

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

G01N 35/00 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480010496.5

[43] 公开日 2007年9月26日

[11] 公开号 CN 101044404A

[22] 申请日 2004.3.2

[21] 申请号 200480010496.5

[30] 优先权

[32] 2003.3.3 [33] US [31] 60/451,587

[86] 国际申请 PCT/IB2004/002780 2004.3.2

[87] 国际公布 WO2004/106925 英 2004.12.9

[85] 进入国家阶段日期 2005.10.19

[71] 申请人 长冈实业株式会社

地址 日本兵库县

共同申请人 伯斯坦技术公司 小山佳久

[72] 发明人 J·H·库布斯 J·F·戈登

B·C·潘 J·R·I·厄西亚

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利商
标事务所

代理人 李华英

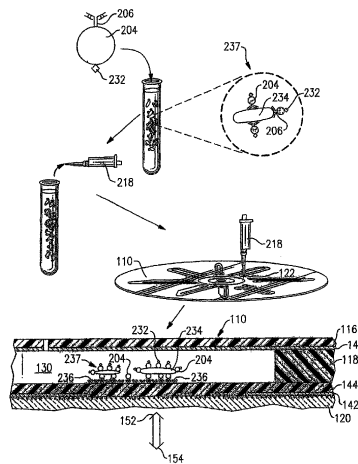
权利要求书 11 页 说明书 49 页 附图 23 页

[54] 发明名称

用于不同类型细胞检测和定量的方法和装置
以及生物光盘在该检测和定量中的应用

[57] 摘要

公开了进行包括白细胞的细胞分类计数的方法和装置，以及生物光盘在这种细胞计数中的应用。该生物光盘包括基本上为圆形的基质，它具有中心和外缘，以及与此基质结合的活性层；在中心和外缘之间存在靶区；以及与活性层结合的大量捕捉抗体，由此使这些抗体固定在靶区的活性层上。



1、一种在不同类型细胞中检测和定量研究细胞类型的方法，该方法包括以下步骤：

提供含有靶细胞的试验标本，该靶细胞具有共同表面标记，它包括具有第一种表面标记的第一种细胞类型和具有第二种表面标记的第二种细胞类型；

提供一种生物光盘，该生物光盘包括实质圆形的基质，它具有中心和外缘，处于中心和外缘之间的靶区，靶区内有大量捕捉抗体结合于此实质圆形的基质，以便这些大量捕捉抗体固定在靶区中，这些大量捕捉抗体与所述靶细胞共同表面标记具有亲和力；

将试验标本沉积在靶区上；

使试验标本中的靶细胞与所述大量捕捉抗体通过所述共同表面标记结合，所述靶细胞包括第一种细胞类型和第二种细胞类型；

冲洗靶区以除去未结合细胞；

提供指示剂，它具有结合其上的信号抗体，该信号抗体与第一种表面标记具有特异性亲和力；

将指示剂沉积在所述靶区上；

使所述信号抗体与靶区中第一种细胞类型的第一种表面标记结合，以此标记第一种细胞类型；

冲洗靶区以除去未结合的指示剂；

用一束电磁射线扫描所述靶区，测定经标记的第一种细胞类型细胞和未经标记的第二种细胞类型细胞的数目。

2、权利要求1的方法，其中所述指示剂为一种小珠，它具有可检测的物理性质。

3、权利要求2的方法，其中所述可检测的物理性质选自颜色、大小、纹理、反射性、吸光度、质量、荧光性、磷光性和磁性。

4、权利要求1的方法，其中所述指示剂为酶。

5、权利要求4的方法，它还包括的步骤是：将一种酶底物沉积在该靶区上，此酶底物可与所说酶反应，产生可检测的信号。

6、权利要求5的方法，其中所说酶选自辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

7、权利要求6的方法，其中酶底物选自TMB(3,3',5,5'-四甲基联苯胺)、DAB(3,3'-二氨基联苯胺)、ABTS(2,2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))、AEC(3-氨基-9-乙基吡唑)、NBT(氮蓝四唑)、CN/DAB(4-氯萘酚/3,3'-二氨基联苯胺,四氢氯化物)、4-CN(4-氯-1-萘酚)。

8、权利要求7的方法，其中可检测信号为沉淀物，它粘附于所述第一类型细胞。

9、一种生产生物光盘的方法，此生物光盘用于检测标本中的不同细胞类型，该方法包括以下步骤：

提供具有中心和外缘的基质；

在基质的信息层上编码信息，所编码的信息可被一种光盘驱动器组件读取以控制光盘的旋转；

在中心和外缘之间的基质上形成靶区；

在靶区中应用一种活性层；

以及在靶区内沉积大量捕捉抗体，至少某些捕捉抗体粘附于活性层，因此固定在靶区内。

10、权利要求9的方法，它还包括的步骤是：形成一种流动沟，

它与靶区流体相通。

11、权利要求 10 的方法，其中大量捕捉抗体与不同类型细胞中的共同表面抗原具有亲和力。

12、权利要求 11 的方法，它还包括的步骤是：形成一种小室，它与流动沟流体相通，该小室具有入口。

13、一种应用生物光盘检测和定量一种或多种类型细胞的方法，该生物光盘是按照权利要求 12 生产的，此方法包括以下步骤：

通过入口将具有不同类型细胞的试验标本装入所述流动室，使试验标本与靶区内的所述大量捕捉抗体接触，所述不同类型细胞具有共同表面抗原；

使大量捕捉抗体与共同表面抗原结合，将这些不同类型细胞固定在靶区中；

以预定的速度和时间旋转生物光盘，以从靶区中除去未结合细胞；

提供至少一组信号抗体，其中每个抗体已粘附于指示剂，该指示剂对于此组是唯一的，每组信号抗体与靶区中所述不同类型细胞中的一种细胞类型具有亲和力；

通过入口将至少一组信号抗体装入流动沟中，使信号抗体与靶区内的不同类型细胞接触；

使至少一组信号抗体与其各自的细胞类型结合，由此标记各自的细胞类型；

冲洗靶区以除去未结合的信号抗体；

用一束电磁射线扫描靶区；

以及分析靶区返回的光束，由此测定未标记细胞的数目和经至少一组信号抗体所标记的细胞的数目。

14、一种检测和定量试验标本中细胞类型的方法，该标本具有不

同类型的细胞，此方法包括以下步骤：

提供一种生物光盘，该光盘包括实质为圆形的基质，它具有中心和外缘，在中心和外缘之间具有靶区，大量捕捉抗体结合于靶区内的基质上，以使这些大量捕捉抗体固定在靶区上，这些大量捕捉抗体对于不同类型细胞之间的共同抗原具有亲和力；

将试验标本沉积在靶区上；

使大量捕捉抗体与共同抗原结合，致使所述不同类型细胞固定在靶区中；

冲洗靶区以除去未结合细胞；

提供至少一组信号抗体，其中每个抗体已粘附在该组独特的指示剂上，每组信号抗体对固定在靶区中的不同类型细胞中的一种具有亲和力；

使至少一组信号抗体与其各自的细胞类型结合，以此标记各自细胞类型；

冲洗靶区以除去未结合的信号抗体；

以及用一束电磁射线扫描靶区，以此测定未标记细胞的数目和经至少一组信号抗体所标记的细胞的数目。

15、一种检测标本中不同细胞类型中一种细胞类型的生物光盘，它包括：

一种实质圆形的基质，它具有中心和外缘；

一种与基质相结合的活性层；

处于中心和外缘之间的靶区；

大量捕捉抗体，它们与活性层结合，这样使所述抗体固定在靶区中的活性层上。

16、一种按照权利要求 15 的生物光盘，其中活性层选自硝化纤维素、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚苯乙烯-共-马来酸酐和金。

17、一种按照权利要求 16 的生物光盘，其中基质包括与其联系的编码信息，该编码信息可被光盘驱动组件读取以控制该生物光盘的旋转。

18、一种按照权利要求 17 的生物光盘，它还包括在基质表面上形成的反射层。

19、一种按照权利要求 18 的生物光盘，它包括一种与靶区流体相通的流动沟和一种与流体沟流体相通的入口。

20、一种按照权利要求 19 的生物光盘，它包括一种酶，其中当暴露于酶底物时，该酶产生一种信号，该信号可被电磁射线的入射光束检测。

21、一种按照权利要求 19 的生物光盘，其中大量捕捉抗体对细胞上的共同表面标记具有亲和力。

22、一种应用权利要求 21 的生物光盘对研究细胞类型进行鉴别和定量的方法，该方法包括以下步骤：

提供含有研究细胞类型和非靶细胞类型的标本，这两种细胞类型均具有所说共同表面标记，非靶细胞类型还具有唯一的表面标记；

提供粘附于抗体的标记剂，它对非靶细胞类型上的唯一表面标记具有亲和力；

将标记剂与该标本混合；

使标记剂与非靶细胞类型上的所说唯一表面标记结合，以此阻断非靶细胞类型上的所说共同表面标记，防止非靶细胞类型与靶区中的大量捕捉抗体结合；

通过入口将该标本装入流动沟，使该标本与靶区中的捕捉抗体接触；

使捕捉抗体与研究细胞类型上的共同表面标记结合；
以预定的速度和时间旋转该生物光盘以除去靶区中未结合的非靶细胞；
以及用一束电磁射线扫描靶区，测定靶区中研究细胞类型的数目。

23、一种按照权利要求 22 的方法，其中该标本是包括淋巴细胞和单核细胞的单个核细胞。

24、一种按照权利要求 23 的方法，其中共同表面标记为 CD4 抗原。

25、一种按照权利要求 24 的方法，其中唯一表面标记为 CD14 抗原。

26、一种鉴别和定量不同细胞类型的方法，该方法应用按照权利要求 12 生产的生物光盘，它包括以下步骤：

提供含有不同细胞类型的标本，这些细胞类型具有所说共同表面抗原，它们包括具有第一种表面标记的第一种细胞类型、具有第二种表面标记的第二种细胞类型和具有第三种表面标记的第三种细胞类型；

通过入口将该标本装入流动沟，使该标本与靶区内的大量捕捉抗体接触；

使大量捕捉抗体与共同表面抗原结合，将这些不同细胞类型固定在靶区中；

以预定的速度和时间旋转生物光盘除去靶区中未结合的细胞；

提供含有不同类型指示剂的标记溶液，这些不同类型指示剂包括已粘附于第一种信号抗体的第一种指示剂，该信号抗体对第一种表面标记具有亲和力；已粘附于第二种信号抗体的第二种指示剂，该信号抗体对第二种表面标记具有亲和力；已粘附于第三种信号抗体的第三种指示剂，该信号抗体对第三种表面标记具有亲和力；

通过入口将该标志溶液装入流动沟中，使指示剂与固定在靶区中的细胞接触；

使第一种信号抗体与靶区中第一种细胞类型上的第一种表面标记结合，以此用第一种指示剂标记第一种细胞类型；

使第二种信号抗体与靶区中第二种细胞类型上的第二种表面标记结合，以此用第二种指示剂标记第二种细胞类型；

使第三种信号抗体与靶区中第三种细胞类型上的第三种表面标记结合，以此用第三种指示剂标记第三种细胞类型；

以预定的速度和时间旋转该生物光盘以除去靶区中未结合的指示剂；

以及用一束电磁射线扫描靶区，以此测定第一种指示剂标记的细胞数目、第二种指示剂标记的细胞数目和第三种指示剂标记的细胞数目。

27、一种按照权利要求 26 的方法，其中该标本为单个核细胞。

28、一种按照权利要求 27 的方法，其中共同表面抗原为 CD45 抗原。

29、一种按照权利要求 28 的方法，其中大量捕捉抗体为抗 CD45 抗体。

30、一种按照权利要求 29 的方法，其中第一种细胞类型为淋巴细胞。

31、一种按照权利要求 30 的方法，其中第一种细胞类型上的第一种表面标记选自 CD3、CD19 和 CD56 抗原。

32、一种按照权利要求 31 的方法，其中第一种信号抗体选自抗

CD3 抗体、抗 CD19 抗体和抗 CD56 抗体。

33、一种按照权利要求 29 的方法，其中第二种细胞类型为单核细胞。

34、一种按照权利要求 33 的方法，其中第二种细胞类型上的第二种表面标记为 CD14 抗原。

35、一种按照权利要求 34 的方法，其中第二种信号抗体为抗 CD14 抗体。

36、一种按照权利要求 29 的方法，其中第三种细胞类型为嗜酸粒细胞。

37、一种按照权利要求 36 的方法，其中第三种细胞类型上的第三种表面标记为 CD116 抗原。

38、一种按照权利要求 37 的方法，其中第三种信号抗体为抗 CD116 抗体。

39、一种检测和定量试验标本中靶细胞的方法，此方法包括以下步骤：

提供一种生物光盘，该光盘包括实质为圆形的基质，它具有中心和外缘，与该基质结合的活性层，在中心和外缘之间具有靶区，至少一种捕捉抗体结合于该活性层，这样使该捕捉抗体固定在靶区的活性层上，该捕捉抗体对所说靶细胞具有亲和力；

将试验标本沉积在靶区上；

使试验标本中的任何靶细胞均可与所说捕捉抗体结合；

冲洗靶区以除去未结合细胞；

提供大量信号抗体，每个信号抗体具有与结合剂结合的一种亲和剂；

使该信号抗体与具有可被信号抗体识别的抗原的任何靶细胞结合，以此标记这些靶细胞；

冲洗靶区以除去未结合的信号抗体；

提供大量指示剂，每种指示剂具有一种和多种结合剂；

使所说指示剂与靶区中结合了靶细胞的所有信号抗体结合；

冲洗靶区以除去未结合的指示剂；

以及用一束电磁射线扫描靶区，并分析返回光束，以此测定经标记的细胞和未标记的细胞的数目。

40、一种按照权利要求 39 的方法，其中指示剂为一种小珠，它具有可被生物光盘读取器检测的物理性能。

41、一种按照权利要求 40 的方法，其中物理性能选自颜色、大小、纹理、反射性、吸光率、质量、荧光性、磷光性和磁性。

42、一种按照权利要求 39 的方法，其中指示剂为酶。

43、一种按照权利要求 42 的方法，它还包括的步骤是：将至少一种酶底物沉积在靶区上，该酶底物可与所说酶反应以产生可检测的信号。

44、一种按照权利要求 39 的方法，其中亲和剂为生物素。

45、一种按照权利要求 42 的方法，其中该酶缀合有一种结合剂，该结合剂可与所说亲和剂结合。

46、一种按照权利要求 45 的方法，其中结合剂选自链酶亲和素和

中性链亲和素。

47、一种按照权利要求 42 的方法，其中酶选自辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶。

48、一种按照权利要求 43 的方法，其中酶底物选自 TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺)、DAB(3, 3'-二氨基联苯胺)、ABTS(2, 2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))、AEC(3-氨基-9-乙基吡唑)、NBT(氮蓝四唑)、CN/DAB(4-氯萘酚/3, 3'-二氨基联苯胺, 四氢氯化物)和 4-CN(4-氯-1-萘酚)。

49、一种按照权利要求 48 的方法，其中可被检测的信号为沉淀物，它粘附于靶细胞。

50、一种按照权利要求 39 的方法，其中靶细胞选自白细胞、癌细胞、细菌、病毒、单细胞生物、组织的细胞和器官的细胞。

51、一种检测和定量靶细胞的方法，此方法包括以下步骤：

提供一种生物光盘，该光盘包括实质为圆形的基质，它具有中心和外缘，在中心和外缘之间具有靶区，一种亲和剂结合于靶区内的基质，这样使该亲和剂固定在靶区中；

提供含有靶细胞的标本，该靶细胞具有表面标记；

将指示剂与标本混合，该指示剂已粘附了捕捉抗体和结合剂，该捕捉抗体对表面标记具有亲和力，该结合剂对亲和剂具有亲和力；

使捕捉抗体与靶细胞上的表面标记结合，以此用指示剂标记靶细胞；

将含标记靶细胞的标本沉积在靶区上；

使粘附指示剂的结合剂与亲和剂结合，以此将靶细胞固定在靶区中；

冲洗靶区以除去未结合细胞；
以及用一束电磁射线扫描靶区，以此测定经指示剂标记的细胞的数目。

52、一种按照权利要求 51 的方法，其中靶细胞选自白细胞、癌细胞、细菌、病毒、单细胞生物、组织的细胞和器官的细胞。

53、一种按照权利要求 52 的方法，其中亲和剂为生物素。

54、一种按照权利要求 52 的方法，其中结合剂选自链酶亲和素和中性链亲和素。

用于不同类型细胞检测和定量的方法和 装置以及生物光盘在该检测和定量中的应用

相关申请的交叉参考

本申请要求获得美国临时申请 No. 60/451,587 的优先权，该临时申请是 2003 年 3 月 3 日提交的，将其整体附在这里作为参考。

发明背景

1、发明领域

本发明大体上涉及细胞测定，特别涉及在生物光盘上进行的细胞测定。更明确的是，本发明涉及包括白细胞的细胞分类计数的方法和装置，以及生物光盘在进行这种细胞计数中的应用，下面所述根据最佳实施模式进行的特殊实施方式对这些都不构成限制。

2、相关技术的讨论

大量研究和诊断工作需要从细胞混合物中分离特定细胞，并进行分析。特别是此来源可为血液、脑脊液、骨髓、肿瘤均浆、淋巴组织等。

在诊断、治疗和确定患者健康状况的随访中应用血细胞计数。全血细胞计数 (CBC) 是一组试验，包括血红蛋白、红细胞压积、红细胞平均血红蛋白量、红细胞平均血红蛋白浓度、红细胞平均容量、血小板计数和白细胞计数。血细胞计数是对全血每立方毫米的红细胞和白细胞进行计数。

白细胞计数(WBC, 白细胞)是标准血样中白细胞的总数。正常健康人中, 白细胞计数一般为4000-10800个/微升(μl)。诸如锻炼、紧张和疾病可影响这些值。WBC升高可提示感染、白血病或组织损伤。如果白细胞下降到1000个/微升以下, 发生感染的危险则增大。

白细胞分类试验所收集的信息超过白细胞计数本身所能获得的信息。白细胞分类计数用于评价新发可疑感染或发热(即使CBC正常)、怀疑存在与异常相关的疾病、异常白细胞计数、疑似白血病、其他异常, 诸如嗜酸细胞增多症、单核细胞增多症和嗜碱粒细胞增多症。在重度白血病情况下可能反复检测白细胞或白细胞分类(例如在药物治疗后)。在治疗过程中, 例如化疗或放疗, 血细胞计数在确定该治疗消灭癌细胞同时是否还消耗了健康血细胞是非常重要的。

通过计算机化细胞计数仪器可测定白细胞分类计数。此机器测定总计数和五种主要类型白细胞的百分数。在正常个体中, 大部分为中性粒细胞(50%), 其次是淋巴细胞(20-40%), 接着是单核细胞(2-9%), 然后是少量嗜酸粒细胞(1-4%)和嗜碱粒细胞(0.5-2%)。

在淋巴细胞种类内, 还有淋巴细胞和亚型细胞。例如, 淋巴细胞可宽泛地分为T细胞(源于胸腺的淋巴细胞)和B细胞(相当于法氏囊的淋巴细胞), 它们主要分别负责细胞介导免疫和体液免疫。尽管形态学特征已用于白细胞内部的分类, 但仅靠形态学是不足以鉴别淋巴细胞亚型的许多功能。为了区别不同功能的淋巴细胞, 已经开发了许多技术, 包括玫瑰花结法、免疫荧光显微镜检查、酶组化检查和最近的单克隆抗体分析。通过表面标记而区别T细胞, 表面标记包括它们表面的两种糖蛋白CD4和CD8(CD4+T细胞和CD8+T细胞)。CD4+辅助T细胞与抗体介导免疫有关。它们与B细胞呈递的抗原结合。结果是促进分泌抗原物质抗体的血浆细胞克隆的发展。T细胞对于细胞介导免疫也是必需的。CD4+细胞与抗原呈递细胞(APC)呈递的抗原结

合，抗原呈递细胞例如为吞噬性巨噬细胞和树突状细胞。然后这种 T 细胞释放淋巴因子，此淋巴因子可将其他细胞吸引至该区域。结果是发生炎症，试图屏蔽 (wall off) 和破坏抗原物质的细胞和分子积聚。

CD8+、细胞毒/抑制型细胞分泌分子，这些分子破坏它们所结合的细胞。如果靶细胞感染病毒，则这种功能非常重要，因为在该细胞可释放能感染其他细胞的大量新病毒前，它通常已被破坏。

HIV 和 AIDS

人免疫缺陷病毒是一种逆转录病毒，它对 CD4+T 细胞具有高度亲和力，因此 CD4+T 细胞是该病毒的有效靶细胞。获得性免疫缺陷综合症 (AIDS) 生动而悲剧性地说明 CD4+ T 细胞在免疫中的重要性。人免疫缺陷病毒 (HIV) 与 CD4 分子结合，由此侵入并感染 CD4+ T 细胞。随着疾病的进展，CD4+ T 细胞的数量下降到正常范围约 1000/微升 (μl) 以下。一种解释是患者 CD8+ T 细胞不间断的工作以破坏受感染的 CD4+ T 细胞。

当血液中 CD4+ T 细胞的数目低于 400/微升，患者引发免疫反应的能力急剧下降。不仅患者对侵入机体的病原体变得超易感，而且对正常寄生于人体组织而没有危害的微生物，尤其是细菌也变得超易感。最终患者死于机会性感染，诸如念珠菌病、巨细胞病毒感染、单纯疱疹病毒感染、卡氏肺囊虫病、肺炎、弓形体病、肺结核等。

CD4+ T 细胞和 CD8+ T 细胞数目以及 CD4+ T 细胞/CD8+ T 细胞比率的估计用于评价免疫受损疾病患者的免疫状况。例如，AIDS 患者显示出 CD4+ T 细胞在免疫中的重要性。随着疾病的进展，CD4+ T 细胞数目下降到正常范围约 1000 个/ μl 以下。因为患者 CD8+ T 细胞破坏感染的 CD4+ T 细胞。未受感染的 CD4+ T 细胞可能经受凋亡。因此，

CD4+ T 细胞与 CD8+ T 细胞的比率成为该疾病进展的诊断标志。美国公共卫生局建议所有感染者每 3-6 个月监测一次 CD4+ T 细胞水平（美国 600 个实验室中每年进行 4 千万次检测）。

除了 CD4 和 CD8 外，还有很多其他细胞表面抗原（例如 CD3、CD16、CD19、CD45、CD56），它们可用于鉴定淋巴细胞的亚型。通过抗体技术检测这些细胞表面抗原的能力为诊断病理学增加了新的内容，而且各种技术可用于造血免疫疾病（例如 AIDS、白血病和淋巴瘤）免疫表型的研究。常规微量免疫测定法诸如放射免疫测定法（RIA）、酶免疫测定法（EIA）、荧光免疫测定法（FIA），它们应用同位素、酶或荧光物质测定相应分析物的存在与否。

白血病免疫表型鉴定

白血病中的表面标志有助于鉴别用于诊断和判断预后的肿瘤谱系。综合性白血病表型鉴定从回顾临床病史和形态学开始，并为每个病例选择一组标志。在大部分病例中，谱系可被区分为 T 细胞、B 细胞或髓细胞，而且可进行诊断或鉴别诊断。

白血病表型鉴定的目的是鉴别瘤形成过程的细胞类型。这种表型鉴定应当描述细胞谱系和成熟水平的概况，以此有助于白血病或淋巴瘤的分类。另外，这种表型鉴定应当利于判定此细胞群是正常还是异常，而且也利于在标本中检测前面所述细胞群，以监测疾病的缓解、发展或复发。

在血液或骨髓标本中进行白血病免疫表型鉴定，但是也可应用其他体液或组织。可应用经 RBC 溶解法或诸如菲可泛影钠的密度梯度分离法获得的白细胞。可能的话，在处理前检查白细胞总计数和分类，并对细胞浓度做相应地调节。

淋巴瘤免疫表型鉴定

淋巴瘤中的表面标志有助于鉴别用于诊断和判断预后的肿瘤谱系。综合性白血病/淋巴瘤表型鉴定从回顾临床病史和形态学开始，并为每个病例选择一组标志。在大部分病例中，谱系可被区分为 T 细胞、B 细胞或髓细胞，并进行诊断或鉴别诊断。

淋巴瘤表型鉴定的目的是鉴别瘤形成过程的细胞类型。这种表型鉴定应当描述细胞谱系和成熟水平的概况，以此有助于淋巴瘤的分类。另外，这种表型鉴定应当利于判定此细胞群是正常还是异常，而且也利于在标本中检测前面所述细胞群，以监测疾病的缓解、发展或复发。

检查全血细胞计数（包括白细胞计数）。血细胞计数是该疾病对治疗反应的重要指标。这些计数对于掌握药物治疗或放射疗法的效果也是重要的。血液中正常白细胞计数约为 4000-11000/立方毫米。如果 WBC 总计数超过 11000/mm³，它称为白细胞增多，这是机体对感染的一种正常反应。血细胞计数有助于确定药物是否起作用。通常通过昂贵的电子计算器做细胞计数，例如 FACS 扫描仪，进行这种检测需要专业技术。每种细胞类型的模型显示是否存在淋巴瘤和淋巴瘤的类型。

单克隆抗体板

尽管在某些情况下应用单色免疫荧光法就已足够，但许多实验室应用多色免疫荧光法。常规包括的抗体为 CD2、CD3、CD5、CD10、CD11c、CD14、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD45、CD103、FMC7、重链、κ链和λ链。如果临床或形态学特征提示“T”或“NK”淋巴细胞疾病，则还将检查下面附加的联合抗体：CD3/CD4/CD8、CD7/CD5/HLA-DR、CD25/CD2/CD3、CD16/CD56/CD19、CD57/CD8/CD3、TCR α-β/δ-γ/CD3。

通过抗体技术检测细胞相关抗原的能力为诊断病理学增加了新的内容。各种技术可用于造血免疫疾病免疫表型的研究。但是，用于许多疾病的全局检测方法中，需要进一步发展应用抗体抗原反应的免疫测定方法，这些疾病包括基于病毒的疾病，诸如获得性免疫缺陷综合症和 T 细胞白血病，以及各种癌症。本发明的测定方法和生物光盘系统可用于实现这种免疫测定，本领域专业技术人员都会清楚地认识到这一点。

常用微量免疫测定法，诸如放射免疫测定法（RIA）、酶免疫测定法（EIA）和荧光免疫测定法（FIA），它们应用同位素、酶或荧光物质，以检测各自相应抗体或抗原的存在与否，这些抗体或抗原与同位素、酶或荧光物质发生特异反应。但是，上述方法存在局限性和缺点。RIA 需要特殊设备、预防、有限的半衰期和各种其他因素。酶和荧光物质用作标记物的方法通过测定着色和发光而测定，这些方法需要敏感复杂的仪器以测定热或荧光反应，而且还需要数个冲洗步骤除去过量、未结合、未反应的试剂。另外，将上述检测方法应用于细胞，特别是淋巴细胞和癌细胞及类似标本，需要改进高效制备、检测和分析的技术。

根据特定用于细胞表面抗原的荧光抗体而发展的有力工具是荧光激活细胞分选技术（FACS）。这是非常可靠、快速而敏感的方法。流式细胞术是最实用的方法，它是自动并可定量的。标本对流式细胞分析最重要的需求是，该标本是在单分散悬浮液中，并用荧光标记物标记所需细胞。但是，它是价格很高的实验，而且整个系统需要临床分析实验室中训练有素的技术员和昂贵的仪器进行处理。单克隆抗体用作不连续的探针，流式细胞术用于大量细胞的客观定量分析。

另外，根本的缺点是曾被分析的细胞不能再用于重复分析或其他

研究，例如罕见细胞的显微镜检查。已经开发了许多可替代的技术，它们与流式细胞术相比有优势，也有缺点，而且全都存在各自特殊的问题。

表面标记分析是重要的实验室方法，它在白血病、淋巴瘤和免疫缺陷疾病的研究中特别有用。基于抗体的微量排列技术当然是最新的技术，特别是在临床诊断中，它用于标本中特异抗原的鉴别，这些标本包括血液和组织标本。大多数诊断性实验要求仅仅测定有限组的分析物（诸如在癌症、白血病、淋巴瘤、甲状腺疾病中）。因此，微型化技术仅需要很小量的血样，而且节省实验室人员的时间和花费，而且在单次实验中同时测定所有临床相关参数，由于其性价比、工作效率和简易性，这些对于医院实验室和卫生所机构来说可能很有吸引力。

我们开发了一种简便、价廉的系统，用于细胞的分析、测定和定量，特别是用于血细胞，还包括感染血液和诸如 CSF 的其他生物液体的寄生虫和病原体，该系统可替代现有技术用于细胞计数的系统和方法。还开发了相关信息和信号处理方法和软件，以鉴别各种血细胞、寄生虫和病原体。

与现有方法和系统相比，我们开发了一种简便、微型、超敏感、价廉的细胞分析系统。这种系统应用生物光盘，相关检测组件，以及信息和信号处理方法和软件。

发明总结

微量技术很有价值，特别是在鉴定细胞类型、寄生虫、病原体和其他生物物质的临床诊断中。本发明采用微量技术在生物光盘上进行全血的白细胞分类计数检测。另外，本发明涉及血细胞成像、白细胞分类计数测定和相关处理方法和软件。

可采用两种方法进行本实验或测定。第一种方法基于生物光盘上特殊沟中血细胞的光成像原理。将7微升左右全血注射进光盘上特殊设计的沟中。用细胞识别软件分析影像,该软件可鉴别这些不同的白细胞亚型,并产生白细胞分类计数。第二种方法基于特异细胞捕捉,它应用针对特异细胞的细胞特异抗体,在这种特殊情况中为针对于淋巴细胞(CD4、CD2、CD19)、单核细胞(CD14)、嗜酸粒细胞(CD15)等的抗体。在生物光盘内的固体表面安装/附着这些白细胞亚型特异抗体,该生物光盘包括一种流动室。

为了提高细胞类型鉴定和定量的特异性,可用特异抗体涂敷的微粒或小珠标记捕捉的细胞,这些特异抗体或者是针对所研究细胞类型的,或者是针对珠-细胞复合物中不需要或污染细胞的。此方法可区分捕捉区中的特异性靶细胞和污染细胞。下面结合附图18-24对小珠在鉴定细胞中的应用做进一步详细描述。

使用生物光盘驱动组件旋转此光盘,读取和处理此光盘上存储的编码信息,并分析此生物光盘流动室中的细胞捕捉区。此生物光盘驱动器具有转动该生物光盘的马达,控制光盘旋转速率的控制器,处理光盘反馈信号的处理器,以及分析被处理信号的分析器。旋转速率是可变的,而且通过旋转速度和旋转时间均可紧密地控制旋转速率。还可应用生物光盘将信息写在生物光盘上,这既可在流动室和靶区的实验材料被驱动器的读取光束询问,并被分析器分析前进行,也可在其后进行。该生物光盘可包括编码信息,它用于控制光盘的旋转;提供处理信息,该信息是特别针对于所要实施的细胞免疫测定类型的;以及有监测器上显示与生物驱动相关的结果。

通常细胞分类计数方案,特别是白细胞分类计数方案被开发为CD、CD-R、DVD或DVD-R格式,这些格式的修改版本,以及它们的替

代格式。驱动器的读取或询问光束检测分析标本中不同的细胞和珠-细胞复合物，并产生影像，可用细胞分类计数软件分析所产生的影像。

为完成这些繁琐费力的细胞计数测定，显微镜方法或复杂的细胞计数器是必需的。本发明方法应用生物光盘及其组件。可通过细胞识别软件程序产生和分析在分析室中游离的各种细胞类型和珠-细胞复合物的光学影像或者通过特异抗体捕捉方法捕捉的那些细胞的光学影像，此程序通过光扫描特性可鉴别血液或其他体液中的各种细胞成分。本方法在分析前不需要对标本进行任何处理，例如为细胞染色、RBC消除和其他繁杂的方案。这些方法包括显微镜分析或细胞检测，它使用一种光盘读取器，该读取器具有顶部检测器、底部检测器、事件计数器或者细胞计数器，下面结合附图对它们进行详细描述。

为了进一步提高本发明细胞分类计数方法的准确度和精确度，可标记不同的细胞群。例如，这些标记可包括微球体、荧光标记抗体和酶缀合抗体。例如，与标本和/或指示分子的标记相关其他方面的详细描述公开在共同转让的同时待审美国专利申请 No. 10/121,281 中，其名称为“Multi-Parameter Assays Including Analysis Discs and Methods Relating Thereto”，它是 2002 年 4 月 11 日提交的，将其整体附在这里作为参考。

本发明或其不同的方面可易于在许多光盘、测定和系统中实现，或者适应于这些光盘、测定和系统，它们公开于下列共同转让和同时待审的专利申请中：美国专利申请 No. 09/378,878，名称为“Methods and Apparatus for Analyzing Operational and Non-operational Data Acquired from Optical Discs”，提交于 1999 年 8 月 23 日；美国临时专利申请 No. 60/150,288，名称为“Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers”，提交于 1999 年 8 月 23 日；美国专利

申请 No. 09/421,870, 名称为 “Trackable Optical Discs with Concurrently Readable Analyte Material”, 提交于 1999 年 10 月 26 日; 美国专利申请 No. 09/643,106, 名称为 “Methods and Apparatus for Optical Disc Data Acquisition Using Physical Synchronization Markers”, 提交于 2000 年 8 月 21 日; 美国专利申请 No. 09/999,274, 名称为 “Optical Biodiscs with Reflective Layers”, 提交于 2001 年 11 月 15 日; 美国专利申请 No. 09/988,728, 名称为 “Methods and Apparatus for Detecting and Quantifying Lymphocytes with Optical Biodiscs”, 提交于 2001 年 11 月 16 日; 美国专利申请 No. 09/988,850, 名称为 “Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-discs”, 提交于 2001 年 11 月 19 日; 美国专利申请 No. 09/989,684, 名称为 “Apparatus and Methods for Separating Agglutinants and Disperse Particles”, 提交于 2001 年 11 月 20 日; 美国专利申请 No. 09/997,741, 名称为 “Dual Bead Assays Including Optical Biodiscs and Methods Relating Thereto”, 提交于 2001 年 11 月 27 日; 美国专利申请 No. 09/997,895, 名称为 “Apparatus and Methods for Separating Components of Particulate Suspension”, 提交于 2001 年 11 月 30 日; 美国专利申请 No. 10/005,313, 名称为 “Optical Discs for Measuring Analytes”, 提交于 2001 年 12 月 7 日; 美国专利申请 No. 10/006,371, 名称为 “Methods for Detecting Analytes Using Optical Discs and Optical Disc Readers”, 提交于 2001 年 12 月 10 日; 美国专利申请 No. 10/006,620, 名称为 “Multiple Data Layer Optical Discs for Detecting Analytes”, 提交于 2001 年 12 月 10 日; 美国专利申请 No. 10/006,619, 名称为 “Optical Disc Assemblies for Performing Assays”, 提交于 2001 年 12 月 10 日; 美国专利申请 No. 10/020,140, 名称为 “Detection System For Disk-Based Laboratory and Improved Optical Bio-Disc Including Same”, 提交于 2001 年 12 月 14 日; 美国专利申请 No. 10/035,836, 名称为 “Surface Assembly for

Immobilizing DNA Capture Probes and Bead-Based Assay Including Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto”，提交于2001年12月21日；美国专利申请 No. 10/038,297，名称为“Dual Bead Assays Including Covalent Linkages for Improved Specificity and Related Optical Analysis Discs”，提交于2002年1月4日；美国专利申请 No. 10/043,688，名称为“Optical Disc Analysis System Including Related Methods for Biological and Medical Imaging”，提交于2002年1月10日；美国临时申请 No. 60/348,767，名称为“Optical Disc Analysis System Including Related Signal Processing Methods and Software”，提交于2002年1月14日；美国专利申请 No. 10/086,941，名称为“Methods for DNA Conjugation Onto Solid Phase Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems”，提交于2002年2月26日；美国专利申请 No. 10/087,549，名称为“Methods for Decreasing Non-Specific Binding of Beads in Dual Bead Assays Including Related Optical Biodiscs and Disc Drive Systems”，提交于2002年2月28日；以及美国专利申请 No. 10/099,256，名称为“Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus”，提交于2002年3月14日。

所有这些申请整体附在这里作为参考。它们完全重复在这里，因此提供了支持性的背景技术和公开。

附图简述

通过下面对本发明优选实施方式的描述，可清楚本发明的其它目的，以及它具有的其他特征和由此带来的优势，这些实施方式显示在附图中，始终用相同的参考数字表示相同的组件，其中：

附图 1 是用图表示的本发明生物光盘系统；

附图 2 是本发明所用的反射生物光盘的分解透视图；

附图 3 是附图 2 所示光盘的上平面图；

附图 4 是附图 2 所示光盘的透视图，并通过剖面图显示该光盘的不同层；

附图 5 是本发明所用的透射生物光盘的分解透视图；

附图 6 是附图 5 所示光盘的透视图，并通过剖面图显示该光盘半反射层的功能性方面；

附图 7 是显示金薄膜的厚度和透射之间关系的图解；

附图 8 是附图 5 所示光盘的上平面图；

附图 9 是附图 5 所示光盘的透视图，并通过剖面图显示该光盘的不同层，它包括附图 6 所示的半反射层类型；

附图 10 是更详细描述附图 1 系统的透视方框图；

附图 11 是部分横切面图，该图与附图 2、3 和 4 所示反射生物光盘的半径垂直，它显示其中形成的流动沟；

附图 12 是部分横切面图，该图与附图 5、8 和 9 所示透射生物光盘的半径垂直，它显示其中形成的流动沟和上部检测器；

附图 13 是附图 2、3 和 4 所示反射生物光盘的部分纵切面图，它显示其中形成的抖动槽；

附图 14 是附图 5、8 和 9 所示透射生物光盘的部分纵切面图，它显示其中形成的抖动槽和上部检测器；

附图 15 是与附图 11 相似的图，它显示反射光盘的整个厚度及其初始折射性能；

附图 16 是与附图 12 相似的图，它显示透射光盘的整个厚度及其初始折射性能；

附图 17 是一种流程图，它显示应用梯度细胞分离方法分离白细胞，以及应用本发明的方法分析血样；

附图 18 是用小珠标记细胞的图解；

附图 19 本发明实施方式的图解，它显示应用小珠，以防止不需要细胞与捕捉剂在生物光盘上结合；

附图 20A 和 20B 是本发明另一种实施方式的图解，它显示鉴别标本中不同类型细胞的方法步骤，该方法应用不同小珠特异性标记此生物光盘上固定的靶细胞；

附图 21 是应用小珠捕捉所研究的微生物，并用生物光盘检测其存在与否的图解；

附图 22 是应用小珠标记不需要细胞的图解；

附图 23A 是结合在复合物中的 1 微米指示器小珠和 5 微米细胞的图解，该复合物位于本发明生物光盘的磁道上；

附图 23B 是源自附图 23A 复合物的一系列特征扫描图，它应用了本发明光驱动器的检测信号；

附图 24 是未粘附小珠、未标记细胞和小珠-细胞复合物或标记细胞的显微图；以及

附图 25A 和 25B 是本发明另一种实施方式的图解，它显示从靶细胞中区分不需要细胞的方法步骤，该方法是应用酶鉴别不需要细胞。

本发明描述

本发明涉及光盘驱动系统、生物光盘以及细胞分类和定量测定。更特别的是，本发明涉及用于细胞定量的生物标本中各种细胞群的分类方法，例如包括白细胞，而且还涉及生物光盘在进行这种细胞定量中的应用，下面所述根据最佳实施模式进行的特殊实施方式对这些都不构成限制。下面对本发明这些方面的每一个都做进一步的详细描述。

驱动系统和相关光盘

附图 1 是本发明生物光盘 110 的透视图，该光盘用于进行此处公开的细胞分类计数。与该生物光盘 110 一起显示的是光盘驱动器 112 和监视器 114。

附图 2 是生物光盘 110 一种实施方式的主要结构部件的分解透视图。附图 2 是可用于本发明的生物光盘 110 反射区（此后称为“反射

光盘”) 的实例。主要结构部件包括盖部分 116、粘合体 118 和基质 120。盖部分 116 包括一个或多个入口 122 以及一个或多个出口 124。盖部分 116 可由聚碳酸酯形成, 而且优选在其底部涂敷反射面 146(如附图 4 中更详细的描述), 可从附图 2 的透视图看到此底部。在优选实施方式中, 触发器标记 126 包括在反射层 142 的表面上(如附图 4 中更详细的描述)。触发器标记 126 可包括在生物光盘所有 3 层中的透明窗口, 不透明区, 或者用信息编码的反射或半反射区, 它将数据传送至处理器 166, 如附图 10 所示, 此处理器转而与询问或入射光束 152 的操作功能相互作用, 如附图 6 和 10。附图 2 所示的第二种部件为粘合体 118, 其中具有流体回路 128 或 U 型沟。冲压或切削薄膜, 除去塑料膜而形成所示形状, 由此形成流体回路 128。每个流体回路 128 包括流动沟 130 和返回沟 132。附图 2 所示的某些流体回路 128 包括混合室 134。举例说明了两种不同类型的混合室 134。第一种是对称混合室 136, 它是对着流动沟 130 对称形成的。第二种是偏置混合室 138。如图所示, 此偏置混合室 138 是在流动沟 130 的一边形成的。附图 2 所述的第三种部件是基质 120, 它包括靶区或捕捉区 140。此基质 120 优选由聚碳酸酯构成, 并具有涂敷在其上面的反射层 142, 见附图 4。通过除去所示形状的反射层 142 或者任意所需形状的反射层而形成靶区 140。可替代的是, 通过屏蔽技术可形成靶区 140, 此屏蔽技术包括在应用反射层 142 前屏蔽靶区 140 区域。此反射层 142 可由金属形成, 诸如铝或金。

附图 3 是附图 2 所述生物光盘 110 的上平面图, 其在盖部分 116 上的反射层 142 显示为透明的, 以露出位于光盘内部的流体回路 128、靶区 140 和触发器标记 126。

附图 4 是按照本发明一种实施方式的反射区型生物光盘 110 放大的透视图。此图包括其各层的一部分, 切开它们是为了显示各种成分、层、基质、涂层或膜的部分截面图。附图 4 显示基质 120 涂敷着反射

层 142。在反射层 142 上敷有活性层 144。在优选实施方式中，该活性层 144 可由聚苯乙烯构成。可替代的是，可应用聚碳酸酯、金、活化玻璃、改性玻璃或者改性聚苯乙烯，例如聚苯乙烯-共-马来酸酐。另外还可用水凝胶。可替代的是，此实施方式中所述的其他，塑料粘合体 118 敷在活性层 144 上。塑料粘合体 118 的暴露面显示切削或冲压的 U 形形状，该形状构成流体回路 128。该生物光盘反射区实施方式中最后的成分结构层是盖部分 116。盖部分 116 包括其底部上的反射面 146。此反射面 146 可由金属构成，诸如铝或金。

附图 5 是本发明透射型生物光盘 110 的主要结构部件的放大透视图。该透射型生物光盘 110 的主要结构部件同样包括盖部分 116、粘合体 118 和基质 120 层。该盖部分 116 包括一个或多个入口 122 以及一个或多个出口 124。此盖部分 116 可由聚碳酸酯层构成。任选的触发器标记 126 可包括在薄的半反射层 143 表面上，附图 6 和 9 对其进行了最佳的描述。触发器标记 126 可包括在生物光盘所有三层中的透明窗，不透明区，或者编码有信息的反射或半反射区，它将数据传送至处理器 166，见附图 10，该处理器转而与询问光束 152 的操作功能相互作用，询问光束见附图 6 和 10。

附图 5 所示的第二种部件是粘合体 118，其中具有流体回路 128 或 U 形沟。通过冲压或切削薄膜，除去塑料膜，而形成所示形状，由此形成流体回路 128。每个流体回路 128 包括流动沟 130 和返回沟 132。附图 5 所示的某些流体回路 128 包括混合室 134。描述了两种不同类型的混合室 134。第一种为对称混合室 136，它对着流动沟 130 对称地形成。第二种为偏置混合室 138。如图所示，此偏置混合室 138 在流动沟 130 的一边形成。

附图 5 所示的第三种部件是基质 120，它可包括靶区或捕捉区 140。基质 120 优选由聚碳酸酯构成，而且具有薄的半反射层 143，该层敷

在其上面，见附图 6。与附图 5 和 6 所示光盘 110 的基质 120 相关的半反射层 143 明显薄于附图 2、3 和 4 所示反射光盘 110 的基质 120 上的反射层 142。较薄的半反射层 143 使询问光束 152 的某些透射通过附图 12 所示透射光盘的结构层。该薄的半反射层 143 可由金属构成，诸如铝或金。

附图 6 是附图 5 所示生物光盘 110 透射实施方式的基质 120 和半反射层 143 放大的透视图。该薄的半反射层 143 可由金属构成，诸如铝或金。在优选实施方式中，附图 5 和 6 所示透射光盘的薄半反射层 143 厚度大约为 $100-300\text{\AA}$ ，而且不超过 400\AA 。这种半反射层 143 较薄可使部分入射或询问光束 152 穿透并通过半反射层 143，而被顶部检测器 158 检测到，见附图 10，同时某些光线被反射或沿着入射光程返回。如下所示，表 1 列出金薄膜的反射和透射特性，它与该薄膜的厚度相关。金薄膜层的厚度大于 800\AA 时，它完全反射。而光透射过金薄膜的阈密度约为 400\AA 。

表 1

金薄膜反射和透射 (绝对值)			
厚度 (埃)	厚度 (nm)	反射系数	透射系数
0	0	0.0505	0.9495
50	5	0.1683	0.7709
100	10	0.3981	0.5169
150	15	0.5873	0.3264
200	20	0.7142	0.2057
250	25	0.7959	0.1314
300	30	0.8488	0.0851
350	35	0.8836	0.0557
400	40	0.9067	0.0368
450	45	0.9222	0.0244
500	50	0.9328	0.0163
550	55	0.9399	0.0109
600	60	0.9448	0.0073
650	65	0.9482	0.0049
700	70	0.9505	0.0033
750	75	0.9520	0.0022
800	80	0.9531	0.0015

除了表 1 外, 附图 7 提供了薄的半反射层 143 反射和透射性能反比关系的图解, 此是基于金的厚度。附图 7 所示图中所用的反射和透射值为绝对值。

附图 8 是附图 5 和 6 所示透射型生物光盘 110 的上平面图, 其透明盖部分 116 可露出流体沟、触发器标记 126 和靶区 140, 它们均位于该光盘的内部。

附图9是本发明透射光盘实施方式的生物光盘110放大的透视图。该光盘110显示为各层切开的一部分，以显示各成分、层、基质、涂层或膜的部分截面图。附图9显示透射光盘的格式，它具有透明盖部分116，基质120上薄的半反射层143，以及触发器标记126。触发器标记126包括不透明的材料，它置于盖的上面部分。可替代的是，触发器标记126可由透明而不反射的窗构成，它刻蚀在光盘的薄反射层143上，或者可由任何标记构成，该标记可吸收或不反射来自触发器检测器160的信号，见附图10。附图9还显示，靶区140是按照所示形状或可替代的任何所需形状标记指定的区域而形成的。可在基质120或基质120底下部分（该光盘下）的薄半反射层143上进行标记，以显示靶区140。可替代的是，可通过屏蔽技术形成靶区140，该屏蔽技术包括除了靶区140外，屏蔽整个薄半反射层143。在此实施方式中，通过将印记经丝网印制在薄半反射层143上而形成靶区140。将活性层144敷在此薄半反射层143上。在优选实施方式中，该活性层144是厚度为40-200 μm 的2%聚苯乙烯层。可替代的是，也可使用聚碳酸酯、金、活化玻璃、改性玻璃或改性聚苯乙烯，诸如聚苯乙烯-共-马来酸酐。另外，还可使用水凝胶。如此实施方式所述，将塑料粘合体118敷在活性层144上。此塑料粘合体118显露的部分表明切削或冲压U形形状，它们形成流体回路128。本发明生物光盘110透射实施方式的最后成分结构层是透明而不反射的盖部分116，它包括入口122和出口124。

附图10是透视方框图，它描述光组件148，产生入射光束或询问光束152的光源150，返回光束154，以及透射光束156。在附图4所示的反射生物光盘情况中，返回光束154是从该生物光盘110盖部分116的反射面146被反射。在这种生物光盘110的反射实施方式中，用底部检测器157检测反射光束154，并分析信号剂的存在与否。另一方面，在此透射生物光盘格式中，通过顶部检测器158检测透射光束156，而且也可分析信号剂的存在与否。在此透射实施方式中，光

检测器可用作顶部检测器 158。

附图 10 还显示了硬件触发器结构,它包括此光盘上的触发器标记 126 和触发器检测器 160。反射生物光盘(附图 4)和透射生物光盘(附图 9)中均应用此硬件触发结构。仅在询问光束 152 在各自靶区 140 上时,此触发结构才允许处理器 166 收集数据。而且,在透射生物光盘系统中,还可应用软件触发器。软件触发器应用底部检测器,当询问光束 152 一照在各自靶区 140 的边缘上时,软件触发器则以信号通知处理器 166 收集数据。附图 10 还显示了驱动马达 162 和控制器 164,它控制生物光盘 110 的旋转。附图 10 还显示了处理器 166 和分析器 168,它们可任选地处理返回光束 154 和与透射生物光盘相关的透射光束 156。

附图 11 是本发明生物光盘 110 反射光盘实施方式的部分横截面图。附图 11 显示基质 120 和反射层 142。如上所述,反射层 142 可由诸如铝、金或其他适宜的反射材料构成。在此实施方式中,基质 120 的上表面是光滑的。附图 11 还显示活性层 144,它敷在反射层 142 上。如附图 11 所示,除去反射层 142 的一块或一部分区域而在所需位置形成靶区 140,或者可替代的是,在敷反射层 142 之前屏蔽所需区域而形成该靶区 140。附图 11 还显示,塑料粘合体 118 敷在活性层 144 上。附图 11 还显示盖部分 116 及其结合的反射面 146。因此,当将盖部分 116 敷在包括所需切削形状的塑料粘合体 118 上时,可形成流动沟 130。如附图 11 中箭头所示,入射光束 152 的光程起始是从光盘 110 下面导向基质 120。然后入射光束聚焦在邻近反射层 142 的一点。因为此聚焦发生在靶区 140,此处没有反射层 142,所以入射继续沿着光程通过活性层 144,并进入流动沟 130。然后入射光束 152 继续向上,横贯流动沟,最后入射在反射面 146 上。在此点,入射光束 152 沿着入射光程返回或反射回来,因此形成返回光束 154。

附图 12 本发明生物光盘 110 透射实施方式的部分截面图。附图 12 显示透射光盘格式，它具有透明盖部分 116 和在基质 120 上薄的半反射层 143。附图 12 还显示活性层 144，它敷在薄的半反射层 143 上。在优选实施方式中，透射光盘薄的半反射层 143 由一种金属构成，诸如铝或金，其厚度约为 100-300 埃，而且不超过 400 埃。这种薄的半反射层 143 使光源 150 来的一部分入射或询问光束 152，见附图 10，穿透并向上通过该光盘，它们将被顶部检测器 158 检测，同时某些光线反射回去，其光程与入射光束相同，但方向相反。在这种安排中，返回或反射光束 154 从半反射层 143 反射。因此在这种方式中，返回光束 154 不进入流动沟 130。反射光或返回光束 154 可根据预记录的信息磁道用于跟踪入射光束 152，该信息磁道是形成在半反射层 143 中或其上，这些将在附图 13 和 14 中进行更详细描述。在附图 12 所示的光盘实施方式中，设定的靶区 140 可有可无。通过在基质 120 上薄的半反射层 143 上进行直接标记而形成靶区 140。可应用丝网法或任何相当的方法进行这些标记。在可替代的实施方式中，不用任何物理标记来确定靶区，有效的流动沟 130 用作有限的靶区，其研究特征得到检查。

附图 13 是横切本发明生物光盘 110 反射光盘实施方式磁道的截面图。此图是沿着光盘的半径和流动沟进行纵切形成的。附图 13 包括基质 120 和反射层 142。在此实施方式中，基质 120 包括一系列凹槽 170。此凹槽 170 为螺旋形，它从该光盘的中心伸展至外缘。设计凹槽 170 是为了使询问光束 152 可沿着此光盘上的螺旋凹槽 170 行进。这种类型的凹槽 170 称为“抖动凹槽”。具有波动或波浪状侧壁的底部形成凹槽 170，隆起或抬起的部分将螺旋状的相邻凹槽 170 分隔开。在此实施方式中反射层 142 敷在凹槽 170 上，如图所示，反射层实际上是保角的。附图 13 还显示活性层 144 敷在反射层 142 上。如附图 13 所示，在所需部位除去一块或一部分反射层 142 而形成靶区 140，或者在敷反射层 142 之前就屏蔽所需区域而形成靶区 140。附图 13 还显示，

塑料粘合体 118 敷在活性层 144 上。附图 13 还显示盖部分 116 及其相联的反射面 146。因此，当将盖部分 116 敷在包括所需切削形状的塑料粘合体 118 上时，就形成流动沟 130。

附图 14 是通过本发明生物光盘 110 透射光盘实施方式磁道的截面图，如附图 12 所示。此图是沿着光盘的半径和流动沟进行纵切形成的。附图 14 显示基质 120 和薄半反射层 143。这种薄半反射层 143 使光源 150 来的入射或询问光束 152 穿透通过该光盘，并被顶部检测器 158 检测，同时某些光线以返回光束 154 的形式反射回去。通过最小量的反射光确定该薄半反射层 143 的厚度，此反射光是光盘读取器所需要的，以保持其跟踪能力。此实施方式中的基质 120 象附图 13 中所述一样，包括一系列凹槽 170。此实施方式中的凹槽 170 也优选为螺旋形式，它从光盘的中心附近伸展至外缘。设计凹槽 170 是为了使询问光束 152 可沿着此螺旋行进。附图 14 还显示了活性层 144，它敷在薄半反射层 143 上。附图 14 还显示，塑料粘合体 118 敷在活性层 144 上。附图 14 还显示盖部分 116，它没有反射面 146。因此，当此盖敷在包括所需切削形状的塑料粘合体 118 上时，则形成流动沟 130，而且在基本上不反射的情况下允许一部分入射光束 152 通过。

附图 15 与附图 11 类似，它显示反射光盘的总厚度及其起始折射性能。附图 16 与附图 12 类似，它显示透射光盘的总厚度及其起始折射性能。附图 15 和 16 中看不到凹槽 170，因为这些截面是沿着凹槽 170 切的。附图 15 和 16 显示存在狭窄的流动沟 130，它在这些实施方式中与凹槽 170 垂直。附图 13、14、15 和 16 显示各个反射和透射光盘的总厚度。在这些特征中，显示出入射光束 152 起始与具有折射性能的基质 120 相互作用，如图所示基质 120 改变入射光束的光程，使该光束 152 聚焦在反射层 142 上或者薄半反射层 143 上。

从全血中分离研究细胞

附图 17 形象化的流程图显示血样的制备分析,以应用上述生物光盘系统进行簇指定 (CD) 标记测定。在步骤 1 中,将血液 (4-8 ml) 直接采集至 4 或 8 ml Becton Dickinson CPT Vacutainer™ 及抗凝剂中,此抗凝剂诸如 EDTA、酸性枸橼酸盐葡萄糖 (ACD) 或肝素。本发明另一种实施方式相当的步骤中,将抗凝剂中 3ml 血液叠加至含分离梯度 176 的试管 172 中,此分离梯度 176 诸如为 Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics, St. Louis, 密苏里州)。不管怎样,优选在采集的 2 小时内使用血样 174。室温下,在防生物危害离心机中以 1500-1800RCF (2800 rpm),将叠加了血样 174 的含分离梯度 176 的试管 172 离心 25 分钟,此离心机带有水平马达和摆桶。离心后,除去血浆层 178 (步骤 2),在单个核细胞 (MNC) 部分 180 上留下大约 2mm 血浆。收集 MNC 层 180,用磷酸缓冲盐水 (PBS) 冲洗。在室温下以 300 RCF (1200rpm) 离心 10 分钟,除去残留的血小板,使细胞成团。除去上清液,通过轻轻敲打试管使 MNC 团 180 再悬浮在 PBS 中。用 PBS 再悬浮最后的细胞团 180 (步骤 3),并稀释,根据生物光盘 110 流动沟 130 的厚度使细胞计数达 10000-30000/ μ l。可替代的是,应用生物活性剂可从全血中分离 T 淋巴细胞,此生物活性剂可使不需要细胞凝集和沉淀。生物活性剂的非限制性实例为 PrepaCyte (BioE, St. Paul, 明尼苏达州)。PrepaCyte 通过选择性地除去粒细胞、血小板、单核细胞、B 细胞 (达 80%)、自然杀伤 (NK) 细胞 (达 80%),可从全血中分离 T 淋巴细胞。分离 T 淋巴细胞方法应用于基于光盘的细胞测定,与这些方法相关的其他方面的更多详细描述,例如公开于共同转让的美国临时专利申请 No. 60/382,327,名称为 "Methods for Isolation of Lymphocytes for Use in Differential Cell Counting and Use of Optical Bio-disc for Performing Same",它提交于 2002 年 5 月 22 日,将它整个附在这里作为参考。

细胞鉴别、检测和定量

借助涂敷单一抗体的表面进行细胞捕捉，这（几乎）导致含有这种特定标记的所有细胞被捕捉。如果目标是捕捉特殊的细胞类型，例如 T 辅助细胞，那么应用单一标记可能是不够的。因此诸如流式细胞术的技术应用多种标记，而且含有所有选择标记的细胞才被计数。T 辅助细胞和单核细胞均带有 CD4 抗体，因此通过第二种标记来区分它们，此第二种标记诸如为 CD3（只有 CD4 细胞含有）或 CD19（只有单核细胞含有）。这给应用单一抗体进行表面捕捉的方法带来特有的难题，因为可能无法避免捕捉到单核细胞。

尽管避免次级细胞群与抗体涂敷表面结合可能是困难的，但通过用与第二种抗体结合的信号剂可对它们进行标记，由此可区别它们。例如，这种信号剂可为小珠或染料，它吸收预定波长的光。此预定波长优选为光盘读取器 112 的入射光束 152 的波长，或其附近的波长。因此，尽管两种细胞群都被捕捉在生物光盘的表面上，但是可通过上面附图 10 所述的测定系统对它们进行鉴别。

作为实例，将 CD4 抗体沉积在盘 110 表面上。它正常情况下捕捉 CD4+单核细胞和 CD4+T 辅助细胞两种亚群。但是，在标本制备过程中，引入 IR 吸收小珠，它涂敷了 CD19 抗体，这样造成这些小珠涂在单核细胞上，因为单核细胞是 CD19+细胞，而 T 辅助细胞不是。这样有两种作用。第一，通过位阻，它减小了单核细胞与 CD4 捕捉区结合的可能性。第二，结合在盘捕捉区上的其余单核细胞对于 IR 激光束来说，它比 CD4+T 辅助细胞更暗，因此可在单核细胞和 T 辅助细胞间进行鉴别。

特别是，当应用硬件计数（根据应用阈值的 S 曲线识别）通过本发明生物光盘系统进行计数时，所得单核细胞吸收应当足以将它们的 S 曲线振幅降低至此阈值以下。同样，如果用 IR 染料鉴别此单核细胞，

则它们较暗，而且可被单独计数。关于硬件计数软件和 S 曲线识别的详细描述公开于共同转让同时待审和相关的美国临时专利申请 No. 60/356,982、60/372,007 和 60/408,227，它们的名称为“Bio-Disc and Bio-Drive Analyser System Including Methods Relating Thereto”，分别提交于 2002 年 2 月 13 日、2002 年 4 月 11 日和 2002 年 9 月 4 日。将它们整个附在这里作为参考，即使完全重复。

可应用双标记的这些方法，即将可辨别的目标或物质粘附在细胞表面，或者涂敷这些细胞表面以减小上述结合可能性，这些方法可与许多类型的细胞测定系统联合使用。例如，CD8 抗体捕捉 NK 细胞，可用 CD56 标记此 NK 细胞（在此情况下，它是非独有的）；或者可对粒细胞进行特殊标记，以便在涂敷 CD45 抗体的捕捉区或靶区 140 将它们与淋巴细胞区分开。不需要应用染料，这样仅涂敷相关的细胞：它们还可被非特异性地吸收至细胞内部结构中，诸如细胞核。如果通过固定法使它们稳定，并以已知的浓度将它们预混合在标本中，则这些细胞可用作捕捉区上的校准器单元。

原则上也可应用多重标记。例如，一种信号剂可为特异抗体上的染料，该抗体与细胞上的标记结合。第二种信号剂可为另一种特异抗体上的微粒或小珠，该抗体可与另一种标记结合。如果存在第二种标记，这些小珠将与细胞结合，而且阻止该细胞与捕捉区的捕捉剂结合。如果仅具有第一种标记，那么这些细胞发生结合，但可与细胞上的单个标记区分开。

阳性鉴别也是可能的。例如，当用本发明光盘读取器成像时，粘附 IR 小珠的细胞或者用 IR 染料染色的细胞暗于其他细胞，这些细胞可直接被计数。例如，用于即时细胞计数的分离式检测器配置中，可应用合计信号 (A+B) 检测较暗细胞，而不是应用差信号 (A-B)。涉及用于即时细胞计数的分离式检测器和 S 曲线识别的详细描述公开于

共同转让同时待审的美国专利申请 No. 10/279,677, 其名称为“Segmented Area Detector for Biodrive and Methods Relating Thereto”, 提交于2002年10月24日, 将其整个附在这里作为参考。下面对应用多重细胞标记, 从含有不同类型细胞的标本中鉴别一种或多种细胞作进一步详细描述。

应用微粒鉴别和分离靶细胞

应用上述光盘系统, 通过成像分析确定淋巴细胞亚群的免疫表型和定量, 可能需要次级闸门或参数, 以提高细胞鉴别的准确度。本发明涉及应用指示器或信号剂, 它们诸如为物理性质不同的小珠或微粒, 具有或不具有功能化表面, 它可与至少一种信号抗体缀合, 该信号抗体可与靶细胞或不需要细胞特异性结合, 由此形成珠-细胞复合物, 该复合物可被光盘读取器检测到。此信号抗体可通过交联剂与指示器或信号剂缀合。交联剂包括受体-配体相互作用或者结合剂-亲和剂相互作用。例如, 结合剂可为链酶亲和素或中性链亲和素。例如, 亲和剂可为生物素。可替代的是, 本领域专业技术人员都会清楚具有改性功能化表面的小珠可用于将信号抗体共价缀合到小珠表面上, 并促使该小珠或指示剂剂紧密粘附于研究细胞。还可能应用不同物理性质的小珠分离和/或鉴别靶细胞, 这些物理性质诸如为大小、颜色、纹理、反射性、吸光率、质量、荧光性、磷光和/或磁性。此过程可通过不同的特征更好地鉴别靶细胞, 此不同的特征至少是粘附于该细胞表面的一种类型指示剂或小珠, 下面将结合附图 20A 和 20B 对这些进行描述。

两种或多种特异细胞类型在细胞膜上具有与其他亚群或细胞类型相同的抗原表位, 诸如 T 细胞和单核细胞在细胞膜上具有 CD4 抗原, 所有成熟 T 细胞上具有 CD3, 以及所有白细胞上具有 CD45, 此时则发生错误。这样导致仅靠应用共同捕捉抗体, 而未应用标记或标志以及未应用测定细胞形态学和大小的能力来鉴别细胞类型出现困难, 此捕

捉抗体诸如为抗 CD4 或抗 CD5。

如下所述，通过将小珠用作指示剂标记细胞，可以将靶 CD4+T 细胞与不需要的 CD+单核细胞鉴别开，它们是用抗 CD4 抗体捕捉剂捕捉的。通过标志或标记单核细胞上的抗原性表位，而不是 CD4 表位，可达到此目的。例如，可用粘附 CD14 抗体的小珠标记单核细胞，此 CD14 抗体对于单核细胞来说是特异性的。一旦用抗 CD14 小珠标记这些单核细胞，则可用生物光盘系统进行成像分析，将一种或多种小珠与其 CD14 表面抗原结合的 CD4+单核细胞（如以下描述的图 23）与无小珠的 CD4+T 细胞鉴别开，这是因为在 CD4+T 细胞表面没有 CD14 抗原。因此，如附图 18 所示，可鉴别 MNC 或血样中的 CD4 T 细胞和单核细胞。

附图 18 显示了淋巴细胞 200 和单核细胞 202，它们的表面上均具有 CD4 抗原。单核细胞表面上还具有 CD14 抗原，而淋巴细胞没有。因此，通过应用粘附信号抗体 206 的小珠 204 对单核细胞进行标记，可将其与淋巴细胞鉴别开，此处信号抗体 206 为抗 CD14 抗体。此小珠优选足够大，以便可被光盘读取器 112 的询问光束 152（附图 10）检测到，但小于所标记的细胞。此小珠直径大小优选约为 0.5-5 μm 。因此当将指示器复合物 208 置于含有 CD4+淋巴细胞 200 和 CD4+单核细胞 202 的细胞悬浮液中时，指示器复合物 208 仅与单核细胞 202 结合。当将这些 CD4+细胞捕捉在粘附抗 CD4 捕捉抗体的捕捉位点 140 上，并用光盘读取器 112（附图 1）分析时，可通过所得特征扫描图鉴别这些细胞，下面结合附图 23A 和 23B 对此进行描述。

附图 19 显示了本发明的实施方式，该实施方式描述应用小珠分离或除去血样中不需要细胞。应用小珠封阻不需要细胞表面的抗原，以此阻止这些封阻细胞与光盘上的捕捉探针结合，通过这样除去不需要细胞或污染细胞。在附图 19 所示的实施例 1 中，处理标本 210，以便进行分析，该标本中含有各种类型的细胞 212，包括 CD4+细胞、CD8+细

胞和自然杀伤 (NK) 细胞。所有这些细胞 212 在其表面均具有 CD3 标记。CD4⁺和 CD8⁺细胞是所研究的靶细胞 216, 而 NK 细胞 214 是不需要细胞。应用共同抗体抗 CD3 捕捉靶细胞。NK 细胞在其表面含有 CD56 抗原, 而标本中的其他细胞没有。如图所示, 将抗体涂敷小珠 208 与标本 210 混合。此小珠 208 涂敷了抗 CD56 抗体。然后将小珠 208 与 NK 细胞 214 表面的 CD56 抗原结合, 花结或包绕 NK 细胞。然后将含有 CD4⁺、CD8⁺和花结的 NK 细胞 214 的测定溶液装入所述生物光盘 110 的流体室 130 中。然后 CD4⁺和 CD8⁺靶细胞 216 与光盘表面的抗 CD3 捕捉剂 217 结合。NK 细胞 214 表面的小珠通过封阻 NK 细胞上的 CD3 抗原表位, 而阻止 NK 细胞 214 与抗 CD3 捕捉抗体 217 结合。然后按照所述可通过冲洗或离心除去未结合的 NK 细胞。然后应用生物光盘系统 (附图 10) 分析已捕捉的细胞, 即扫描通过靶区的入射光束 152 (附图 10), 该入射光束与捕捉细胞相互作用, 并分析返回光束 154, 以确定标本中靶细胞的相对量。可替代的是, 如果使用透射型光盘, 那么分析该透射光束 156 (附图 10) 可确定捕捉细胞的数目。附图 19 所示的生物光盘包括上面附图 2 至 9 所述的光盘成分, 它们包括流动沟 130、盖部分 116、反射面 156、粘合体 118、活性层 144、反射层 142 和基质 120。如上所述, 也可使用透射型生物光盘 (附图 8 和 9), 其中除去反射层 146, 而层 142 是半反射性的, 它可使入射光束 152 通过该光盘, 如附图 10、12 和 16 所述, 应用顶部检测器 158 可对透射光束 156 进行检测和分析。

在上面附图 19 所述方法的替代实施方式中, 将更大、更重和/或磁性小珠粘附在不需要细胞上。例如, 靶细胞可为 CD4⁺T 细胞, 而不需要细胞为 CD4⁺单核细胞。此实施例中所用的捕捉抗体可为抗 CD4 抗原。因为这两种类型的细胞在其细胞表面均具有 CD4 抗原, 而单核细胞具有特有的 CD14 表面标记, 所以应用磁性小珠可从标本中除去单核细胞, 此磁性小珠的质量大于相同大小且涂敷抗 CD14 抗体的非磁性小珠。质量越大, 通过离心可越容易除去不需要的小珠。在将标本装入

光盘之前或之后，可将这些小珠与标本溶液混合。然后使这些小珠与单核细胞上的表面 CD14 抗原结合。因为磁性颗粒相对较重，应用生物光盘驱动器 112，通过离心可将这些单核细胞从研究细胞中分离出来，或者结合磁性分离器或磁光光盘系统，应用小珠的磁性分离这些单核细胞。例如，与磁光光盘系统相关的其他方面的详细描述公开于共同转让同时待审的美国专利申请 No. 10/099,256，名称为“Dual Bead Assays Using Cleavable Spacers and/or Ligation to Improve Specificity and Sensitivity Including Related Methods and Apparatus”，提交于 2002 年 3 月 14 日；美国专利申请 No. 10/099,266，名称为“Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets”，提交于 2002 年 3 月 14 日；和美国专利申请 No. 10/307,263，名称为“Magneto-Optical Bio-Discs and Systems Including Related Methods”，提交于 2002 年 11 月 27 日，将它们整个附在这里作为参考。

接着附图 20A 和 20B 显示了本发明一种可替代实施方式的非限制性实施例，它是与附图 19 结合起来描述的。在此实施方式中，应用具有不同物理性质的小珠，通过共同表面标记，鉴别一种或多种靶区或捕捉区中捕捉的不同细胞类型。如附图 20A 所示，应用移液器 218，将含有研究细胞 216 的标本 210 装入生物光盘 110。在此实施例中，白细胞是研究细胞，它们可被光盘表面上的抗 CD45 捕捉抗体 217 捕捉。捕捉抗体 217 与共同 CD45 白细胞表面抗原结合。按照附图 20B，然后用移液器 218，将不同组的小珠 220 装入光盘 110 中。每组小珠具有不同物理特性和粘附其上的不同抗体，优选可用光盘读取器 112 鉴别其物理特性。粘附于每组小珠的抗体与研究细胞上的特异抗原具有亲和力，例如一组透明小珠 221 具有标记淋巴细胞 224 的 CD3、CD19 或 CD56 的抗体，一组不透明小珠 223 具有粘附其上以标记单核细胞 222

的 CD14 的抗体, 以及一组半透明小珠 225 具有标记嗜酸性粒细胞 226 的 CD116 的抗体。给予足够时间使小珠与它们各自靶细胞结合, 然后通过离心或冲洗将未结合小珠 227 除去。然后应用光盘读取器, 根据结合其上小珠的物理特性, 可对不同类型细胞进行定量。因为在此实施例中应用透射型光盘, 按照所述, 应用生物光盘系统 (附图 10) 分析小珠-细胞复合物, 其过程是, 扫描穿过靶区的与小珠-细胞复合物相互作用的入射光束 152 (附图 10); 应用光检测器检测透射光束 156; 分析被检测光束, 确定标本中各种类型靶细胞的相对量。在上述分析中也可应用反射型光盘。

可替代的是, 一组或多组小珠或指示器可与同一类型细胞上的不同表面抗原结合。然后通过测定这些细胞上是否结合一种或多种类型指示器, 而对这类细胞进行定量, 并与其他类型细胞进行鉴别。因为鉴别单一类型细胞应用了多种参数, 所以这样为检测增加了特异性。与应用光盘检测和定量不同类型细胞的方法相关的其他方面的详细描述, 例如公开于共同转让的美国临时专利申请 No. 60/382, 944, 名称为 “Methods and Apparatus for Use in Detection and Quantitation of Cell Populations and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same”, 提交于 2002 年 5 月 24 日, 将它整个附在这里作为参考。

还可应用微粒或小珠标志或标记组织细胞及诸如病毒和细菌等微生物, 以便于鉴别、分类和定量。附图 21 的实施例显示应用捕捉小珠 204 标记大肠杆菌 234, 该捕捉小珠 204 具有至少一种生物素 232 和缀合其上的捕捉抗体 206。抗体 206 对大肠杆菌上的抗原具有特异亲和力。如图所述, 当将这些小珠与含有大肠杆菌的标本混合时, 则形成小珠-细菌复合物 237。然后应用链酶亲和素 236, 将复合物 237 和未结合小珠 204 捕捉在光盘的捕捉区上。然后按照上面所述分析小珠-细菌复合物是否存在及其量。

下一个附图是附图 22，它显示应用具有抗体的小珠标记不需要细胞，该抗体与不需要细胞上的抗原具有亲和力。因此不标记靶细胞，而用上述生物光盘系统对它们进行分离或定量。

附图 23A 是结合在小珠-细胞复合物中的 1 微米指示器小珠和 5 微米细胞的图解，该复合物对着本发明生物光盘的 A-E 磁道。

下面附图 23B 显示 A-E 磁道的一系列特征扫描图，它们是应用本发明光盘驱动器的检测信号而由附图 23A 的小珠和细胞形成。这些图形代表所检测的透射光束 156。如图所示，1 微米指示器小珠 190 的特征与 5 微米细胞 192 的特征明显不同，以致于可检测小珠-细胞复合物，并将它与单个细胞区分开。当所检测返回光束通过小珠或细胞时，扫描信号明显偏离该返回光束被称为一个事件。来自这些指示器和细胞比较接近的事件表明小珠-细胞复合物的存在与否。如图所示，这些指示器和细胞的扫描图彼此相似，表明它们是在一个复合物中。

可替代的是，可使用其他检测方法，以鉴别和定量细胞悬浮液中的不同类型细胞。例如，指示器小珠可是荧光或磷光的。可在荧光或磷光型光盘读取器中进行这些指示器的检测。例如，其他信号检测方法描述于共同转让同时待审的美国专利申请 No. 10/008,156，名称为“Disc Drive System and Methods for Use with Bio-Discs”，提交于 2001 年 11 月 9 日，特意将其附在这里作为参考；2001 年 2 月 20 日提交的美国临时申请 Nos. 60/270,095 和 2001 年 5 月 18 日提交的美国临时申请 Nos. 60/292,108；以及上面提到的美国专利申请 No. 10/043,688，名称为“Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging”，提交于 2002 年 1 月 10 日。

附图 24 显示未粘附小珠 238、单个细胞 240 和小珠-细胞复合物

242 的显微照片。在此实验中所用的小珠是 $4.5\mu\text{m}$ 磁性小珠，它涂敷了抗 CD2 抗体。因此用这些小珠标志或标记具有 CD2 抗原的细胞，形成小珠-细胞复合物，而非 CD2+细胞仍保持为单个细胞。下面结合实施例 8 对此实验进行详细描述。

应用不溶解酶产物鉴别靶细胞

附图 25A 和 25B 显示本发明方法的另一种实施方式的图解，该实施方式是应用酶反应的可检测沉淀物，将不需要细胞与靶细胞鉴别开。附图 25 显示流体回路 130 内靶区 140 的放大图。对于本公开，本领域专业技术人员将会清楚地认识到，不论是反射型光盘还是透射型光盘都可用于此分析。在附图 25A 和 25B 所示的实施例中，将 CD4 捕捉抗体 244 沉积在生物光盘 110 的靶区或捕捉区 140 上（步骤 I）。在下一步的步骤 II 中，将含有单个核细胞（MNC）的标本引入靶区。然后含有 CD4 表面抗原的细胞在此靶区将与 CD4 捕捉抗体 244 结合。这些细胞包括 CD4+T 细胞和单核细胞。然后按照上面附图 19-21 所述，将未结合细胞冲洗掉，或者离心出靶区。如步骤 III 所示，除去未结合细胞后，将含有酶 248 的溶液引入靶区，其中此酶与 CD14 抗体 246 缀合。如图所示，因为只有单核细胞含有 CD14 抗原，所以缀合抗体的酶只与结合于靶区的单核细胞结合。然后冲洗此靶区，除去未结合酶或指示剂，并在步骤 IV 中将酶底物引入此靶区。一旦此底物与酶接触，则发生酶-底物反应 250，该反应产生可检测的产物 252，如步骤 V 所示。此可检测产物 252 优选为不溶解产物，它在细胞表面形成沉淀物 254，如步骤 VI 所示。然后用电磁射线 256 的询问光束扫描靶区，而且根据所用光盘类型，分析返回光束或透射光束，以确定沉淀物标志细胞是否存在。然后对标志或标记细胞以及未标志或未标记细胞进行定量。如附图 25B 所示，这需要进行 CD4+T 细胞和单核细胞的特异性检测、鉴别和定量。可用于此实施方式的酶包括，但不限于辣根过氧化物酶（HRP）和碱性磷酸酶（AP）。例如，可与这些酶结合使用的底

物可选自 TMB (3, 3', 5, 5'-四甲基联苯胺)、DAB (3, 3'-二氨基联苯胺)、ABTS (2, 2'-连氨基-双(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸))、AEC (3-氨基-9-乙基吡唑)、NBT (氮蓝四唑)、CN/DAB (4-氯萘酚/3, 3'-二氨基联苯胺, 四氢氯化物)、(4-CN)4-氯-1-萘酚和其他相容的底物, 这些底物可使酶发生催化反应, 而产生可被光盘读取器检测的产物。

实验详细描述

虽然通过附图已对本发明进行了详细地描述, 但在下面仍用某些实施例对本发明做进一步描述。

实施例 1

附图 17 显示标本制备、生物光盘应用和提供结果的流程图。下面实施例的细节, 诸如处理步骤的单个持续时间、旋转速率及其它细节, 都比附图 17 所述更为特别。然而, 本实施例的基本步骤与上面所述类似。

A. 包括基质制备和化学物质沉积的光盘生产

在此实施例中, 用空气喷枪除去所有尘粒, 而清洁反射光盘或透射光盘基质 120 (分别为附图 2 和 5)。应用旋转涂布器, 用异丙醇将该光盘清洗两遍。将 2% 聚苯乙烯旋转涂敷在光盘上, 获得整体都很厚的涂层。

然后沉积化学物质。一种实施方式包括三步沉积方案, 它孵育: a 链酶亲和素, 孵育 30 分钟; b 生物素化的第一种抗体, 孵育 60 分钟; 以及第二种捕捉抗体, 孵育 30 分钟。可在第一种物种 (例如羊) 中产生第一种抗体, 它是针对于第二种物种 (例如小鼠) 的免疫球蛋白 (例如 IgG、IgE、IgM)。在第二种物种中产生第二种捕捉抗体, 它针对

于特异性细胞表面抗原（例如 CD4、CD8）。在室温下的潮湿室中进行这些步骤，并在沉积之间应用冲洗和干燥步骤。

将 $1\mu\text{l}$ 含链酶亲和素的磷酸缓冲盐水，其比率为 $1\text{mg}/\text{ml}$ ，加在每个窗口上，并孵育 30 分钟。用蒸馏水将多余的链酶亲和素冲洗掉，并干燥光盘。结合等量生物素化的抗小鼠 IgG（在 PBS 中，浓度 $125\mu\text{g}/\text{ml}$ ）和活化右旋糖酐醛（ $200\mu\text{g}/\text{ml}$ ）。将右旋糖酐醛（DCHO）-生物素化抗小鼠 IgG 加在每个捕捉窗口的链酶亲和素上，并在冰箱中孵育 60 分钟或过夜。冲洗掉多余的试剂，旋转干燥此光盘。

B. 光盘装配

装配该光盘，它使用粘合层，此粘合层厚度例如可为 25、50 或 100 微米（附图 2 和 5 中的沟层 118），并具有冲压部分，诸如 U 形或“e-rad”沟以产生流体沟；还使用透明盖 116（附图 5，用于具有顶部检测器的透射光盘）或者具有反射层 142 的盖 116，此反射层位于捕捉区上（附图 2，用于具有底部检测器的反射光盘）。

在一种实施方式中，该光盘为前向抖动装置 FDL21:13707 或 FDL21:1270 CD-R 盘，它涂敷了 300nm 金作为编码信息层。在反射光盘上，通过已知的平版印刷技术，在反射层上蚀刻出椭圆形观察窗，大小为 $2\times 1\text{mm}$ 。在某些透射光盘的设计中，未蚀刻出单独的观察窗，而且整个光盘都是可利用的。在这种特殊的实施例中，由 Fraylock 粘合剂 DBL 201 Rev C 3M94661 形成沟层。此盖为透明光盘，它具有 48 个标本入口，每个入口的直径为 0.040 英寸，等距排列在 26mm 的半径上。应用 CD4/CD8 计数软件扫描和读取数据盘，速度为 4X，抽样率为 2.67MHz。

C. 光盘漏检

因为分析的是血液，所以可对该光盘进行漏检，首先确保原位带有标本的光盘在旋转过程中没有一个室被漏掉。用封阻剂填充每个沟，此封阻剂诸如为 StabilGuard 和 PBS-Tween。封阻持续至少 1 小时。光盘以 5000rpm 旋转 5 分钟，以进行漏检和检查光盘稳定性。漏检后，将光盘置于真空室中 24 小时。真空放置 24 小时后，将光盘放在真空袋中，并在使用前一直贮存在冰箱中。

D. 标本采集、制备和应用于光盘

下面涉及标本处理步骤，它们一般显示在附图 17A 中。例如应用 Becton Dickinson CPT Vacutainer，通过密度梯度离心方法纯化单个核细胞 (MNC)。直接将血液 (4-8 ml) 采集至 4 或 8 ml 含 EDTA 的 CPT Vacutainer 中。室温下，在防生物危害的离心机中，以 $1500-1800 \times g$ ，将这些试管离心 25 分钟，该离心机具有水平马达和吊桶。优选在采集的 2 小时内使用血液。离心后，除去单个核细胞部分上的血浆，在 MNC 层上仅保留约 2mm 血浆。收集 MNC，并用 PBS 冲洗。室温下以 $300 \times g$ 将细胞离心 10 分钟，使其成团。除去上清液，通过轻拍试管将含有 MNC 的小团再悬浮于 PBS 中。室温下以 $300 \times g$ 再进行一次冲洗，持续 10 分钟，以除去血小板。再悬浮最终的细胞团，使细胞计数为 10000 个/ μl 。将 $18\mu\text{l}$ MNC 引入一个或多个分析室或沟，在室温下孵育 15 分钟，该光盘保持静止。封闭这些沟。然后用光盘驱动器以 3000rpm 将光盘旋转 3-4 分钟。优选在 4X 速度和 2.67 MHz 的抽样率下用软件扫描读取该光盘。

如果不能立即处理血样，那么将 CPT 试管轻轻颠倒数次，则可将第一次离心后的单个核细胞再悬浮于血浆中，而且可将它在室温下贮存达 24 小时。在 24 小时内，可按照上述方法收集血浆中的细胞，并进行冲洗。

E. CD4/CD8 测定格式

本实施例的测定法是同属固体均相细胞捕捉测定法，它用于血样中 CD4+和 CD8+T 淋巴细胞群的绝对数和 CD4+和 CD8+淋巴细胞比率的快速测定。该试验是在包含于 CD-ROM 的小室内进行的，此试验测定 7 μ l 单个核细胞 (MNC) 中被捕捉区的特异性抗体捕捉的 CD4+、CD8+、CD2+、CD3+和 CD45+的细胞数，此单核细胞是从全血中分离的。此试验依据的原理是光盘上特殊位置的定位细胞捕捉。通过捕捉化学物质的定位应用，在光盘上建立几种特异性细胞捕捉区，这些捕捉化学物质的定位应用基于特殊血细胞表面抗原的单克隆抗体或多克隆抗体。一旦将 MNC 血液 (30000 个/ μ l) 充满小室，表达 CD4、CD8、CD2、CD3 和 CD45 抗原的细胞则被捕捉在该光盘的捕捉区中。还在条形码内加入规定的阴性对照区。

F. 盘上分析

将上面步骤 D 中制备的 MNC 细胞 (18 μ l, 于 PBS 中) 注射入光盘室中，并封闭此室的入口和出口。在室温下将该光盘孵育 15 分钟，然后用光驱中的 780nm 激光进行扫描，并用顶部检测器对上述捕捉区进行成像。

编码在光盘上的软件可指令驱动器自动执行下列过程：(a) 离心光盘，旋转除去一个或多个阶段的过量未结合细胞，(b) 成像特异性捕捉窗口，和 (c) 处理数据，包括对每个捕捉区的特异性捕捉细胞进行计数和产生 CD4/CD8 的比率 (或者通过程序确定此比率)。

在处理步骤中，该软件读取每个捕捉区的影像，并在遇到细胞时对它们进行标记。例如，测定 CD4+和 CD8+细胞的数目后，该软件计算

CD4+/CD8+细胞的比率，并显示 CD4+、CD8+、CD3+和 CD45+捕捉区中每微升全血的细胞绝对数和 CD4+/CD8+比率。从把光盘插入光驱到获得计数和比率，整个过程的时间约为 12 分钟。

G. 所用试剂

链酶亲和素(Sigma, cat. # S-4762): 加入去离子水, 形成 5 mg/ml 溶液, 等分并贮存在-30℃。使用时, 加入 Tris 缓冲液, 使终浓度为 1 mg/ml。

阳性对照品: CD45 (Sigma, Lot # 038H4892, cat # C7556)。贮存于 2-8℃。

次级捕捉抗体: 生物素化抗小鼠 IgG (产生于羊, Vector laboratories, lot # L0602, Catalog # BA-9200) 原液 1.5 mg/ml, 它在蒸馏水中制备。0.1 M PBS 中的 b-IgG 工作液 125µg/ml。贮存于 2-8℃。在-30℃可长期贮存。

活化右旋糖酐醛 (Pierce, lot # 97111761, cat # 1856167)。PBS 中的原液 5 mg/ml, 贮存于 2-8℃。

初级捕捉抗体: CD4 (DAKO, cat # M0716)、CD8 (DAKO, cat # M0707)、CD2 (DAKO, cat # M720)、CD45 (DAKO, cat # M0701)、CD14 (DAKO, cat # M825) 和 CD3 (DAKO, # M7193)。贮存于 2-8℃。

阴性对照品: 小鼠 IgG1 (DAKO, cat # X0931)。贮存于 2-8℃。

磷酸缓冲盐水 (PBS), pH 7.4 (Life Technologies/GIBCO BRL, cat. # 10010-023) 或者同等物。贮存于室温。

异丙醇，90-100%。

H. RBC 溶解方案

氯化铵溶解缓冲液

应当将 1 x 氯化铵溶解缓冲液的原料贮存于 2-8℃。它由 0.155M NH_4Cl 、10mM KHCO_3 和 0.1mM 乙二胺四乙酸二钠组成；pH 7.3 - 7.4。贮存于 2-8℃。使用前再取至室温下。

步骤

- 1、在每 100 μl 血液中加入 2ml 溶解缓冲液（优选在防生物危害的通风橱中进行此步骤）。
- 2、在室温下涡动和孵育 15 分钟。
- 3、应用防生物危害通风橱中的离心机，在室温下以 500 $\times g$ 将血液离心 5 分钟。
- 4、除去上清液，用含 2% FCS 或 FBS 的 PBS 冲洗细胞。离心细胞。
- 5、计算白细胞总数，使 WBC 终浓度为 10000 个/ μl ，以用于标本注射。

实施例 2

单个核细胞分离步骤

应用 Becton & Dickinson Vacutainer CPT (4 ml 的 BD 目录 # 362760, 8ml 的 BD 目录 # 362761) 细胞制备试管, 它含有枸橼酸钠。按照所有防生物危害预防措施, 在防生物危害通风橱中完成这些步骤。步骤如下:

1、将血液直接采集至 4 或 8ml 含 EDTA 的 CPT Vacutainer 中。如果血样已经是抗凝的, 则首先倒掉 Vacutainer 中的 EDTA, 然后再将 6-8 ml 血样倒入 CPT 试管中。

2、室温下, 在防生物危害离心机中以 $1500 - 1800 \times g$ 将此试管离心 25 分钟, 此离心机具有水平马达和吊桶。为了获得最好的结果, 应当在采集的两小时内离心血液。而离心晚于 2 小时的血液, 可使 MNC 数目减少, RBC 污染增多。

3、离心后, 保留 MNC 层上约 2mm 的血浆, 其他除去。收集, 并将发白的单个核细胞层转移至 15ml 锥形离心试管中。

4、将 10-15ml PBS 加入 MNC 层中, 通过颠倒离心试管数次, 轻轻混合这些细胞。

5、室温下在防生物危害离心机中以 $200 \times g$ 进行离心 10 分钟, 以此冲洗细胞。

6、除去上清液。轻拍试管而再悬浮这些细胞。

7、在 10ml PBS 中再冲洗一遍。室温下以 $200-300 \times g$ 离心 10 分钟, 以除去血小板。

8、除去上清液, 将小团再悬浮在 $50\mu\text{l}$ PBS 中。

9、测定该标本中的细胞计数。进行 CBC，或者将 2 μ l 细胞稀释至 18 μ l 台盼蓝，轻轻混合，并应用血细胞计数器进行细胞计数。使标本的终细胞计数为 10000 个/ μ l，以进行分析。

10、如果不能立即处理细胞，则通过将 CPT 试管轻轻颠倒数次，而将第一次离心后（上面步骤 2）的单个核细胞再悬浮于分离血浆中，室温下贮存至多 24 小时。24 小时内，收集血浆中的细胞，如上所述继续进行冲洗。

$$\text{总细胞计数}/\mu\text{l} = 25 \text{ 小平方中的细胞数目} \times 100.$$

实施例 3

应用 Histopaque-1077 分离全血中的 MNC

将 1 ml Histopaque-1077 放在 15ml 离心试管中，轻轻地将 1 ml 全血放在其上。然后室温下以 400 \times g 离心 30 分钟。用巴氏滴管（pasture pipette）小心地抽吸混合物，并将不透明界面转移至离心试管中。然后，将 10 ml PBS 加入离心试管中。然后以 250 \times g 将此溶液离心 10 分钟。倒出上清液，将细胞团再悬浮于 10.0 ml PBS 中，并以 250 \times g 将其旋转 10 分钟。然后将小团再悬浮于 10ml PBS 中，并以 250 \times g 进行旋转，以此将细胞再冲洗一遍。将终细胞团再悬浮于 0.5ml PBS 中。

实施例 4

用 Dynal 小珠分离 CD4+细胞

A. 材料

- 1、冷 PBS/2% FBS, pH 7.4
- 2、PBS/0.5% BSA, pH 7.4
- 3、CD4 阳性 Dynal 分离盒
- 4、Dynal MPC、Dynal 混合器、离心机、聚丙烯试管

B. 步骤

进行 CBC, 并测定每个细胞所需要的小珠数量 (4-10 个小珠/细胞)。将 1ml 冷 PBS/2% FBS 加入所需量的小珠中 (1×10^7 个小珠/72 μ l), 并再悬浮。将试管放在 Dynal MPC 中 30 秒, 移去上清液。将冲洗的小珠再悬浮至起始容积。将所需量的小珠加入细胞中。在设定为 11 的 Dynal 混合器中于 2-8 $^{\circ}$ C 下孵育 20 分钟。分离 Dynal MPC 中的花结细胞 2 分钟。移去上清液。在 PBS/2% FBS 中将这此花结细胞冲洗 4 遍。在 200-400 μ l PBS/2% FBS 中再悬浮此花结细胞。每 100 μ l 细胞悬浮液中加入 10 μ l Detach-a-Bead。在设定为 11 的 Dynal 混合器中于室温下孵育 60 分钟。分离 Dynal MPC 中的小珠 2 分钟。转移上清液并保存。在 500 μ l PBS/2% FBS 中将小珠冲洗 2-3 遍, 获得残余细胞。在 400 μ l PBS/0.5% BSA 中冲洗收集的细胞。

运行 CBC, 测定分离细胞的浓度。

实施例 5

光盘制备和化学物质沉积 (应用链酶亲和素)

A. 包括基质制备和化学物质沉积的光盘生产

在此实施例中, 用空气喷枪除去尘粒, 以清洁透射光盘基质。将此光盘安装在旋转涂布器中, 并用稳定的异丙醇流将其清洗两遍。然后, 将聚苯乙烯溶液均匀地涂敷在光盘上, 该聚苯乙烯溶液是将 2% 聚苯乙烯溶解在 310ml 甲苯和 65ml 异丙醇中获得的。

对于链酶亲和素沉积，在 PBS 中将链酶亲和素原液稀释至 1 mg/ml。应用手工针式沉积，将约 1 μ l 链酶亲和素沉积在光盘的每个捕捉区中。在潮湿室中将光盘孵育 30 分钟。然后，用去离子水洗去捕捉区多余的未结合链酶亲和素，并将该光盘旋转干燥。

对于第二抗体沉积，将活化右旋糖酐醛（PBS 中，200 μ g/ml）的新鲜溶液与等量 Vector IgG（PBS 中，125 μ g/ml）结合。应用手工针式沉积，将约 1 μ l IgG+DCHO 复合物沉积在光盘的每个捕捉区中（放置于链酶亲和素层上面）。在潮湿室中将光盘孵育 60 分钟。用去离子水洗去多余抗体，并将该光盘旋转干燥。

对于第一抗体，在 PBS 中将 DAKO CD4 稀释至 50 μ g/ml，在 PBS 中将 DAKO CD8 稀释至 25 μ g/ml，在 PBS 中将 DAKO CD45 稀释至 145 μ g/ml。应用手工针式敷料器，将约 1 μ l 各种第一抗体沉积在结合的第二抗体上面。然后在潮湿室中将光盘孵育 30 分钟。用 PBS 冲洗捕捉区，将多余未结合的抗体除去，并将光盘旋转干燥。

B. 光盘装配

所用盖光盘为透明光盘，它具有粘附其上的 Fraylock 粘合剂沟层。在此粘合剂上冲压出 4 个 U 形沟，它们成为流体回路。将此盖放在透射光盘基质上，使流动沟处于捕捉区上面。然后，通过光盘将它们压 8 遍，确保这些光盘保持在一起。

C. 光盘漏检、封阻

用 StableGuard 填充每个流动沟，孵育 1 小时。在孵育期间，在旋转涂布器中以 5000rpm 将光盘旋转 5 分钟。旋转后，对光盘沟进行漏检。然后从这些沟中吸出 StableGuard，并将光盘置于真空室的真空中过夜。第二天早晨，将光盘放在真空袋中，贮存于 4 $^{\circ}$ C 下。

实施例 6

生物光盘 CD4/CD8 比率与 FAC CD4/CD8 比率比较

A. 用 CPT 试管制备临床血样

将 3 ml 临床 EDTA 血样 (No. 29、30、31、32、33、34 和 35) 倒入单个 CPT 试管中, 该试管中的枸橼酸钠已除去。在室温下以 $1500 \times g$ 将这些试管离心 25 分钟。离心后, 抽去上部血浆, 即 0.5 cm 内的不透明 MNC 层。将剩余不透明 MNC 层移至洁净 15 ml 试管中, 并在每个试管中加入 12 ml PBS。

冲洗

然后以 $250 \times g$ 将细胞悬浮液离心 10 分钟。抽去上清液, 并将细胞再悬浮于 14ml PBS 中。再以 $250 \times g$ 将悬浮液离心 10 分钟。抽去上清液, 用 200-175 μ l PBS 再悬浮每个细胞小团。用血细胞计数器对这些细胞进行计数, 以此确定每个标本的细胞浓度。将每个标本的细胞终浓度调节至 30000 个/ μ l。

B. 生物光盘 CD4/CD8 比率与 FAC CD4/CD8 比率比较

应用 25 μ m 粘合剂沟, 按照与实施例 5 相似的方法制备光盘 (No. 27a、27b、27c、27d、27e、27f 和 28)。

按照下面表 2 所示, 将每个标本注射至相应的每个光盘中。30 分钟后, 以 3000rpm 将该光盘离心 5 分钟。然后拍摄化学区上所捕捉细胞的光学显微照片, 对这些细胞进行计数。还对每个临床标本进行 FAC 分析。此实验的结果显示在表 2 中。

表 2

生物光盘 CD4/CD8 比率与 FAC CD4/CD8 比率比较

盘号	标本号	光盘 CD4/CD8	FAC CD4/CD8
27a	29	2.39	2.43
27b	30	1.47	1.67
27c	31	0.8	0.98
27d	32	1.84	2.16
27e	33	0.96	1.14
27f	34	1.59	1.49
28	35	1.03	1.04

实施例 7

光盘制备和化学物质沉积

在此实施例中，用空气喷枪除去尘粒，以清洁透射光盘基质。将此光盘安装在旋转涂布器中，并用稳定的异丙醇流将其清洗两遍。然后，将聚苯乙烯溶液均匀地涂敷在光盘上，该聚苯乙烯溶液是将 2% 聚苯乙烯溶解在 310ml 甲苯和 65ml 异丙醇中获得的。

对于第二抗体沉积，将活化右旋糖酐醛（PBS 中，200 μ g/ml）的新鲜溶液与等量 Vector IgG（PBS 中，125 μ g/ml）结合。应用手工针式沉积，将约 1 μ l IgG+DCHO 复合物沉积在光盘的每个捕捉区中。在潮湿室中将光盘孵育 60 分钟。用去离子水洗去多余抗体，并将该光盘旋转干燥。

对于第一抗体，在 PBS 中将 DAKO CD4 稀释至 50 μ g/ml，在 PBS 中将 DAKO CD8 稀释至 25 μ g/ml，在 PBS 中将 DAKO CD45 稀释至 145 μ g/ml。应用手工针式敷料器，将约 1 μ l 各种第一抗体沉积在吸收的第二抗体上面。在潮湿室中孵育 30 分钟。用 PBS 洗去多余抗体，并将光盘旋转

干燥。

实施例 8

应用涂敷抗体的小珠鉴别靶细胞和不需要细胞

在此实施例中，按照实施例 3 所述制备透射光盘。

A. 应用铵溶解缓冲液制备临床标本

将 20ml 1×氯化铵溶解缓冲液加入 1ml ACD 血样中。涡动此标本，在室温下将其孵育 15 分钟。然后，室温下以 $500 \times g$ 将这些标本离心 5 分钟。然后除去上清液，并用 3ml 含 2% BSA 的 PBS 冲洗。然后以 $500 \times g$ 将这些冲洗细胞离心 5 分钟。离心后，去除上清液，将这些细胞再悬浮于 1ml 含 2% BSA 的 PBS 中。此悬浮液中细胞终浓度为 5500 个/ μl 。

B. 细胞标记和分析

用含 0.1% BSA 的 PBS 将小珠的原液冲洗 3 遍，以此制备 Dynal 磁性抗 CD2 [Dynabeads® CD2 (Prod No. 111.02)] 小珠。将 72 μl 小珠悬浮液与上面 A 节中制备的细胞混合。然后在室温下将细胞/小珠悬浮液孵育 20 分钟，使小珠与标本中不需要的 CD2+ NK 细胞结合。孵育后，将此悬浮液装入上面制备的光盘中。然后在室温下将含有悬浮液的光盘孵育 15 分钟，使标本中的 CD4+ 细胞 (T-淋巴细胞和 NK 细胞) 与光盘捕捉区内的抗 CD4 捕捉剂结合。然后以 1000rpm 将光盘旋转 5 分钟，除去未结合细胞。然后拍摄捕捉区的显微照片。这些显微照片显示在附图 24 中。因为只有 NK 细胞表面具有 CD2 标记，所以可在捕捉区内将 NK 细胞 242 与 T-淋巴细胞 240 鉴别开，因为如附图 24 所示，NK 细胞 242 被小珠标记，而 T-淋巴细胞 240 没有标记。

最后总结

本发明或其不同的方面可易于在许多光盘、测定和系统中实现，或者适应于这些光盘、测定和系统，它们公开于下列共同转让和同时待审的专利申请中：美国专利申请 No. 10/099,266，名称为“Use of Restriction Enzymes and Other Chemical Methods to Decrease Non-Specific Binding in Dual Bead Assays and Related Bio-Discs, Methods, and System Apparatus for Detecting Medical Targets”，提交于 2002 年 3 月 14 日；美国专利申请 No. 10/121,281，名称为“Multi-Parameter Assays Including Analysis Discs and Methods Relating Thereto”，提交于 2002 年 4 月 11 日；美国专利申请 No. 10/150,575，名称为“Variable Sampling Control for Rendering Pixelization of Analysis Results in a Bio-Disc Assembly and Apparatus Relating Thereto”，提交于 2002 年 5 月 16 日；美国专利申请 No. 10/150,702，名称为“Surface Assembly For Immobilizing DNA Capture Probes in Genetic Assays Using Enzymatic Reactions to Generate Signals in Optical Bio-Discs and Methods Relating Thereto”，提交于 2002 年 5 月 16 日；美国专利申请 No. 10/194,418，名称为“Optical Disc System and Related Detecting and Decoding Methods for Analysis of Microscopic Structures”，提交于 2002 年 7 月 12 日；美国专利申请 No. 10/194,396，名称为“Multi-Purpose Optical Analysis Disc for Conducting Assays and Various Reporting Agents for Use Therewith”，提交于 2002 年 7 月 12 日；美国专利申请 No. 10/199,973，名称为“Transmissive Optical Disc Assemblies for Performing Physical Measurements and Methods Relating Thereto”，提交于 2002 年 7 月 19 日；美国专利申请 No. 10/201,591，名称为“Optical Analysis Disc and Related Drive Assembly for Performing Interactive Centrifugation”，提交于 2002 年 7 月 22 日；美国专利申请 No. 10/205,011，名称为“Method

and Apparatus for Bonded Fluidic Circuit for Optical Bio-Disc” , 提交于 2002 年 7 月 24 日; 美国专利申请 No. 10/205,005, 名称为 “Magnetic Assisted Detection of Magnetic Beads Using Optical Disc Drives” , 提交于 2002 年 7 月 24 日; 美国专利申请 No. 10/230,959, 名称为 “Methods for Qualitative and Quantitative Analysis of Cells and Related Optical Bio-Disc Systems” , 提交于 2002 年 8 月 29 日; 美国专利申请 No. 10/233,322, 名称为 “Capture Layer Assemblies for Cellular Assays Including Related Optical Analysis Discs and Methods” , 提交于 2002 年 8 月 30 日; 美国专利申请 No. 10/236,857, 名称为 “Nuclear Morphology Based Identification and Quantification of White Blood Cell Types Using Optical Bio-Disc Systems” , 提交于 2002 年 9 月 6 日; 美国专利申请 No. 10/241,512, 名称为 “Methods for Differential Cell Counts Including Related Apparatus and Software for Performing Same” , 提交于 2002 年 9 月 11 日; 美国专利申请 No. 10/279,677, 名称为 “Segmented Area Detector for Biodrive and Methods Relating Thereto” , 提交于 2002 年 10 月 24 日; 美国专利申请 No. 10/293,214, 名称为 “Optical Bio-Discs and Fluidic Circuits for Analysis of Cells and Methods Relating Thereto” , 提交于 2002 年 11 月 13 日; 美国专利申请 No. 10/298,263, 名称为 “Methods and Apparatus for Blood Typing with Optical Bio-Discs” , 提交于 2002 年 11 月 15 日; 美国专利申请 No. 10/341,326, 名称为 “Method and Apparatus for Visualizing Data” , 提交于 2003 年 1 月 13 日; 美国专利申请 No. 10/345,122, 名称为 “Methods and Apparatus for Extracting Data From an Optical Analysis Disc” , 提交于 2003 年 1 月 14 日; 美国专利申请 No. 10/347,155, 名称为 “Optical Discs Including Equi-Radial and/or Spiral Analysis Zones and Related Disc Drive Systems and Methods” , 提交于 2003 年 1 月 15 日; 美国专利申请 No. 10/347,119,

名称为“Bio-Safe Dispenser and Optical Analysis Disc Assembly”，提交于2003年1月17日；美国专利申请 No. 10/348,049，名称为“Multi-Purpose Optical Analysis Disc for Conducting Assays and Related Methods for Attaching Capture Agents”，提交于2003年1月21日；美国专利申请 No. 10/348,196，名称为“Processes for Manufacturing Optical Analysis Discs with Molded Microfluidic Structures and Discs Made According Thereto”，提交于2003年1月21日；美国专利申请 No. 10/351,604，名称为“Methods for Triggering Through Disc Grooves and Related Optical Analysis Discs and System”，提交于2003年1月23日；美国专利申请 No. 10/351,280，名称为“Bio-Safety Features for Optical Analysis Discs and Disc System Including Same”，提交于2003年1月23日；美国专利申请 No. 10/351,244，名称为“Manufacturing Processes for Making Optical Analysis Discs Including Successive Patterning Operations and Optical Discs Thereby Manufactured”，提交于2003年1月24日；美国专利申请 No. 10/353,777，名称为“Processes for Manufacturing Optical Analysis Discs with Molded Microfluidic Structures and Discs Made According Thereto”，提交于2003年1月27日；美国专利申请 No. 10/353,839，名称为“Method and Apparatus for Logical Triggering”，提交于2003年1月28日；美国专利申请 No. 10/356,666，名称为“Methods For Synthesis of Bio-Active Nanoparticles and Nanocapsules For Use in Optical Bio-Disc Assays and Disc Assembly Including Same”，提交于2003年1月30日；美国专利申请 No. 10/370,272，名称为“Methods and an Apparatus for Multi-Use Mapping of an Optical Bio-Disc”，提交于2003年2月19日和美国临时申请 No. 60/60/479,803，名称为“Fluidic Circuits for Sample Preparation Including Bio-Discs and Methods Relating Thereto”，提交于2003年6月19日。

将本说明书中提及的所有专利、专利申请和其他公布整个附在这里作为参考，即使完全重复。

尽管某些优选实施方式已对本发明进行了详细描述，但应当认识到不是要将本发明限制在这些明确的实施方式中。例如，除了血细胞，上述方法可用于鉴别靶细胞。其他靶可包括，但不限于病毒、组织细胞、细菌、植物细胞和微生物。更确切的说，本公开描述了实施本发明的最佳方式，借助本公开，在不违背本发明范围和精神的前提下，本领域专业技术人员可对本发明进行一些修改和改变。因此，通过下面的权利要求表明本发明的范围，而不是用前面的说明书。符合本权利要求同等含义和范围的所有变化、修改和改变均被认为符合它们的范围。

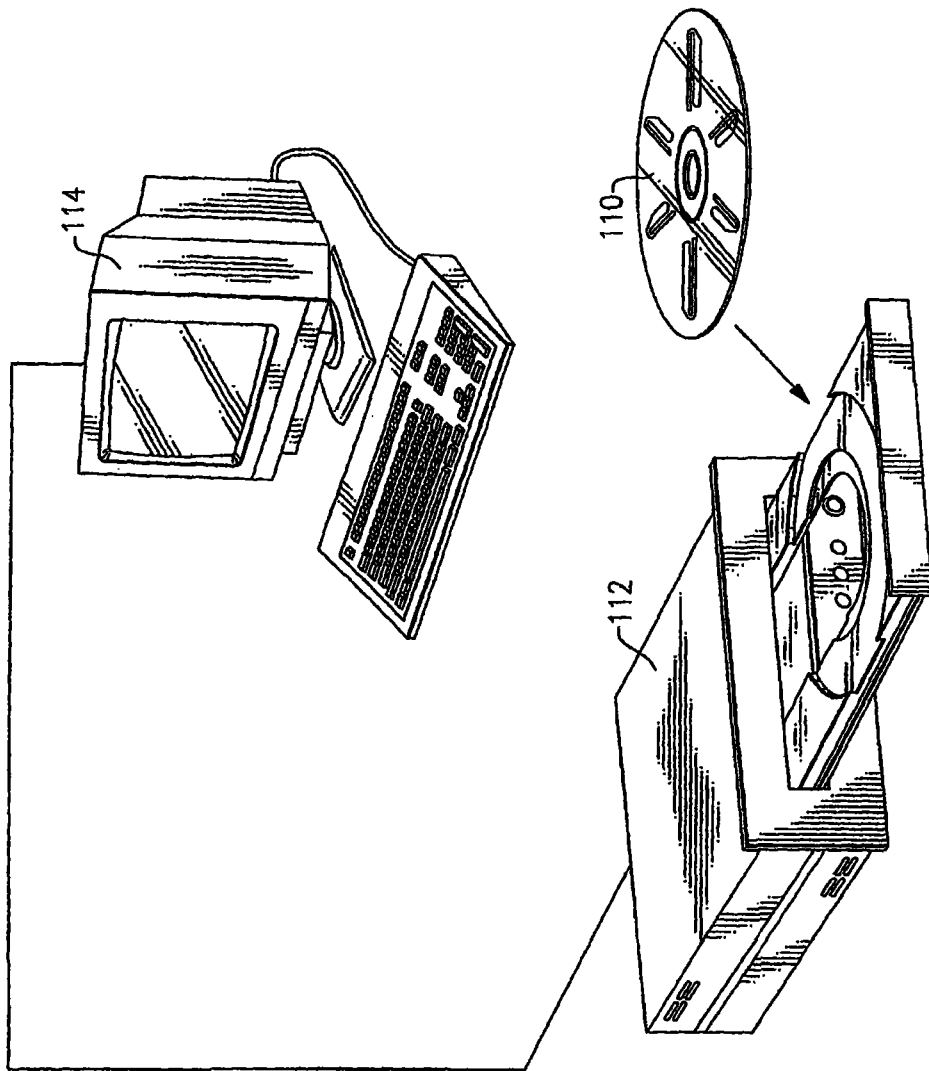
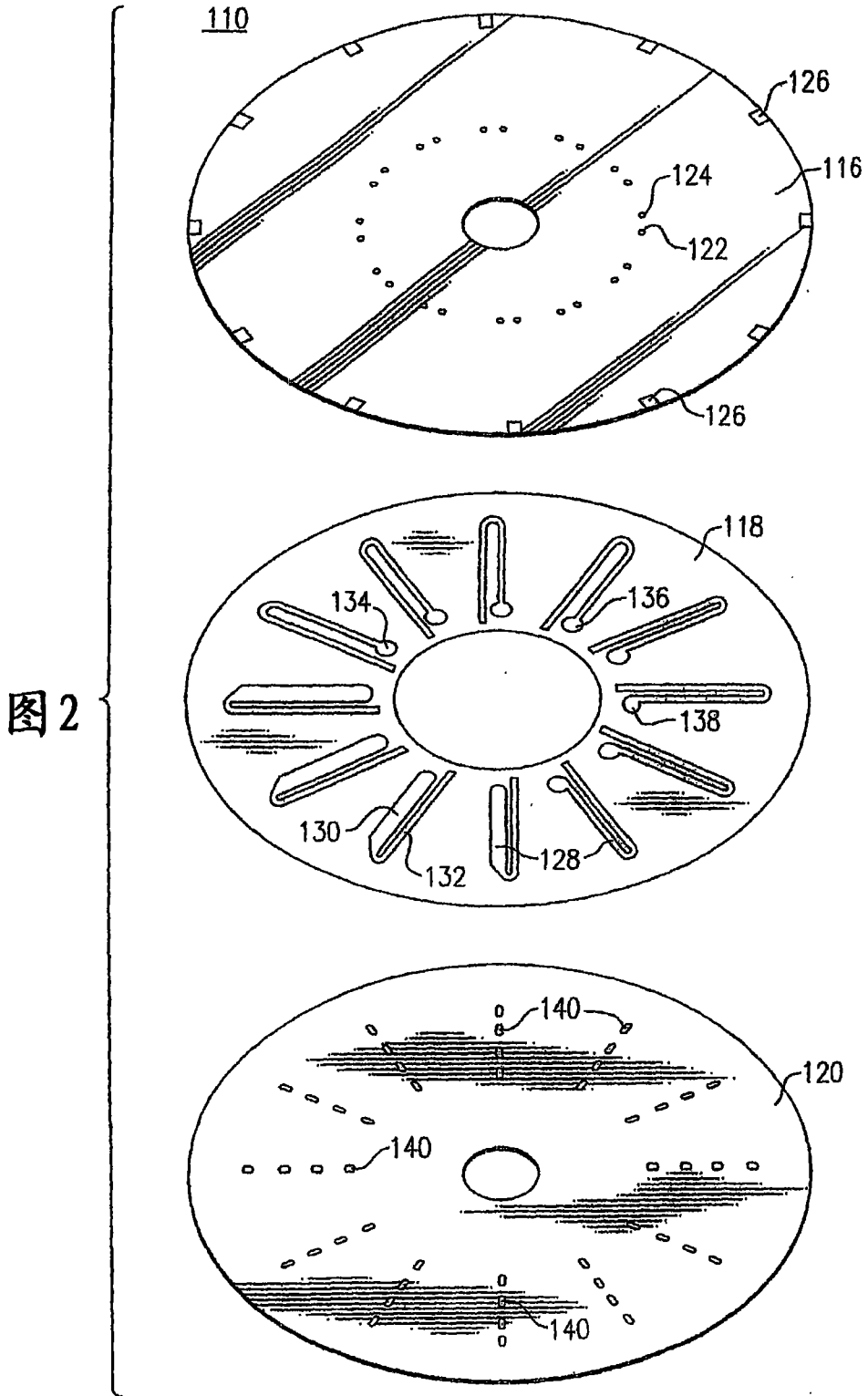


图1



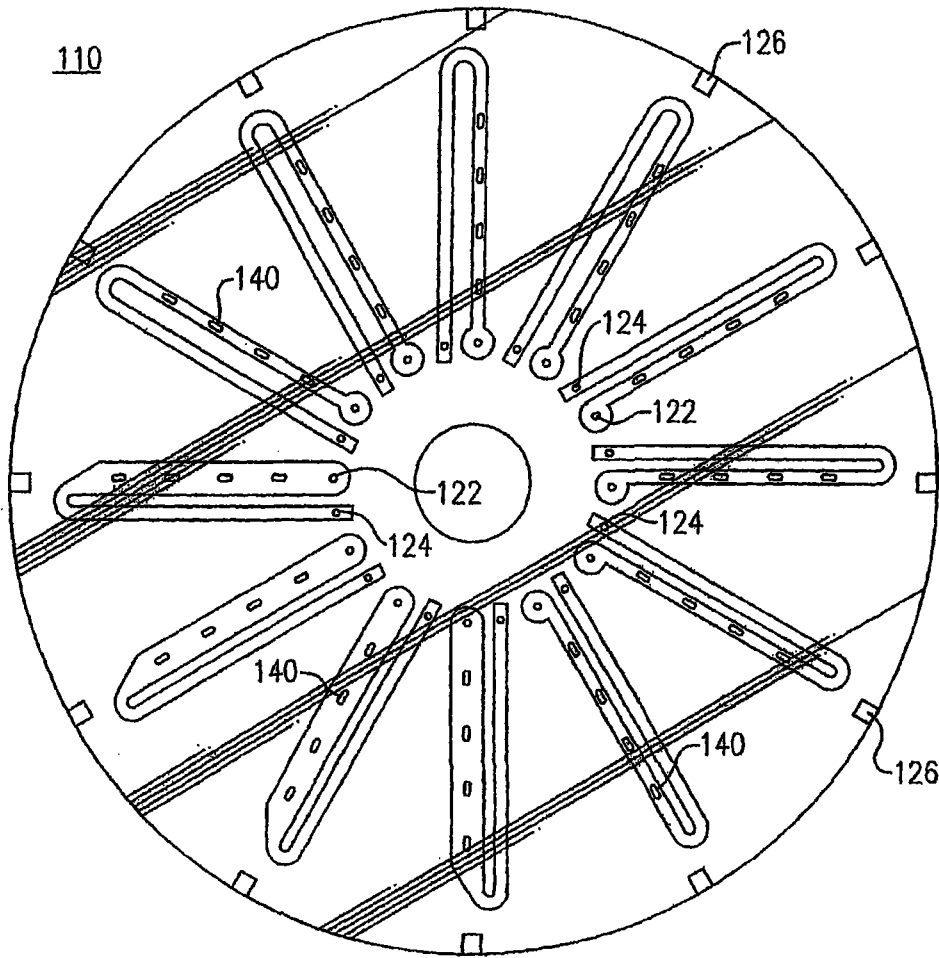


图 3

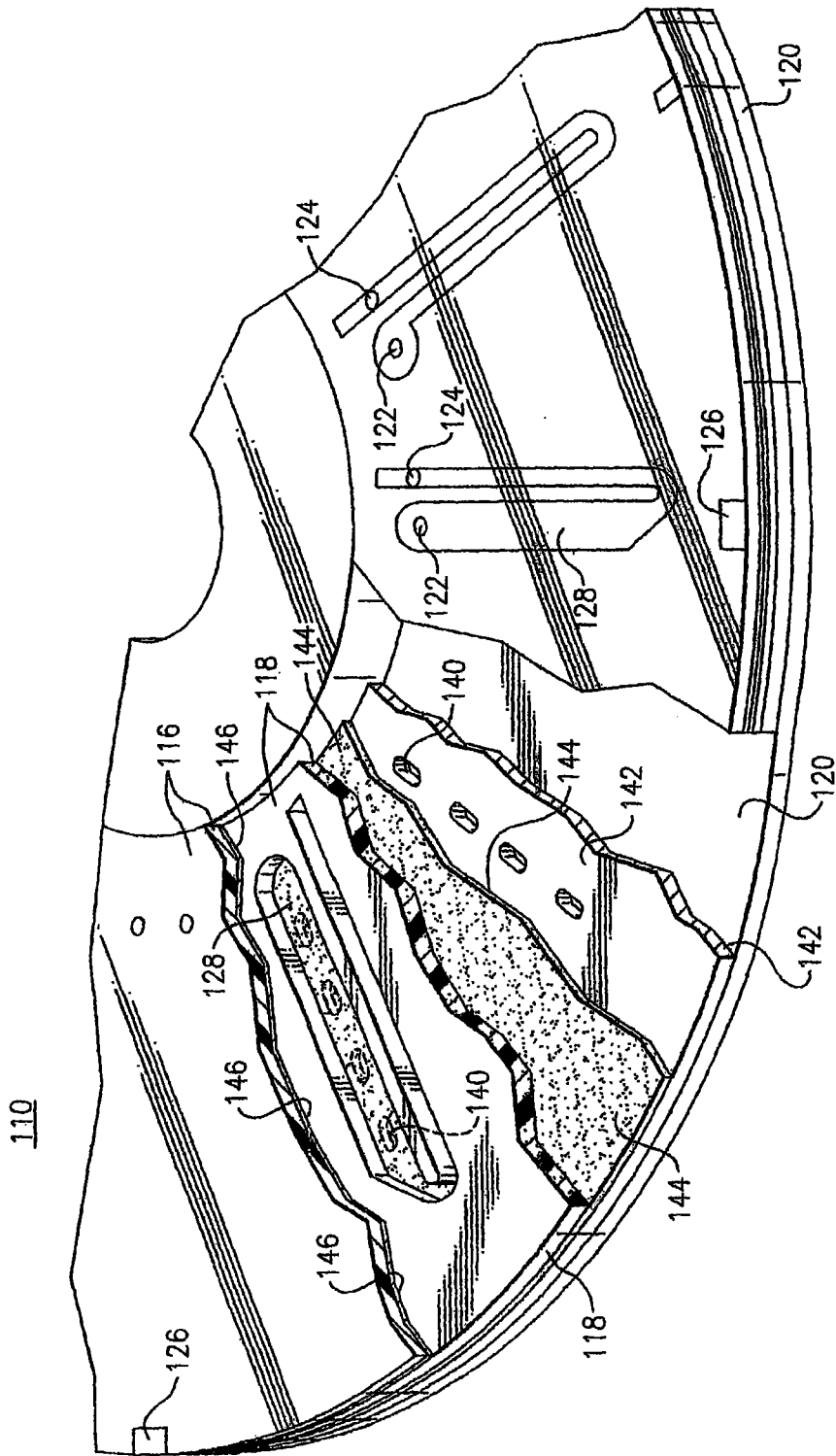
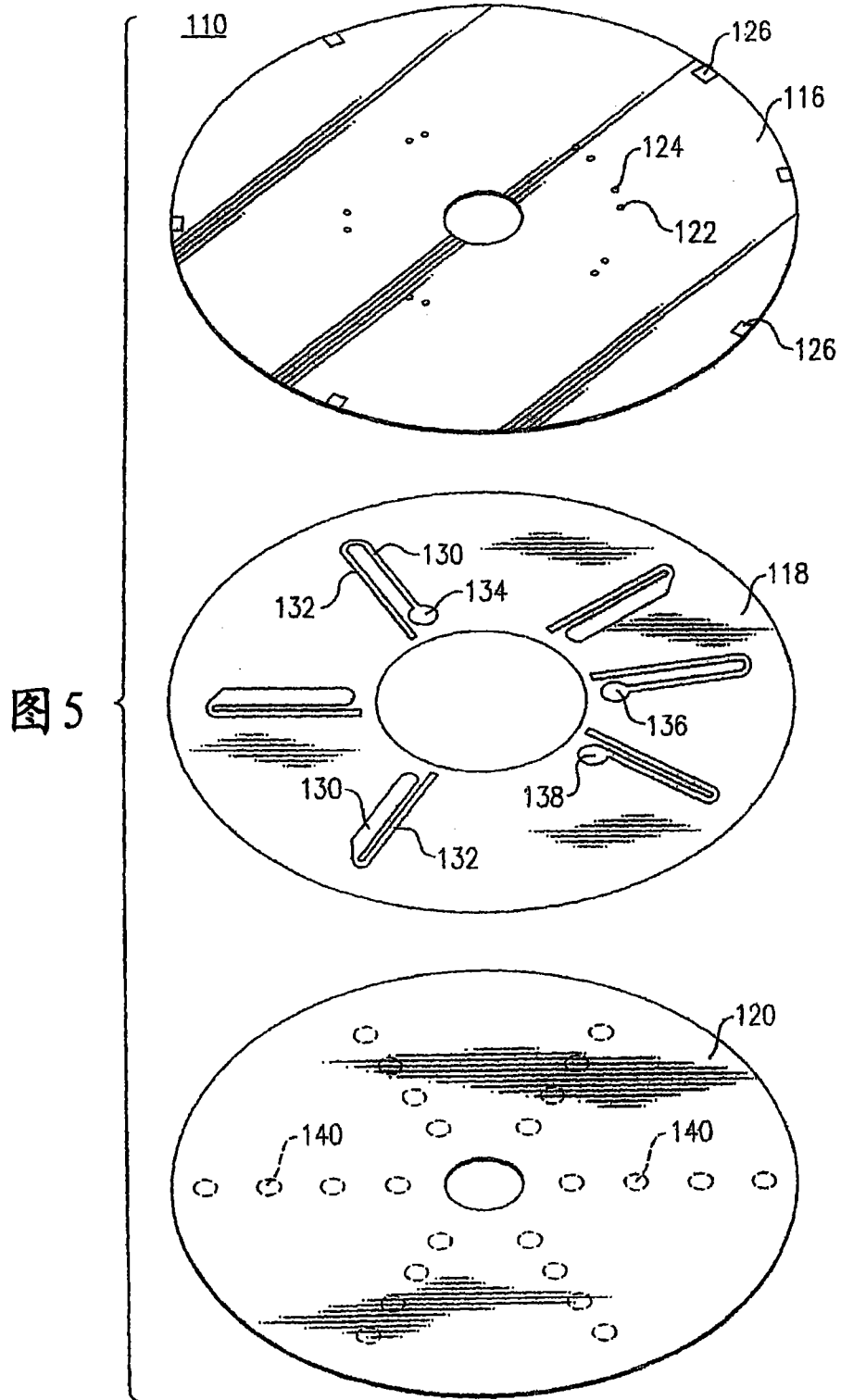


图 4



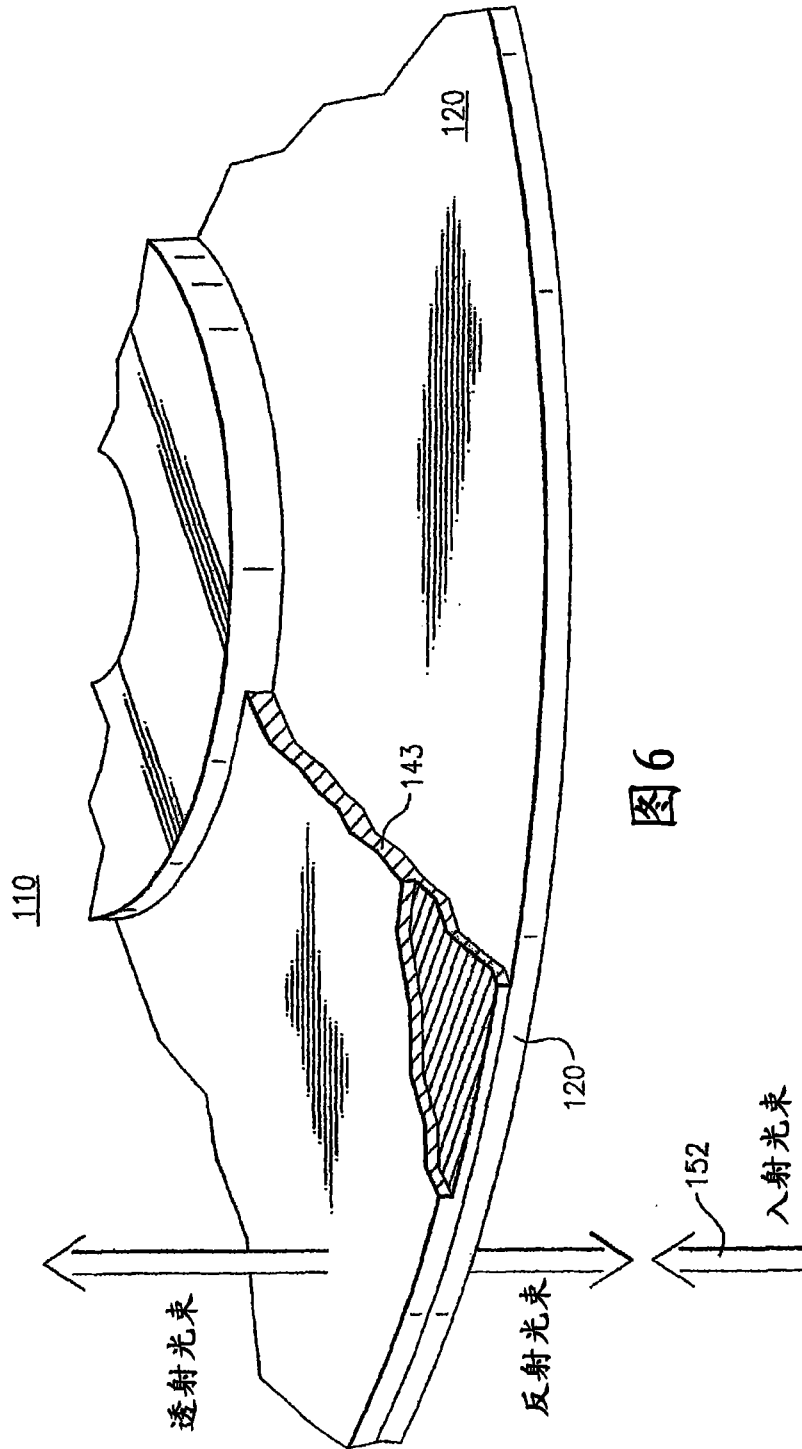


图6

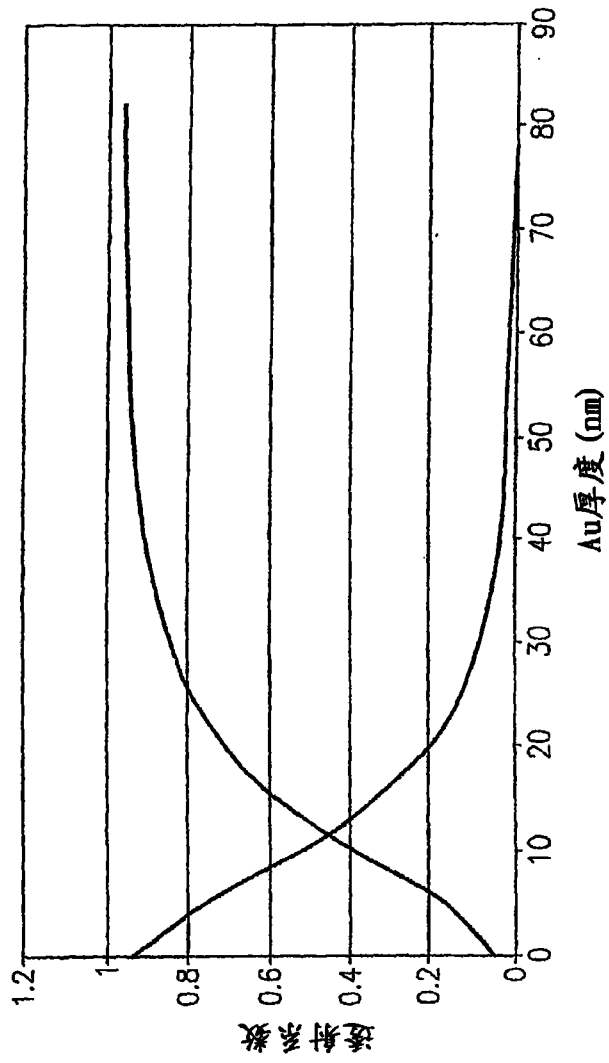


图7

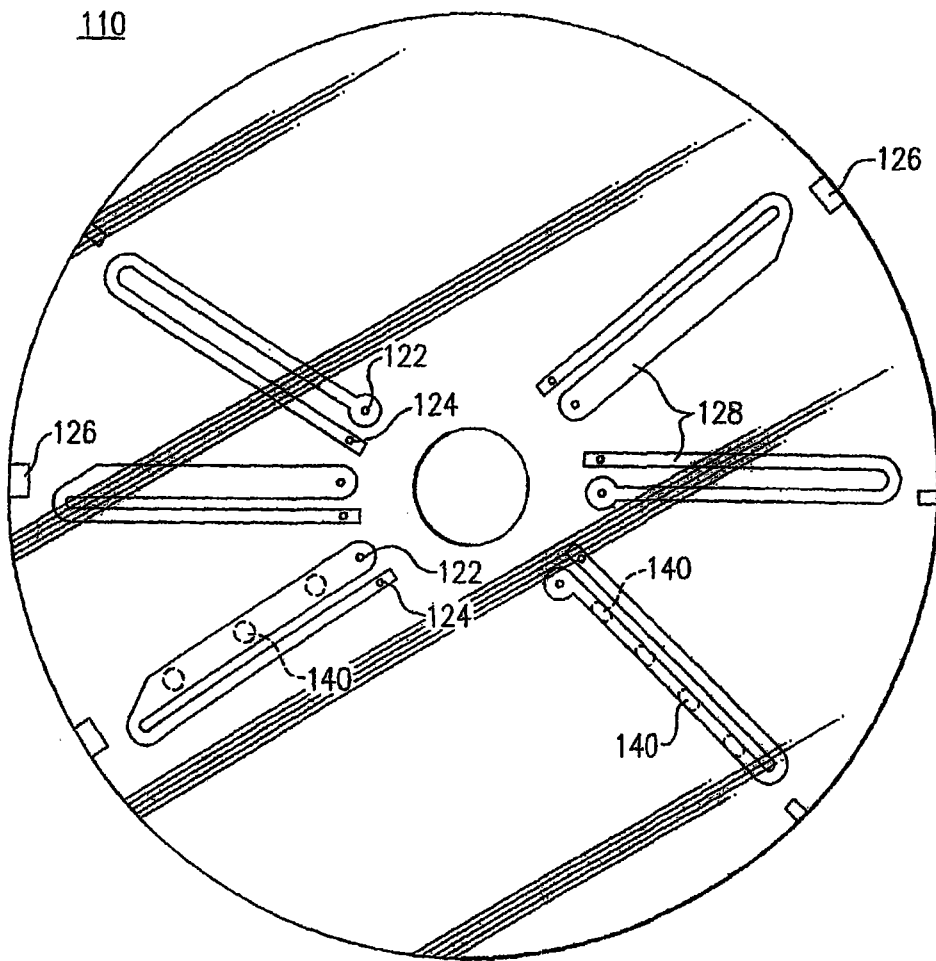


图 8

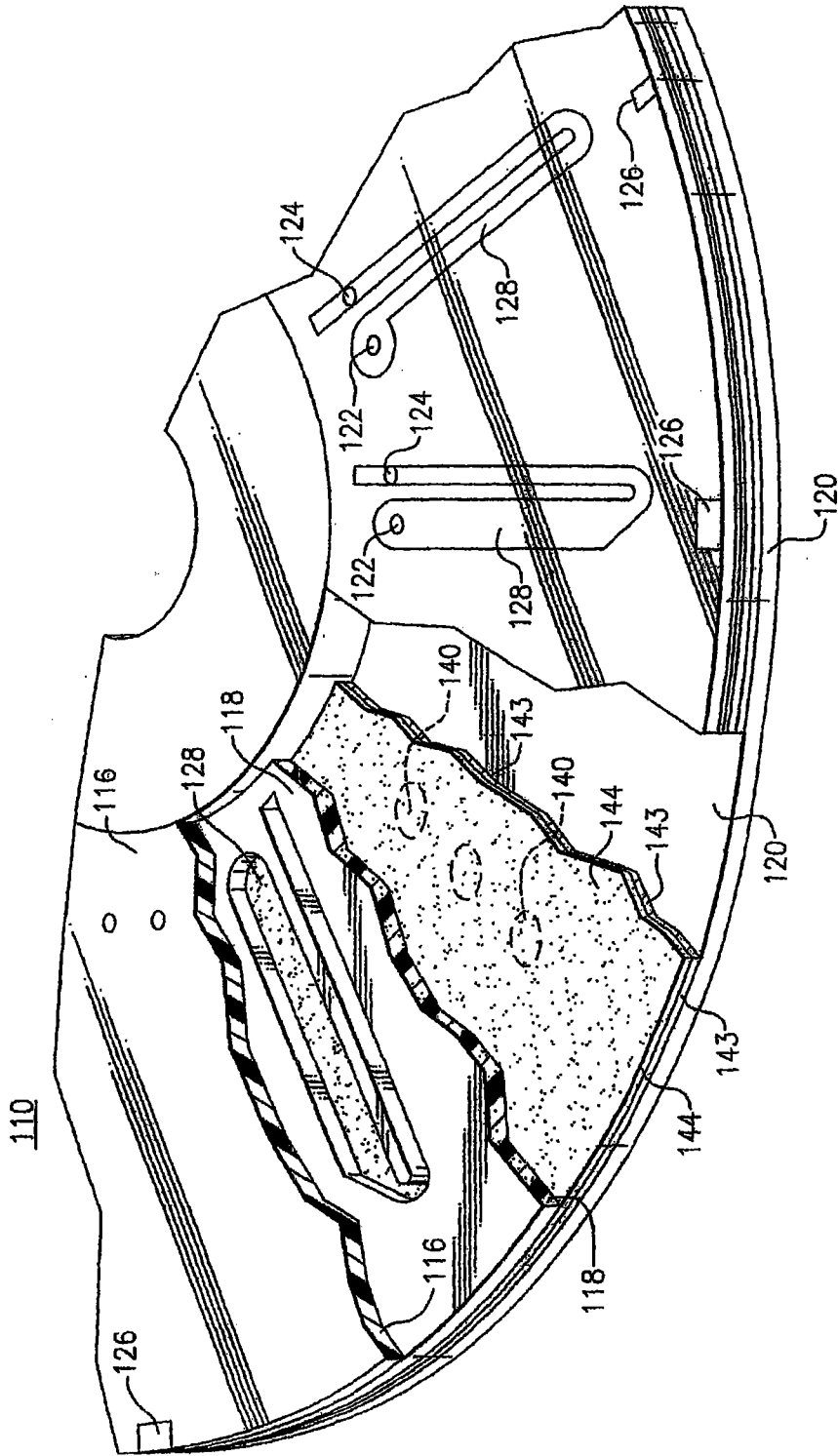


图9

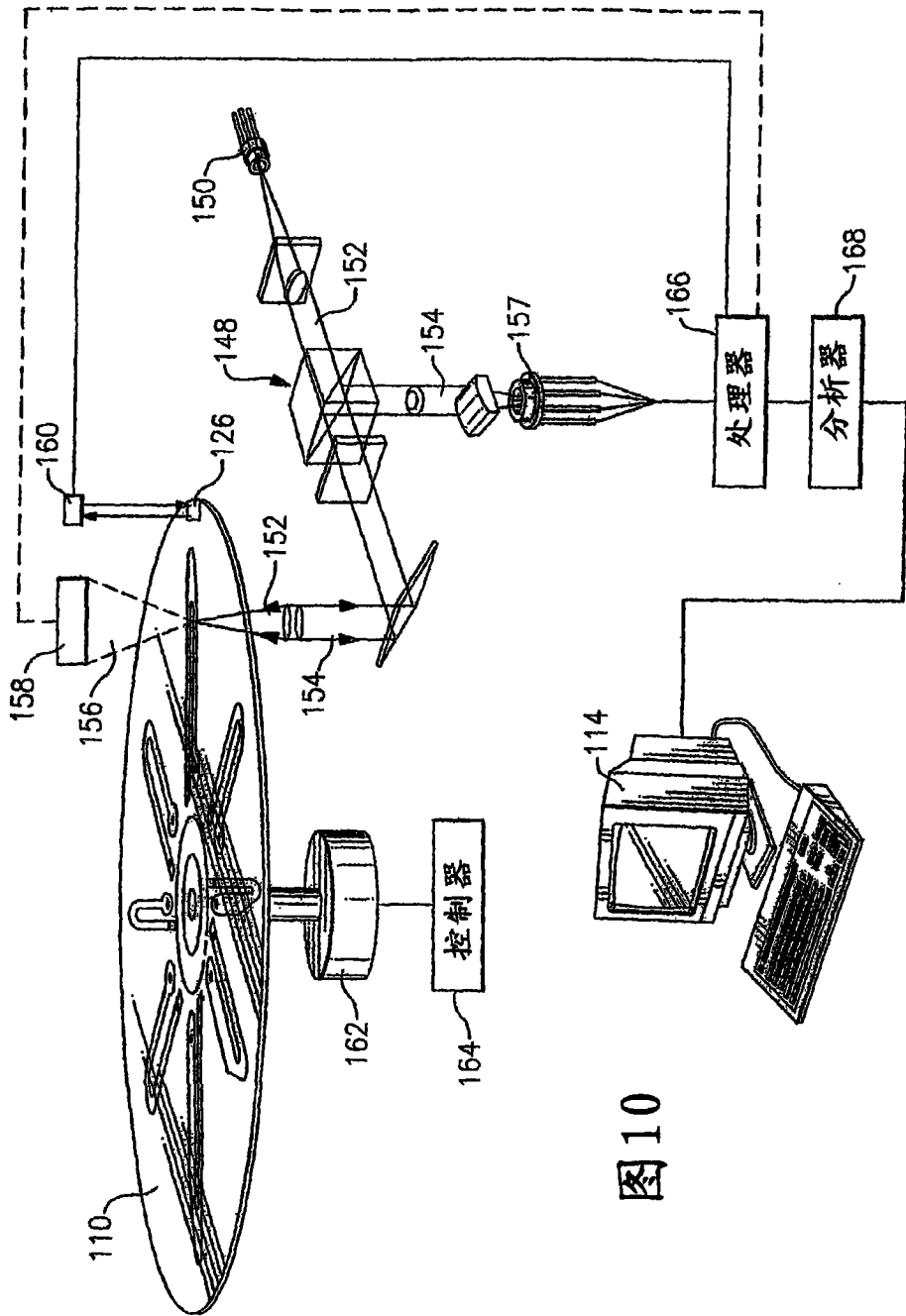


图10

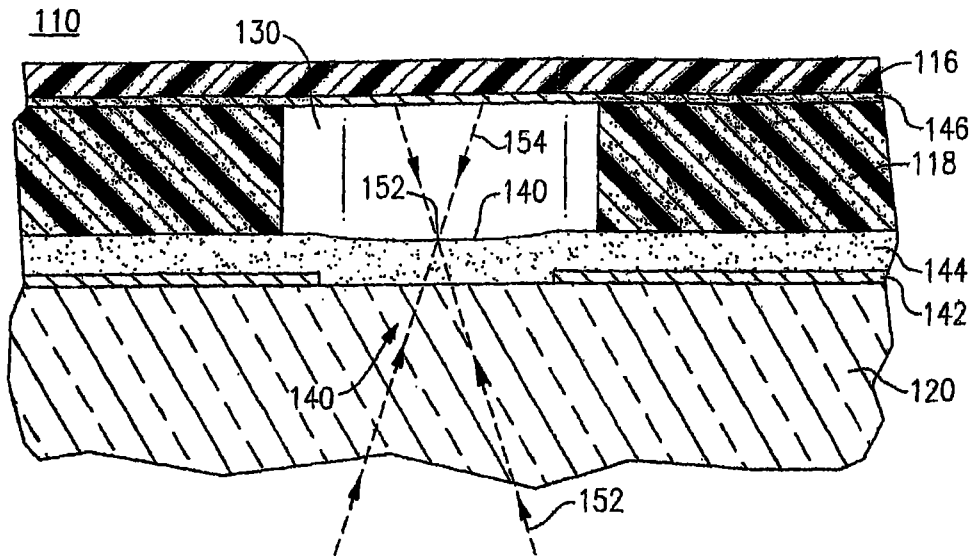


图 11

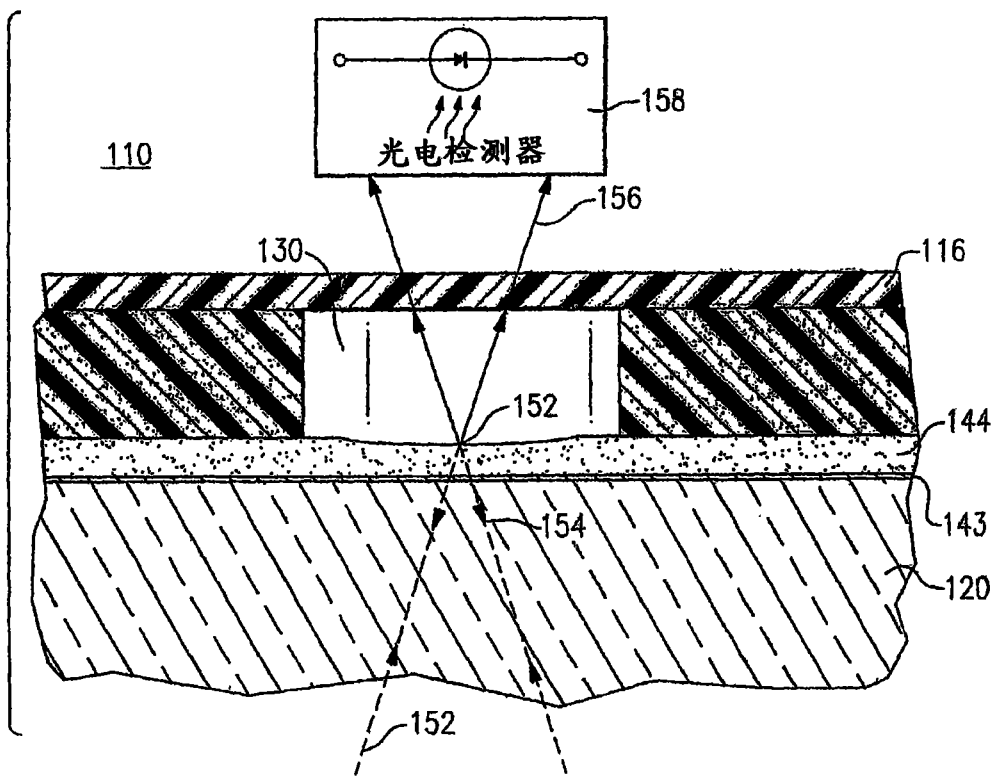


图 12

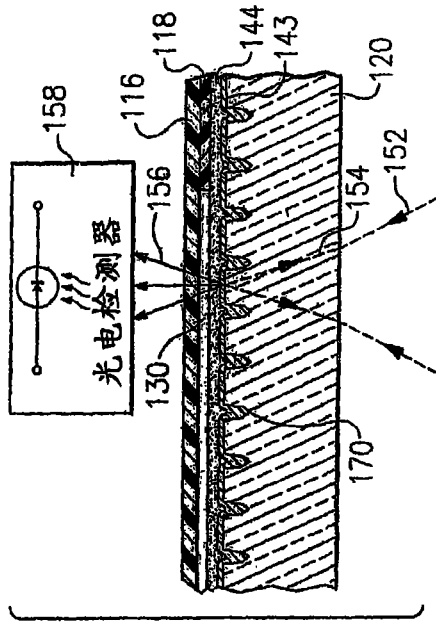


图14

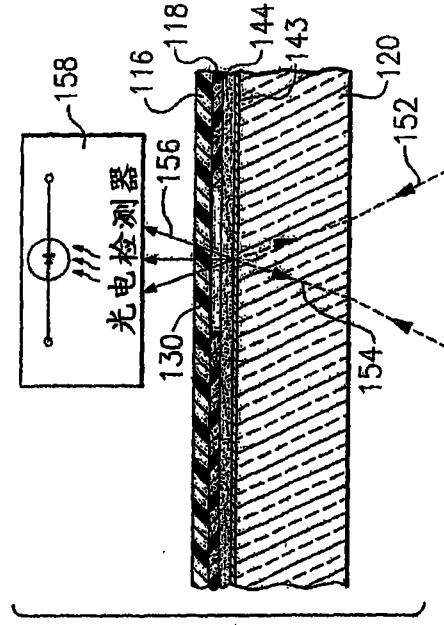


图16

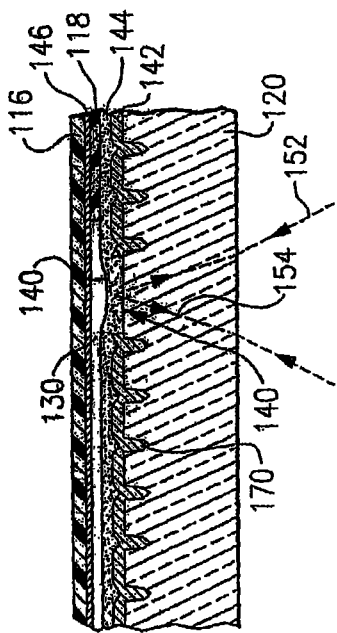


图13

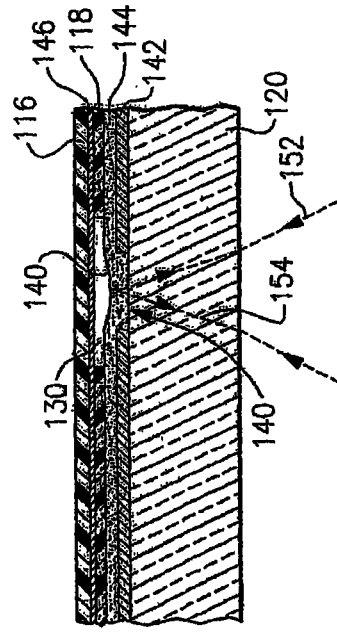


图15

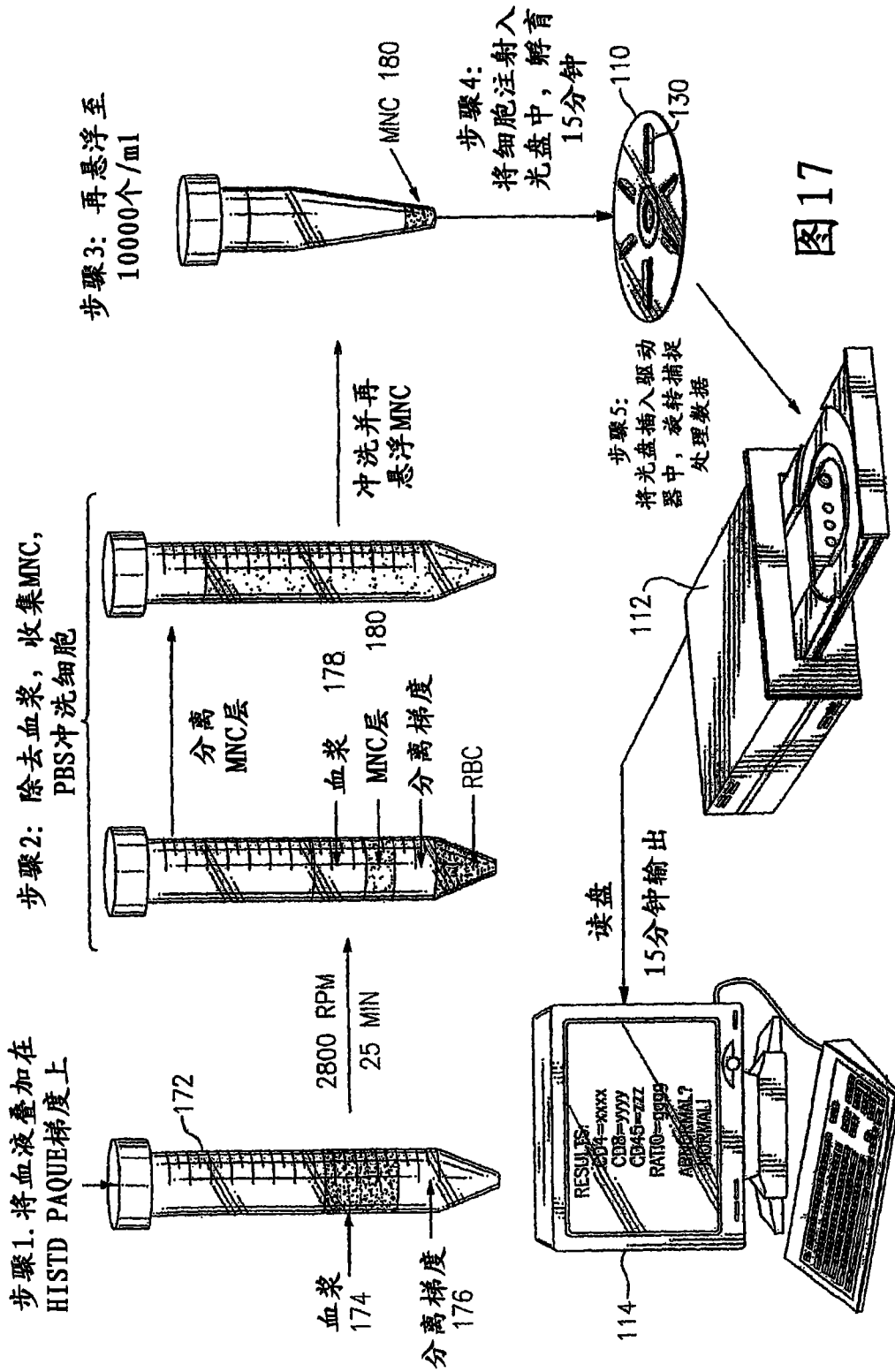


图17

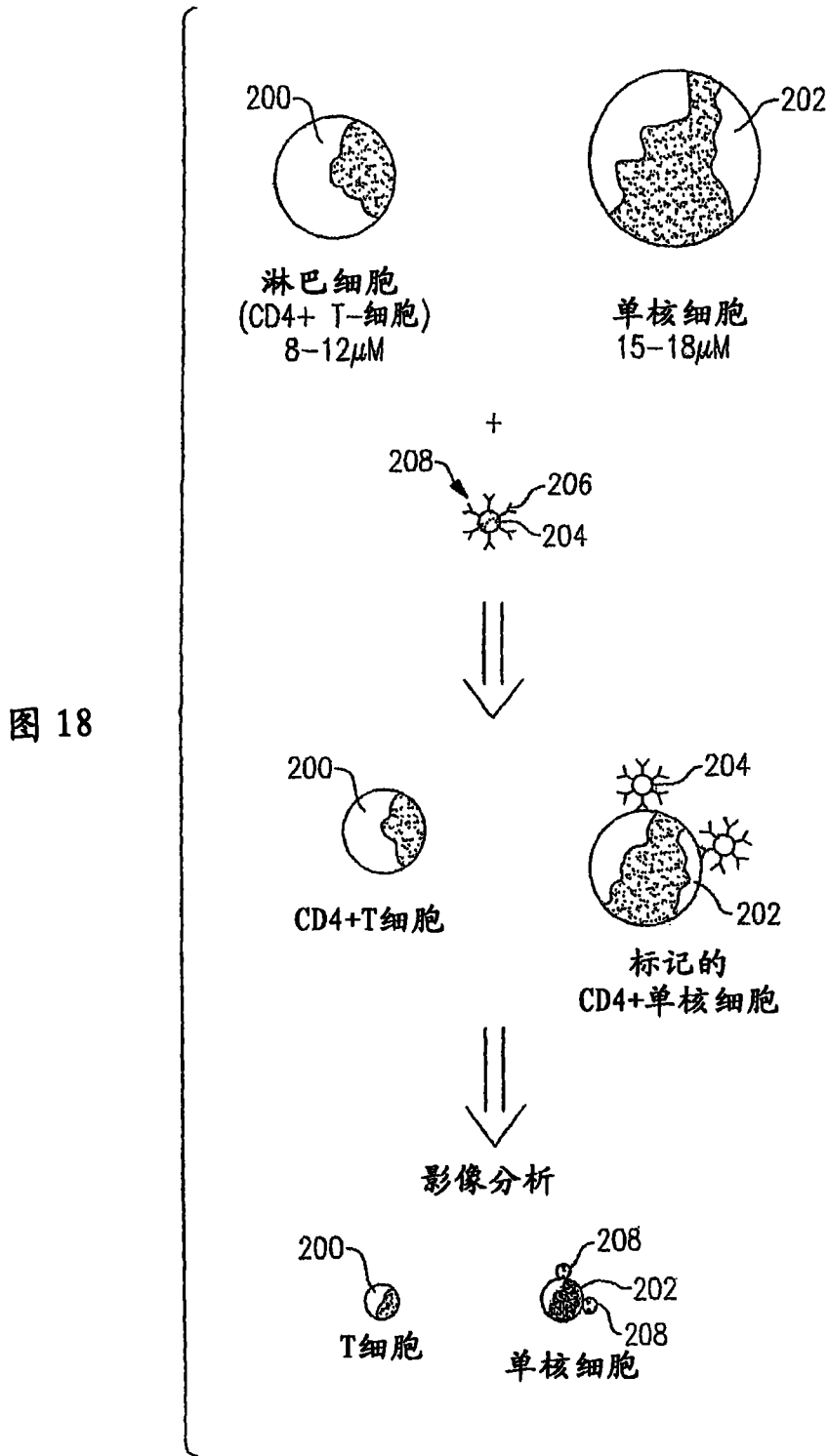


图 18

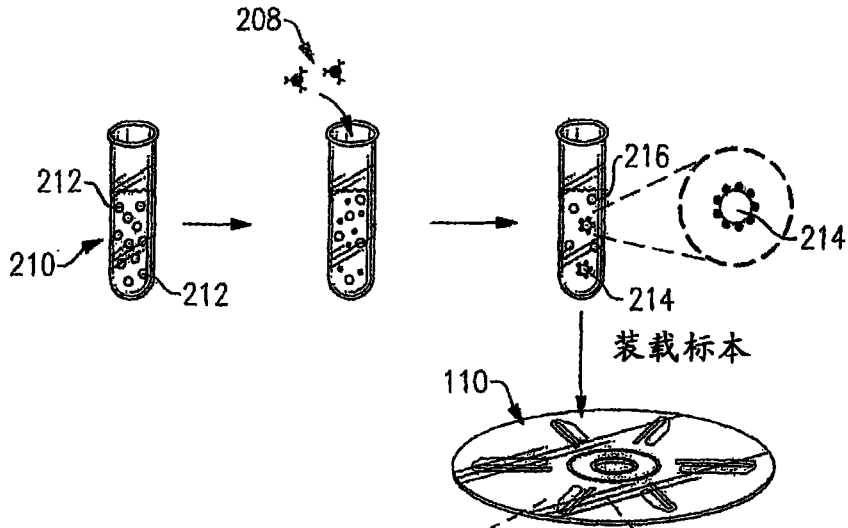
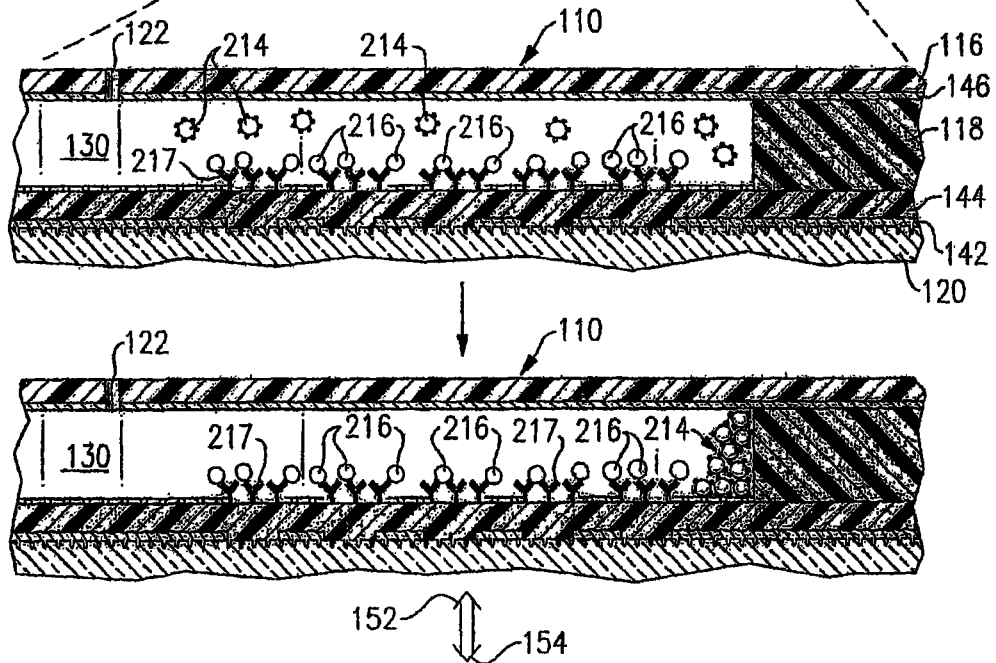


图19



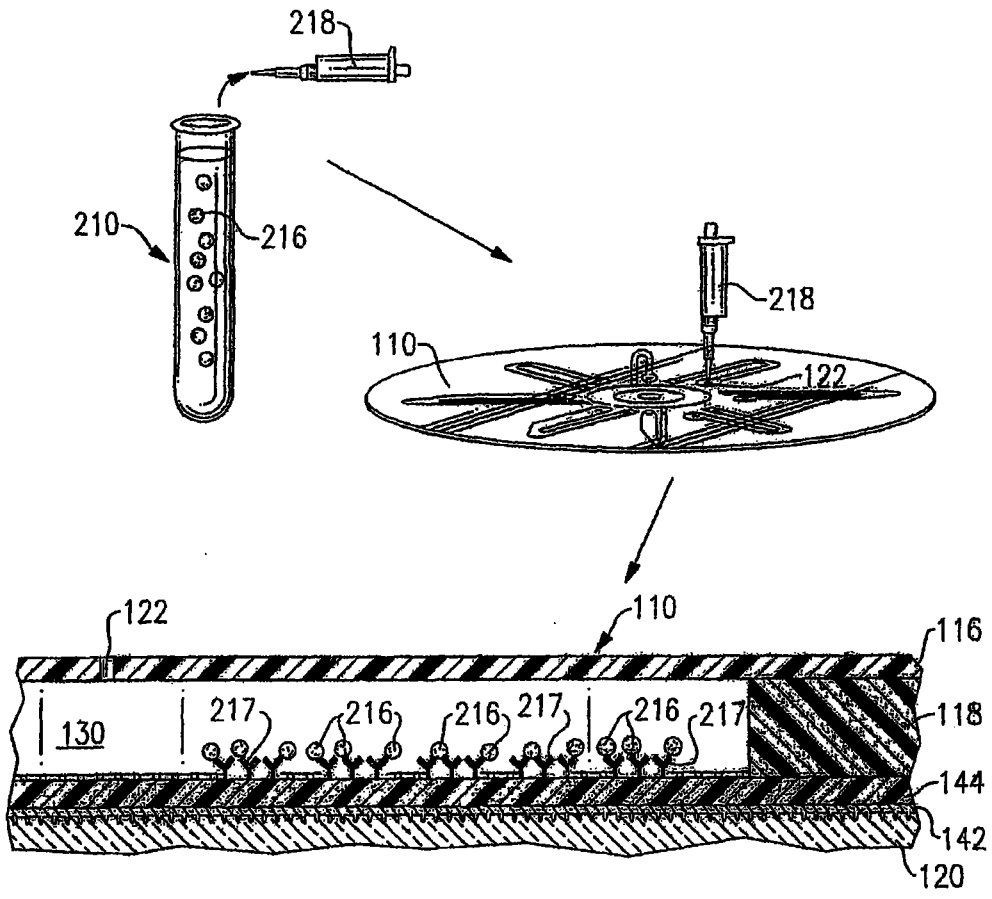


图 20A

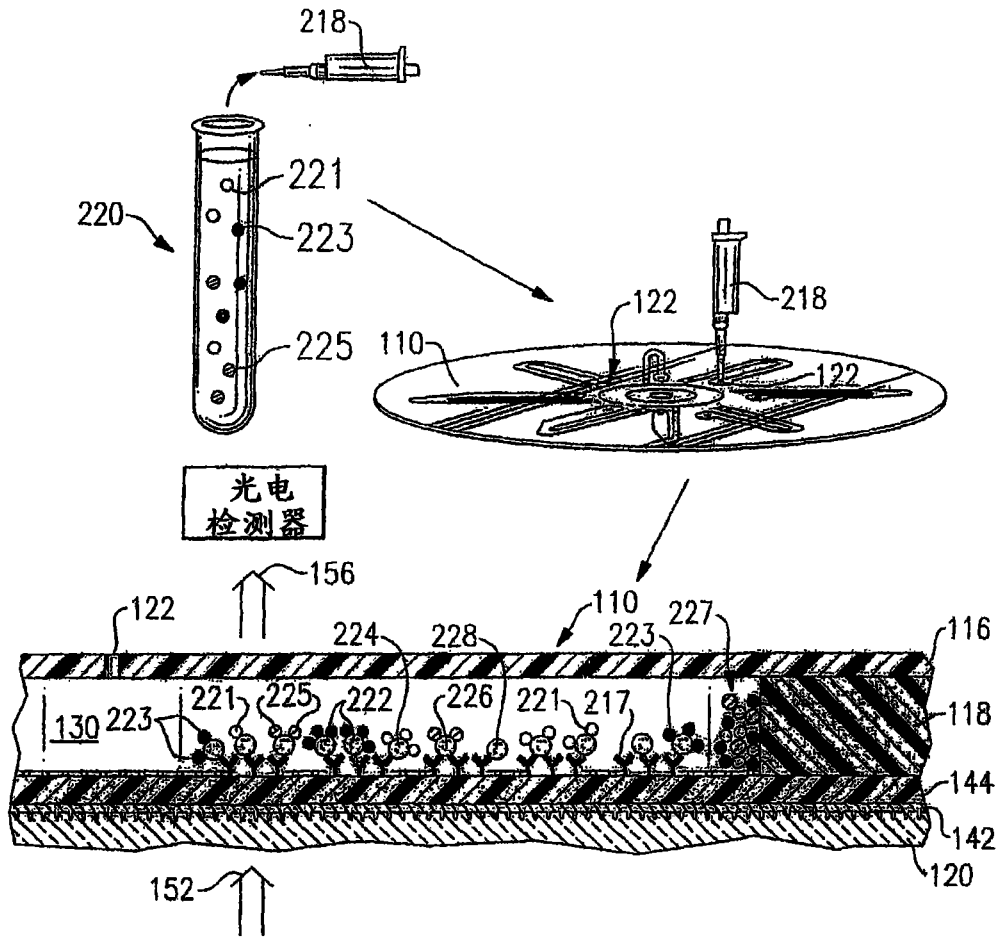


图 20B

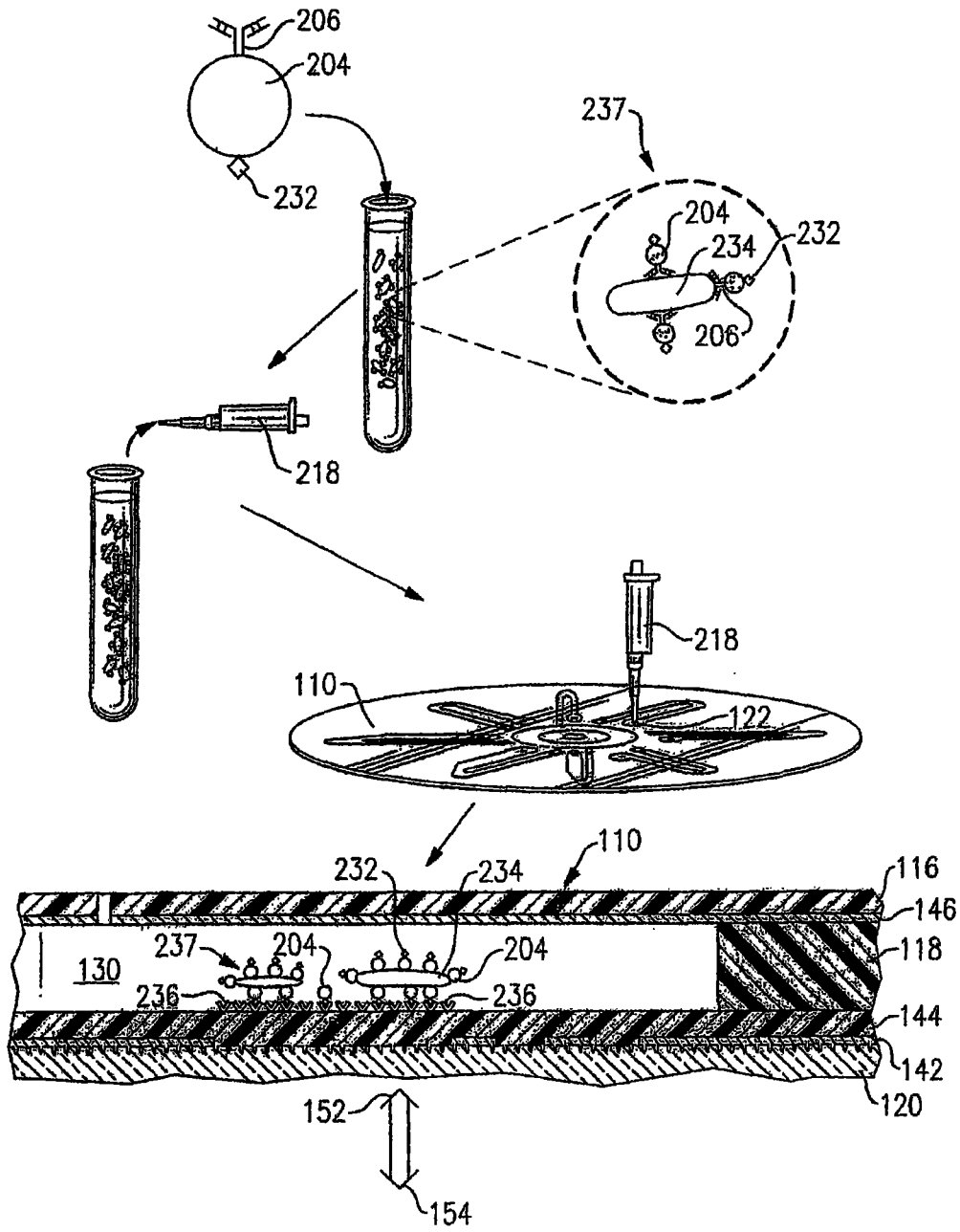


图 21

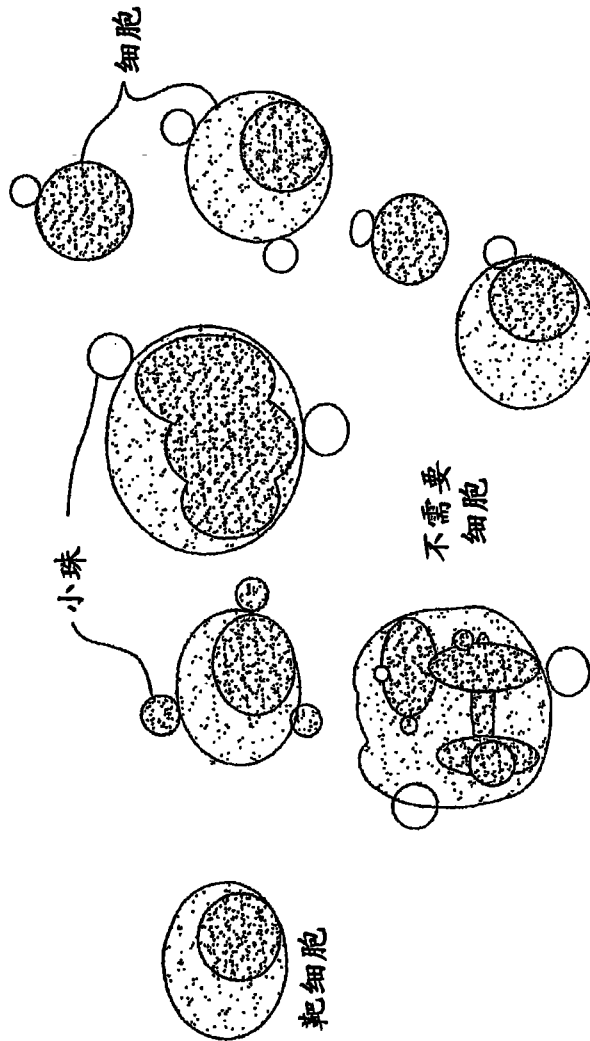


图22

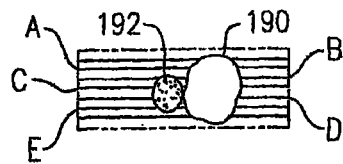


图 23A

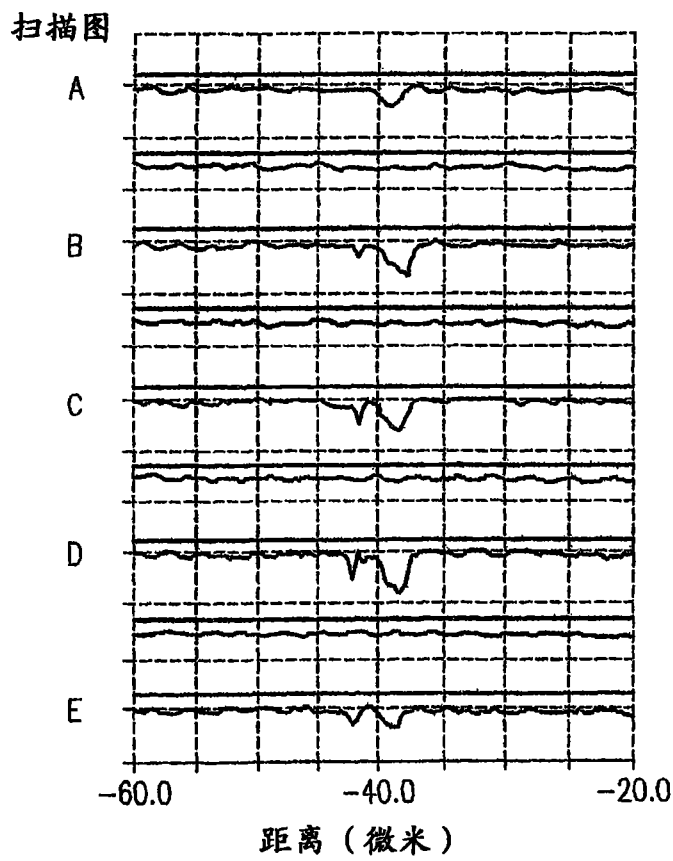


图 23B

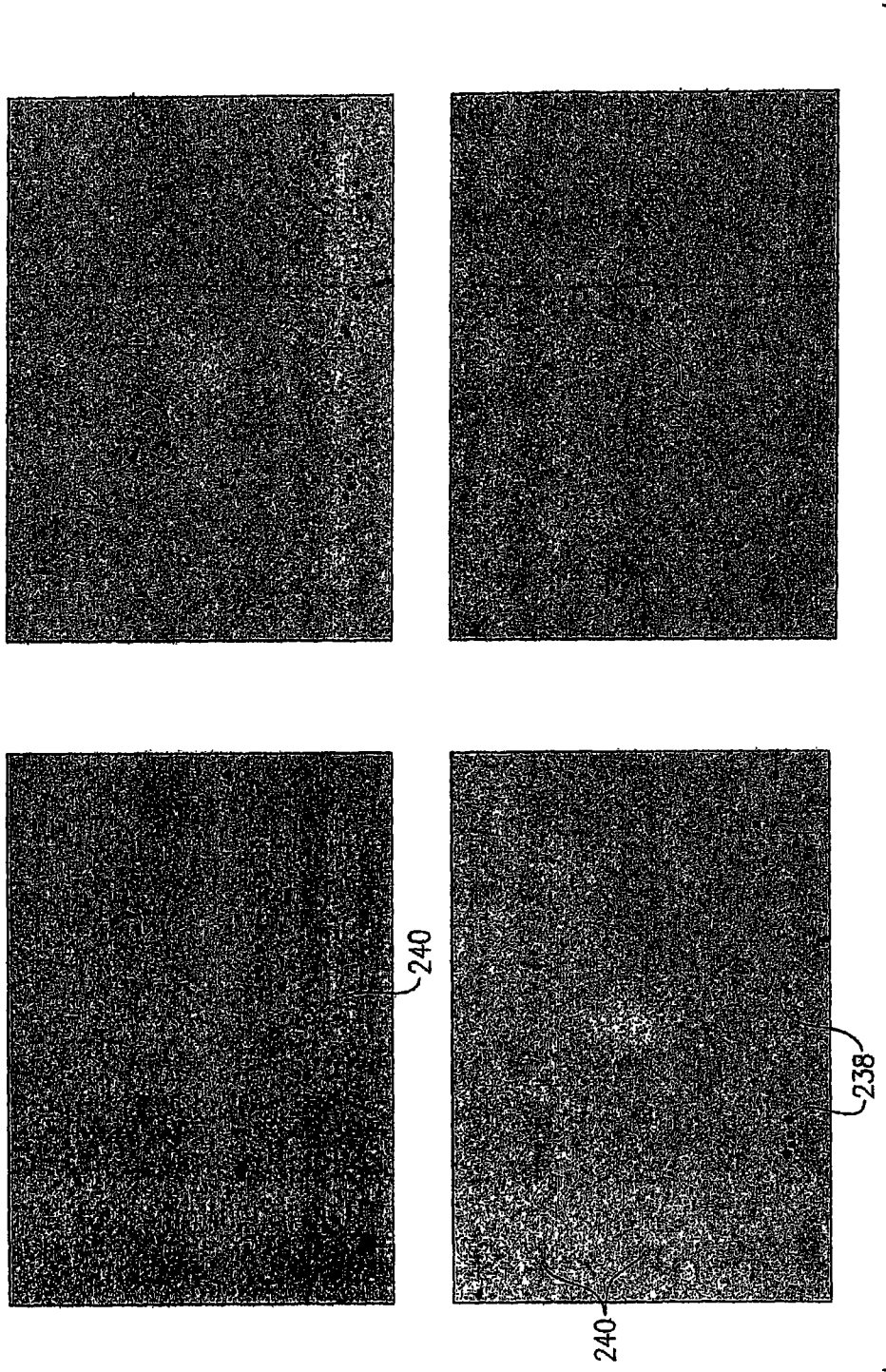


图 24

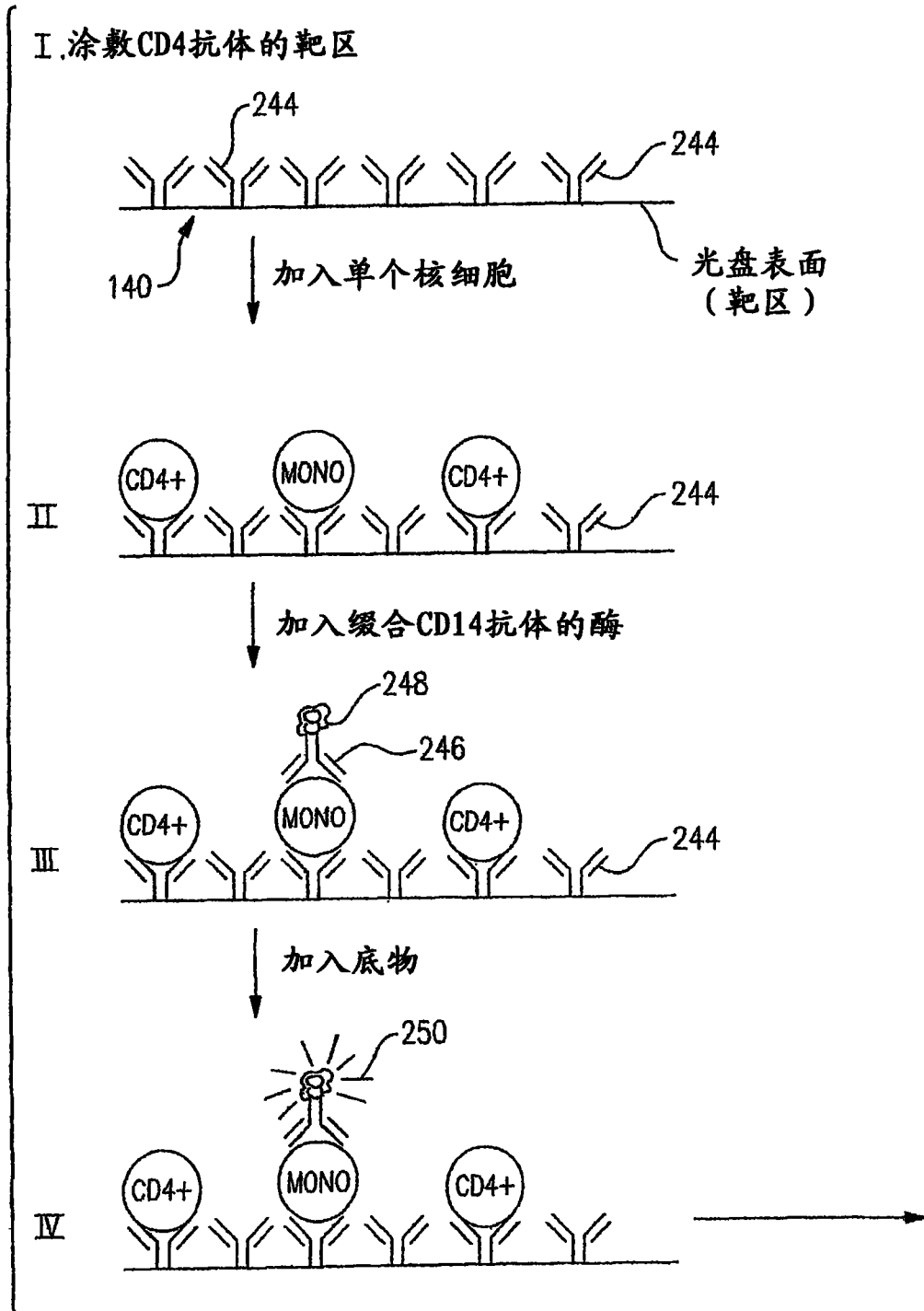


图25A

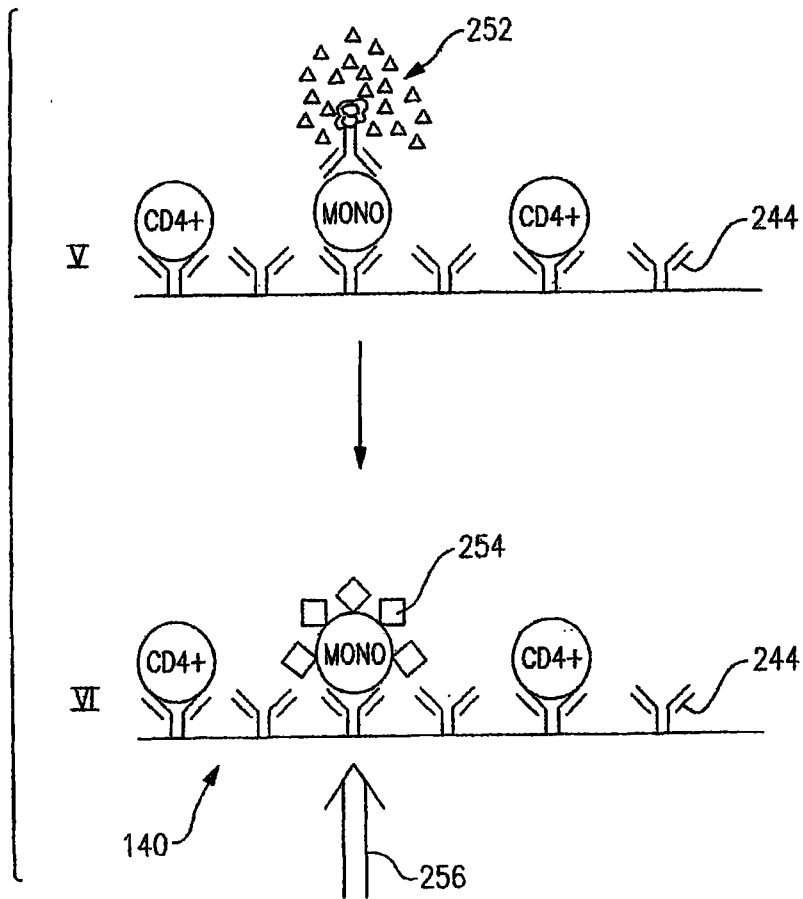


图 25B