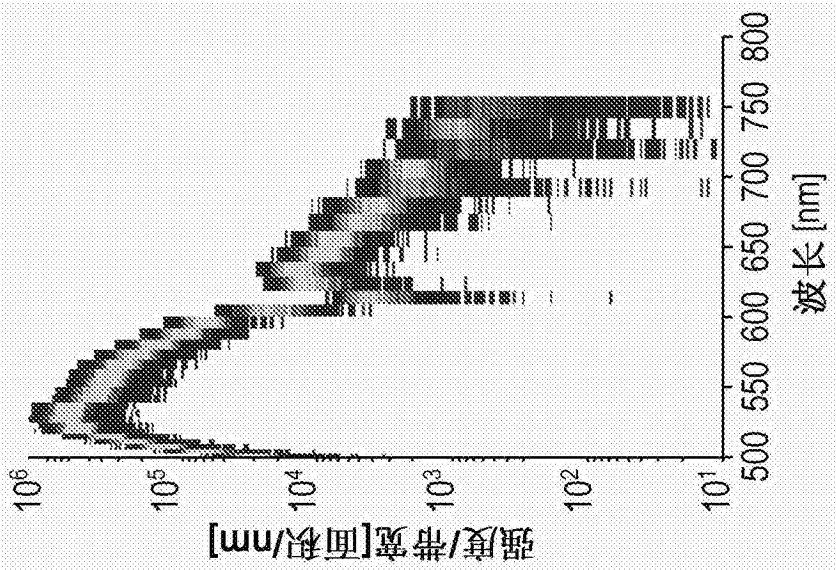


图10C

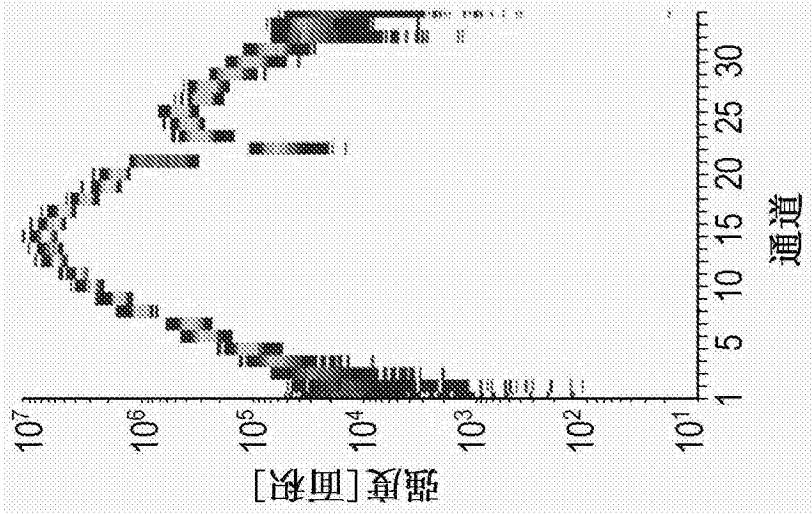


图11A

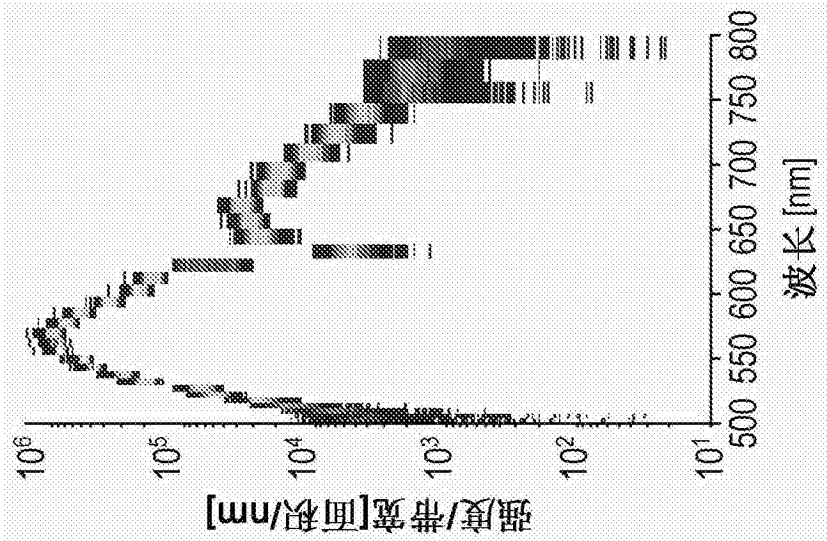


图11B

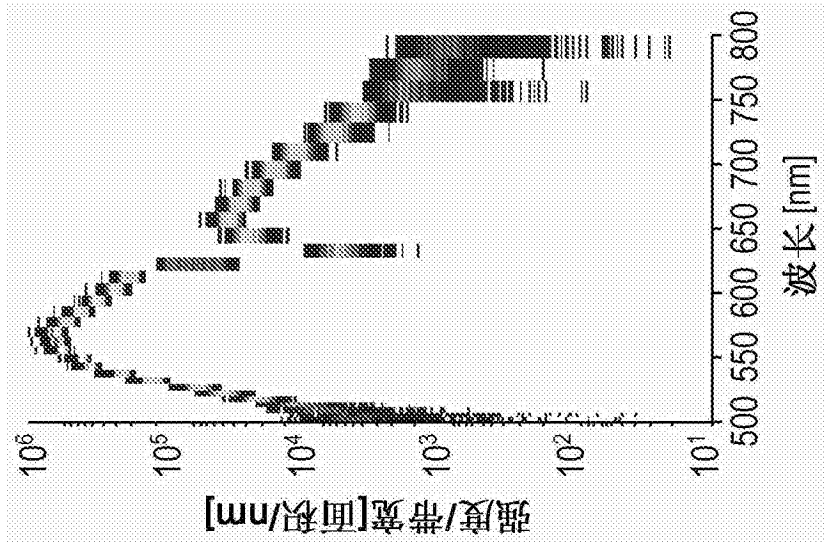


图11C

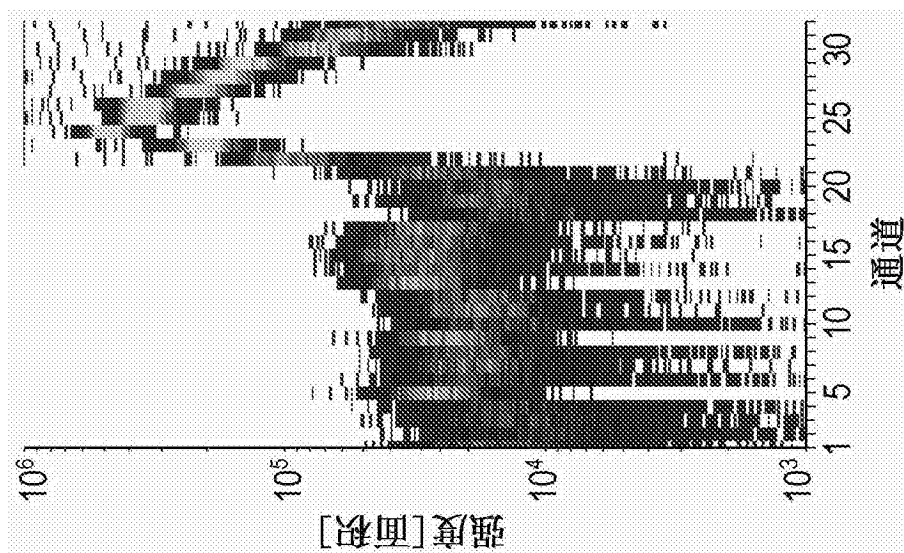


图12A

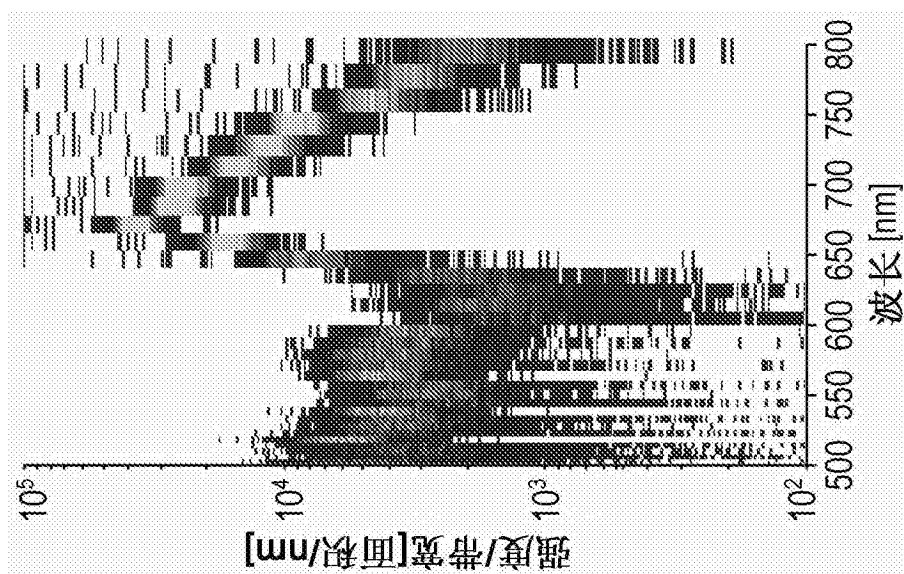


图12B

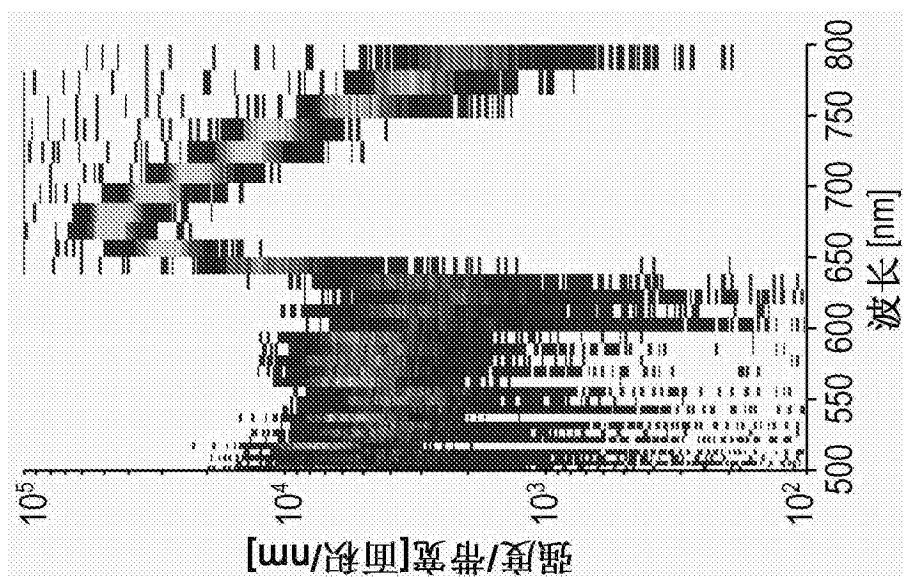


图12C