

[19] 中华人民共和国国家知识产权局



[12] 发明专利说明书

专利号 ZL 99808410.7

[51] Int. Cl.

G01N 33/48 (2006.01)

G01N 33/00 (2006.01)

G01N 21/00 (2006.01)

G01N 1/00 (2006.01)

[45] 授权公告日 2008 年 6 月 4 日

[11] 授权公告号 CN 100392402C

[22] 申请日 1999.5.7 [21] 申请号 99808410.7

[30] 优先权

[32] 1998.5.9 [33] US [31] 60/084,893

[86] 国际申请 PCT/US1999/010026 1999.5.7

[87] 国际公布 WO1999/058972 英 1999.11.18

[85] 进入国家阶段日期 2001.1.9

[73] 专利权人 伊康尼西斯公司

地址 美国康涅狄格州

[72] 发明人 P·茨普拉斯 T·塔法斯

[56] 参考文献

CN2039561U 1989.6.21

US5352613A 1994.10.4

审查员 王 奕

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 罗 朋 李亚非

权利要求书 4 页 说明书 27 页 附图 10 页

[54] 发明名称

处理体液或组织样品用于图像信号数据检测和遗传诊断的方法

[57] 摘要

本发明提供了一种用于检测和诊断组织样品中稀少细胞类型的计算机控制方法,所述方法包括以下步骤:首先处理组织样品以便使其产生指示稀少细胞存在的位置的第一信号,其次检测第一信号,处理检测到第一信号的部位,以便产生可指示有益于诊断的细胞特性的第二信号,然后测定第二信号。第一信号可是形态学的或者在染色之前或之后所寻找的细胞中具有颜色。可利用原位 PCR 或 PCR 原位杂化产生第二信号。在一优选实施例中,稀少细胞类型是母体血液组织样品中的胎儿细胞,所述样品包括非富集的母体血样涂片。在另一实施例中,该方法用于诊断血液或组织活检样品中的遗传型癌细胞。

1、一种处理体液或组织样品图象数据以便检测或诊断遗传特性的计算机执行方法，该方法包括：

产生代表在第一放大倍数所摄的非富集体液或组织样品图象的第一图象数据集的子集，该子集表示含有稀少细胞的候选模糊点；

产生代表在第二放大倍数所摄的候选模糊点图象的第二图象数据集的子集，该第二数据子集表示稀少细胞；

存取对应于代表稀少细胞的第二数据集的子集的体液或组织样品图象数据，并测定所存取的体液或组织样品图象数据内的生物显示信号水平；以及

对稀少细胞计数并对于与生物显示信号水平一致的稀少细胞做记号，所述记号表示待检测或诊断的遗传特质。

2、如权利要求 1 所述的方法，其特征在於：通过使由第二图象数据集表示的体液或组织样品的一部分与一试剂接触来产生生物显示信号。

3、如权利要求 1 所述的方法，其特征在於：产生代表候选模糊点的第一图象数据集的子集的步骤还包括：

收集表示体液或组织样品图象的彩色图象数据集；以及

将彩色图象数据集从天然彩色空间表示法转换成处理彩色空间表示法，其中通过分析候选模糊点的一个坐标信号可以容易地鉴定出这些候选模糊点。

4、如权利要求 3 所述的方法，其特征在於：天然彩色空间由其值代表红、绿和蓝强度的坐标信号表示，而处理彩色空间由其值代表色调、发光和饱和量的坐标信号表示。

5、如权利要求 3 所述的方法，其特征在於：还包括：

产生包括第一数据集的数据的潜在候选模糊点数据集，而第一数据集的一个坐标信号值在预定范围内。

6、如权利要求 5 所述的方法，其特征在於：还包括：

产生对应于潜在候选模糊点数据群的具有在预定范围内的尺寸的数据作为代表候选模糊点的第一数据集的子集。

7、如权利要求 1 所述的方法，其特征在於：产生代表稀少细胞

的第二数据集的子集的步骤还包括:

收集代表候选模糊点图象的彩色图象数据集; 以及

将彩色图象数据集从天然彩色空间表示法转换成处理彩色空间表示法, 其中施加有预定选择标准的图象特征在其一个或多个坐标信号处表现得更显著。

8、如权利要求 7 所述的方法, 其特征不在于: 还包括:

通过对于处理彩色空间的第一坐标信号进行处理来产生代表图象中的细胞面积的细胞掩模数据集。

9、如权利要求 8 所述的方法, 其特征不在于: 还包括:

通过对于处理彩色空间的第二坐标信号进行处理来产生代表含有图象中的选择细胞的面积的选择细胞数据集。

10、如权利要求 9 所述的方法, 其特征不在于: 还包括:

通过对于处理彩色空间的第三坐标信号进行处理来产生代表图象中的稀少细胞面积的稀少细胞数据集。

11、如权利要求 10 所述的方法, 其特征不在于: 天然彩色空间由其值代表红、绿和蓝的坐标信号表示, 而处理彩色空间由其值代表色调、发光和饱和的坐标信号表示。

12、如权利要求 11 所述的方法, 其特征不在于: 产生细胞掩模数据集的步骤还包括:

分析代表候选模糊点的彩色图象数据集的光度值直方图;

为另一处理步骤选择具有在直方图的最后峰值之前的最后谷值之上的光度值的数据; 以及

向所选择的数据施加闭合滤波器, 然后排除没有达到预定尺寸标准的面积, 然后施加盲区充填功能, 从而产生细胞掩模数据集。

13、如权利要求 11 所述的方法, 其特征不在于: 产生选择细胞数据集的步骤还包括:

分析细胞掩模数据集的饱和值直方图;

为另一处理步骤选择具有在直方图的第一峰值之后的第一谷值之上的饱和值的数据; 以及

向所选择的数据施加滤波操作过程, 以便减小成象后生现象。

14、如权利要求 11 所述的方法, 其特征不在于: 产生稀少细胞数

据集的步骤还包括:

为稀少细胞数据集选择与选择细胞数据集一致的数据, 该数据包括一预定尺寸范围内的数据群, 该数据群还具有预定色调值范围内的色调值。

15、如权利要求 10 所述的方法, 其特征在于: 还包括:

实质上只处理稀少细胞面积, 以便产生生物显示信号。

16、如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于: 还包括:

获得体液或组织涂片的图象;

检测所获得的图象中的生物显示信号; 以及

当与来自稀少细胞数据集的稀少细胞面积一致时, 记录生物显示信号的存在。

17、如权利要求 15 所述的方法, 其特征在于: 还包括:

获得体液或组织涂片的稀少细胞面积图象, 其中稀少细胞面积由稀少细胞数据集限定; 以及

记录稀少细胞面积中生物显示信号的存在。

18、如权利要求 1 所述的方法, 其特征在于: 还包括:

接收限定出体液或组织样品的第一面积图象的第三图象数据集;

接收限定出邻近第一面积的体液或组织样品的第二面积图象的第四图象数据集;

鉴定限定出两者之间界限的第三和第四图象数据集中所确定的特性; 以及

将第三和第四图象数据集汇合到第一图象数据集中, 限定出连接到体液或组织样品的组合第一和第二面积界限上的一个单一图象。

19、如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于: 还包括:

独立聚焦多个物镜, 通过这些物镜获得第一面积图象和第二面积图象。

20、如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于: 还包括:

基本上同时获得第三和第四图象数据集。

21、如权利要求 18 所述的方法, 其特征在于: 获得步骤还包括:

通过多个物镜将多个图象接收到多个 CCD 装置上;

将表示接收到 CCD 装置上的图象的信号传送给计算机系统。

22、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：还包括：

获得限定出组织样品的第一面积图象的第三图象数据集，第三图象数据集在产生第一图象数据集的子集的步骤中用作第一图象数据集；

在邻近第一面积处基本上同时获得限定出组织样品的第二面积图象的第四图象数据集，第四图象数据集在产生第一图象数据集的子集的步骤中用作第一图象数据集；

独立和平行地完成产生第三图象数据集和第四图象数据集上的第一图象数据集的子集步骤。

23、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：利用原位杂化、原位 PCR 或 PCR 原位法中的荧光产生生物显示信号。

24、如权利要求 1 所述的方法，其特征在于：体液样品是怀疑含有胎儿细胞这样的稀少细胞的母体血样，而待检测或诊断的胎儿细胞中的遗传特性是人染色体 21、18、13、X 或 Y.. 的三体性。

处理体液或组织样品用于图像信号数据检测和遗传诊断的方法

本申请要求1998年五月九日提交的美国临时系列申请No. 60/84,893的优先权, 该申请完整地包括于此用作引用。

本发明涉及计算机控制方法和装置, 该方法及装置用于获得并制备细胞样品以及对细胞界中感兴趣的稀少细胞进行鉴定, 从而根据细胞界中所选择出的稀少细胞的特性进行诊断。在一个重要的实施例中, 本发明涉及获得和制备母体的血样, 该血样含有产前诊断所依据的胎儿细胞。

根据DNA可对人类遗传障碍疾病进行产前诊断的发现业已导致开发出许多新的诊断方法。这些诊断方法可对患有遗传障碍的胎儿进行早期检测, 随后告知结论并进行手术干预。然而, 这些方法具有许多缺陷。与得到这些结论有关的每种新的诊断方法都要求得到分离的胎儿细胞样品, 以便可以检查或检验作为特殊遗传障碍标志的胎儿的DNA。这些现代化方法的缺陷主要是需要得到胎儿细胞样品。目前, 利用需要借助羊膜穿刺术或绒毛膜绒毛取样这些产科手术的侵入方法可得到胎儿细胞。这些高度专业化方法对胎儿用得很少, 但是对其却有相当大的危险性。在怀孕早期, 对胎儿的危险程度很高并且所得到的细胞数目很少。因此, 这些方法在怀孕18-20周时才适用。

一种可得到胎儿细胞的现代化方法是依赖于胎儿细胞泄漏到母体的循环系统中。通过简单地抽取母亲的血样, 就可以得到足量的基于DNA方法进行产前诊断所需的胎儿细胞材料, 这在理论上是可行的。从母体的血液循环系统中得到胎儿细胞可避免对胎儿的任何危险性, 并且能够在怀孕10-12周时进行。

业已在母体的血液循环系统中检测到的胎儿细胞包括滋养层、淋巴细胞及有核红细胞。滋养层由于其尺寸较大, 因此是第一种在母体的血液循环系统中被鉴定的胎儿细胞。然而, 有核红细胞作为遗传材料的来源对于产前诊断已经产生了最高的怀疑程度, 这是因为它们在成人的血液循环系统中非常稀少, 而在胎儿血液中却非常丰富并且寿

命有限。这些因素一起减小了区分胎儿细胞材料和母体细胞材料的误差。母体血液中胎儿细胞的循环寿命期限从几个星期（对于有核红细胞来说）到几年（对于淋巴细胞来说）。

胎儿细胞虽然稳固存在于母体的血液循环系统中，但是却非常稀少，这就严重限制了它们在诊断学上的利用价值。母体的血液循环系统内的胎儿细胞浓度范围据估计非常宽，从 10^5 个母体细胞中有 1 个胎儿细胞的高数量水平到 10^9 个母体细胞中有 1 个胎儿细胞的低数量水平。这样，10ml 的母体血样中一般含有 10 - 100 个胎儿细胞。在本说明书中，在经过任何处理的新鲜抽取的母体血样中发现的胎儿细胞浓度被称为胎儿细胞的“自然存在浓度”，该浓度一般（却不是必需的）在以上所述的范围内。还是在本说明书中，“非富集的母体血液”应该是指只含有自然存在浓度的胎儿细胞的母体血样。

由于在非富集母体血液中胎儿细胞的自然存在浓度相当低，以致于为了得到能够显示诊断结果的胎儿细胞样品，所用的现代技术包括将样品中的胎儿细胞从母体细胞中物理分离出来。其实，现代技术是那些涉及到例如通过除去多余的母体细胞而不舍弃胎儿细胞来浓缩样品中的胎儿细胞即富集样品的方法。这些方法相当难以完成，经常分离不出足够量的能够显示诊断结果的胎儿细胞，而有时又不能提供足够量的其纯度适于进行后序的可靠诊断的未损坏的胎儿细胞样品。

本发明希望提供一种用于检测和诊断组织样品中稀少细胞类型的计算机控制方法和装置，所述诊断是基于稀少细胞的特性进行的。本发明还希望提供一种用于检测血液制备中的胎儿细胞并基于胎儿细胞进行可解决上述鉴定问题的产前诊断的计算机控制方法和装置，正如本领域的普通技术人员在阅读了本发明的说明书之后所显而易见的，本发明还克服了其它一些难题并满足了其它一些诸如此类的目的。

本发明通常提供了一种处理体液或组织样品图象数据的计算机执行方法，该方法包括产生代表在第一放大倍数所摄的体液或组织样品图象的第一图象数据子集，该子集表示含有稀少细胞的候选模糊点（candidate blob），所述稀少细胞产生代表在第二放大倍数所摄的

候选模糊点图象的第二图象数据子集，该第二数据子集表示稀少细胞并将第二数据子集贮存到计算机存储器中。

一般来说，通过利用计算机微观系统观察体液或组织样品中的细胞单分子层的光场以便检测表示稀少细胞存在的信号指示可产生第一图象数据子集。

该方法还包括在对应于第一图象数据子集中所表示的每一候选模糊点的部位使体液或组织样品与一试剂接触以便产生医学显示信号。该方法的优点是无需再处理那些不产生代表候选模糊点的第一数据子集的体液或组织样品。然后测定该信号，从而判断其是否是显示信号水平。第一和/或第二图象数据子集可转换成更适于用此处所描述的计算机控制和处理的表示信号。在一优选实施例中，图象数据由RGB（红绿蓝）信号转换成HLS（色调发光饱和）信号。利用滤波器和/或屏蔽可区分那些满足预定标准的细胞而去掉那些不能满足预定标准的细胞，并因此鉴别出稀少细胞。

本发明另一方面提供了一种操纵实验室服务的方法，该方法包括以下步骤：首先接收体液或组织样品，其次产生体液或组织样品模糊点，然后操作计算机显微镜，从而软件程序可自动鉴别出模糊点中的稀少细胞并检测稀少细胞中的医学显示信号。本发明的另一方面是提供了一种包括计算机读取存储介质的计算机软件产品，该介质中固定有一系列的指令，由计算机执行这些指令，可指导完成检测和诊断稀少细胞类型这些步骤。这些细胞包括：产生代表在第一放大倍数所摄的体液或组织样品图象的第一图象数据子集，该子集表示含有稀少细胞的候选模糊点（candidate blob），所述稀少细胞产生代表在第二放大倍数所摄的候选模糊点图象的第二图象数据子集，该第二数据子集表示稀少细胞并将第二数据子集贮存到计算机存储器中。

一般来说，可如上所述建立第一图象数据子集。这些步骤还包括在对应于第一图象数据子集中所表示的每一候选模糊点的部位使体液或组织样品与一试剂接触以便产生医学显示信号。该方法的优点是无需再处理那些不产生代表候选模糊点的第一数据子集的体液或组织样品。该方法具有一光学步骤，利用该步骤可测定信号，从而判断其是否是显示水平。另一光学步骤包括将第一和第二图象数据子集之

一或二者都转换成更适于用此处所描述的计算机控制和处理的表示信号。在一优选实施例中，图象数据由 RGB（红绿蓝）信号转换成 HLS（色调发光饱和）信号。利用滤波器和/或屏蔽可区分那些满足预定标准的细胞而去掉那些不能满足预定标准的细胞。

按照本发明的一个方面，提供了一种用于诊断过程中的细胞样品的制备方法。得到细胞样品并以单层的形式固定到基质上，细胞样品包括以每 10000 个细胞中有不大于 1 个的量（即不大于 0.01%）存在的稀少细胞。利用可信号指示稀少细胞的存在计算机微观系统观察覆盖至少一部分细胞样品的光场。检测信号并鉴定被检测信号所处位置的坐标，以便进行诊断。在一优选实施例中，稀少细胞以不大于全体细胞 0.001% 的量存在。在另一实施例中稀少细胞以不大于 0.0001%、0.00001%、甚至 0.000001% 的量存在。

在一特别重要的实施例中，稀少细胞是来自母体血液的细胞样品中的胎儿细胞。在一优选实施例中，样品只含有不大于 0.001%、0.0001%、0.00001%、0.000001%、甚至 0.0000001% 的自然存在浓度的胎儿细胞。

在本发明的另一特殊实施例中，待检测和诊断的稀少细胞类型是从动物或病人的细胞或组织样品中发现的癌细胞。样品可以是血液或含有细胞的其它体液或组织活检。正如对此实施例所描述的，在以下第五部分所描述的癌细胞标示物（例如 GM4 蛋白、末期蛋白或核酸、以及 p53 蛋白或核酸）可用于以一种本发明的特殊实施形式测定到的方式产生第一或第二信号。

在本发明的一个实施例中，当稀少细胞存在于样品中时，本发明的方法在不小于 80% 的频率下检测稀少细胞类型。在另一实施例中，检测频率不小于 85%、90%、95% 和 99%。

按照本发明的一个特别重要的实施例，提供了一种用于诊断过程的血样的制备方法，该方法包括：制备含有自然存在浓度的胎儿细胞的非富集母体血样涂片；其次利用可信号显示胎儿细胞的存在计算机微观系统观察覆盖部分涂片的光场；检测所述信号；然后鉴定涂片中检测信号所处位置的坐标，以便进行诊断。

在一实施例中，还要处理信号以便表示稀少细胞的形态测定。在

另一实施例中，用标记物处理细胞以便加强稀少细胞与其它细胞的光学区分。在此实施例中，信号例如可来自于选择性键合到稀少细胞上的标记物。在另一实施例中，诊断过程涉及到移动被鉴定的坐标并放大光场一直到图象是被分离出的稀少细胞的图象为止。

在一些实施例中，光场逐步移到基本上覆盖了所有细胞的连续细胞部分之上。例如通过在计算机微观系统的控制下相对于计算机微观系统的透镜移动基质上的细胞来达到这一目的。在另一实施例中，鉴定得到第一信号的坐标，然后在鉴定坐标之后专门接触那些坐标处的稀少细胞。

按照本发明的另一方面，提供了一种从细胞样品中得到具有相当于细胞样品中稀少细胞的诊断显示标志的信号的方法。稀少细胞以每10000个细胞中具有不大于1个细胞的量存在于样品中。该方法包括制备固定于基质上的单层细胞样品。稀少细胞与一试剂接触以便产生诊断信号，该诊断信号具有诊断显示标志。用计算机微观系统观察单层细胞，以便得到诊断信号。在另一实施例中，所定位的信号用于鉴定稀少细胞，并且细胞定位之后得到检测信号

在一实施例中，稀少细胞以每10000个细胞中具有不大于1个细胞的量（即不大于细胞的0.01%）存在于样品中。在另一实施例中，稀少细胞以不大于0.001%、0.00001%或者甚至0.000001%的量而存在。在一特别重要的实施例中，稀少细胞是来自母体血液的细胞样品中的胎儿细胞。优选的是，样品只含有不大于0.001%、0.0001%、0.00001%、0.000001%、甚至0.0000001%的自然存在浓度的胎儿细胞。

按照本发明的一个重要的实施例，提供了一种得到含有自然存在浓度的胎儿细胞的非富集母体血样和具有相当于胎儿细胞的诊断显示标志的信号的方法。该方法包括：制备非富集母体血样涂片；利用计算机微观系统观察涂片以便得到指示胎儿细胞存在的第一信号；使胎儿细胞与一试剂接触，从而产生第二信号，该第二信号具有诊断显示标志；以及利用计算机微观系统观察胎儿细胞以便得到第二信号。在一实施例中，涂片可包括至少250 μ l的非富集母体血液，甚至可包括至少500 μ l的非富集母体血液。

如上所述，还要处理第一信号，以便表示稀少细胞的形态测定。同理，利用标记物处理细胞以便加强稀少细胞与其它细胞（例如母体细胞）的光学区分。为了达到这一目的，第一信号来自于选择性键合到稀少细胞（例如胎儿细胞）上的标记物。同样，如上所述，观察步骤涉及到将光场逐步移到连续细胞部分之上，例如通过在计算机微观系统的控制下相对于计算机微观系统的透镜移动细胞或基质来达到这一目的。

在上述任一实施例中，在基质上制备细胞并相对于基质校正坐标系，以便使在一个步骤中所鉴定的稀少细胞的坐标可返回到随后的另一步骤中。同样，在某些重要的实施例中，基质的长度是其宽度的10倍，基质基本上在一个方向上延长。其长度甚至是宽度的20倍。基质可以是弹性膜，在一重要实施例中，基质是能够承载相当大体积细胞（例如来自于相当大体积的涂覆母体血液）的加长弹性膜。

在上述任一实施例中，可选择第一信号和第二信号，由此使得当这两个信号都存在时不会互相屏蔽。同样，在上述任一实施例中，可利用原位PCR或PCR原位或荧光原位杂化法（FISH）产生第二信号。

在一重要实施例中，基质是其上制备有细胞样品的许多个基质例如多个母体血液涂片，每一涂片包括至少5 μ l的样品。鉴定含有稀少细胞的基质（其中可得到第一信号）。然后，只处理已经鉴定的含有稀少细胞的基质或多个基质，以便产生第二信号。

按照本发明的又一方面，提供了一种利用含有自然存在的胎儿细胞的非富集母体血样进行胎儿诊断的方法。该方法包括：制备至少250 μ l非富集母体血样的涂片；鉴定涂片中的胎儿细胞；使胎儿细胞与一产生诊断信号的试剂接触；以及观察诊断信号。在一重要实施例中，鉴定步骤包括观察涂片中的细胞、利用计算机微观系统以及测定由指示胎儿细胞存在的可观察细胞标志产生的信号。这些重要实施例指示出母体血液的体积、基质的结构以及如上所述的那些因素。

按照本发明的再一方面，提供了一种从含有自然存在浓度的胎儿细胞的非富集母体血样中得到基本上分离的胎儿细胞的图象的方法。该方法包括：制备至少250 μ l的非富集母体血样涂片；利用可显示胎儿细胞存在的信号标志的计算机微观系统观察涂片；鉴定所观察

信号处的坐标；将被鉴定的坐标移动到包含胎儿细胞图象的光场中；以及放大光场一直到图象是被分离出的胎儿细胞的图象为止。这些重要实施例指示出母体血液的体积、基质的结构以及如上所述的那些因素。

按照本发明的又一方面，提供了一种筛选含有自然存在浓度的胎儿细胞的非富集母体血样中的胎儿细胞的装置，该装置包括：其上具有至少 250 μ l 母体血液涂片的弹性膜。在一实施例中，弹性膜上具有至少 500 μ l 的母体血液涂片。在一实施例中，弹性膜是一加长膜，其长度至少是宽度的 10 倍。特别优选的是，弹性膜包括标记坐标，此处所描述的计算机微观系统由此可将细胞定位成相当于膜上的一个点，如果需要的话，随后还可使细胞返回。

按照本发明的另一方面，提供了一种细胞样品中所含的稀少细胞的筛选装置，细胞样品中每 10000 个细胞中含有不大于 1 个的稀少细胞。该装置是一其上固定有细胞样品的弹性膜，其中弹性膜至少有 5 英寸长。在一优选实施例中，弹性膜的长度至少是其宽度的 10 倍。在另一重要实施例中，弹性膜包括标记坐标，此处所描述的计算机微观系统由此可将细胞定位成相当于膜上的一个点，如果需要的话，随后还可使细胞返回。

按照本发明的又一方面，提供了一种用于将材料分配到载玻片的一个特定位置上的装置。该装置包括用于检测指示细胞样品中存在稀少细胞的信号的微观系统。该装置还包括用于鉴定光场中稀少细胞的坐标的装置。该装置还附带有用于分配一定体积材料的分配器和用于使分配器向坐标移动的装置，由此使材料可分配到稀少细胞上。所分配的材料是诸如标记物、PCR、引物等试剂。

按照本发明的另一重要实施例，通过使用可提供“合成”图象的装置或系统可满足在尽可能短的时间内筛分大面积的显微制样的需要。这是基于同时使用了一排设置在一支撑系统上并且能够在显微制样上聚焦的计算机控制的物镜。每一物镜与电荷耦合摄像器件相连（此处称作 CCD 摄像机），该摄像机与安装在主机中的图象获取硬件相连。图象贮存在计算机存储器中并以适当的左右方式合成，从而在计算机存储器中形成了“合成”图象。利用任何种类的成象方法还可

将此“合成”图象处理成一体，以便检测有异议的特殊性质。所述系统的显著优点在于其能够同时从许多物镜中获取图象，这样就以与所用的物镜数成反比的方式将处理大面积样品所需的时间减为最小。

“合成”系统利用透射或反射光可处理任何种类的显微制样。尤其有用的是，例如为了处理大量用于筛分和/或诊断目的等的显微生物制样，可对大量样品强制进行显著的时间限制。

在附图中，相同的数字符号表示相同的部件。

图 1 是总结本发明的一个方法的流程图；

图 2 是本发明的一个方面的实施例中所用的分析系统的方框图；

图 3 是可检测第一信号的阶段 I 的流程图；

图 4A 和图 4B 一起表示可检测第一信号的阶段 II 的流程图；

图 5 是检测第二信号的流程图；

图 6 是实施本发明的各种不同装置的示意图，利用了连续涂片技术；

图 7 是本发明的一个方面的实施例中所用的分析和时间分配系统的方框图；

图 8 是多个物镜显微系统的草图；以及

图 9 是图象“合成”方法。

以下通过结合附图阅读本发明的详细描述及其不同的实施例，本发明将更好理解。此处是将胎儿细胞作为稀少细胞而将血液作为体液或组织样品来详细描述本发明的，但是本领域的普通技术人员将清楚地意识到，本发明事实上可用于基于任何稀有细胞类型和任何体液或组织样品的诊断方法中，而这些样品可能在基质上产生单层细胞。

本发明范围内的体液或组织样品包括但不限于血液、组织活检、脊液、脑膜液、尿液、牙槽液等。对于细胞不是以单层形式自然存在的组织样品，可利用本领域的技术人员所公知的标准技术来分离细胞。这些技术包括但不限于组织的胰蛋白酶、胶原酶或 dispase 处理。

在一重要的特殊实施例中，本发明用于检测和诊断胎儿细胞。我们探讨的方法与别人探索的基于胎儿细胞所进行的产前诊断非侵入方法恰恰相反。我们的方法无需浓缩母体血液中的胎儿细胞浓度，而涉及到鉴定非富集母体血样中的胎儿细胞，随后基于所鉴定的胎儿细

胞原位实施诊断程序。

如图 1 的流程图所示, 本发明的新方法总结如下:

- 用非富集的母体血液 101 制备一个或多个血片;
- 筛分一个或多个血片一直到鉴定出预定数量的胎儿细胞(例如有核红细胞)并限定出其坐标 103 为止; 以及
- 处理鉴定出胎儿细胞的涂片或涂片坐标, 诊断胎儿细胞 105 中某一特定遗传性质的存在和缺乏。

在该方法中, 给两个信号进行了定义, 此后称作第一信号和第二信号。此处所用的“信号”作为一种能够被检测和鉴定并由此承载信息的物理表现形式, 应该具有其最宽的含义。一个简单和有用的信号是由选择性键合到感兴趣的结构上的荧光染料发射的光线。该信号指示出该结构的存在, 而如果没有荧光染料, 这是很难检测的。

筛分(screening) 103 是基于第一信号。此第一信号在本实施例中指示出细胞的特性, 可由键合到例如针对血红蛋白 e 链(即胚胎血红蛋白)的抗体上的荧光染料产生。另外, 例如, 每一细胞类似于有核红细胞特征形态学的度量用细胞识别算法来辨别, 可作为第一信号。在另一实施例中, 第一信号是利用曙红和酸性苏木精染色之后胎儿血红蛋白特征颜色存在的测量值。现在应该明显地意识到, 任何可检测到的指示胎儿细胞存在的标志都可作为第一信号, 而并不局限于以下所述的几种表现形式。

诊断 105 是基于第二信号。此第二信号在本实施例中指示出所检验的某一特定遗传性质的存在, 可由原位 PCR 放大或 PCR 原位杂化或 FISH 产生。发射这两个信号的细胞(即胎儿细胞并含有被检验的遗传性质)将被记录。一直坚持记下所检测的第一和第二信号的数目和强度。

在一实施例中, 用 FISH 检测特定的核酸序列。在一实验例中, FISH 包括使稀少细胞类型(例如胎儿细胞)的变性试验 DNA 与变性二氧(DIG)标记的基因探针杂化。洗涤含有试验 DNA 的样品并使其键合到耦合有荧光团的抗 DIG 抗体上。可任选的是, 通过与结合有荧光团的抗 Fab 抗体保温可加入第二层荧光团(例如 FITC)。在一优选实施例中, FISH 包括使稀少细胞的变性 DNA 与含有 DNA 序列的荧光标记

探针杂化，其中所述 DNA 序列与直接用某一荧光团标记的特定靶 DNA 区域同源。

利用在光场中将感兴趣的物体与其它物体和背景区分开来的装置和方法进行自动样品分析。1994 年 10 月 4 日公开的美国专利 No. 5, 352, 613 中公开了一个自动系统的例子。另外，物体一旦被鉴定，就可测定和贮存其颜色（即组成物体的象素的红、绿、蓝成分的合成）或者其它与物体相关的感兴趣的参数。

以下第 6 部分的实施例中尤其是第 6.2.1、6.2.2 和 6.3 部分描述了自动样品分析装置和方法的另一例子，并在附图 3-5 中示出。

在本发明的一个实施例中，包括自动显微样品检查系统的系统有：

- 样品贮存和加载及卸载模块
- 来回传送样品于自动平台上的样品传送机构，该平台使样品移动到显微物镜阵列之下
- 一排 CCD 摄像机
- 包括硬件、多个控制显微系统的所有机械部件的控制器和连有 CCD 摄像机的高速图象处理单元的处理单元。

计算机控制系统的这个实施例的创新之处在于一排两个或多个具有相同光学性质的物镜（如图 8 所示）。这些物镜排成一行，每一物镜都具有自己的 Z 轴运动机构，从而其可以各自聚焦（801）。该系统配有合适的机构，从而使多个物体支撑件可互换，以便适应普通单镜头显微镜所能覆盖的同种倍率需求。通常光照显微镜物镜的倍率范围在 1X-100X 之间。

每一物镜与各自的 CCD 摄像机（803）相连。摄像机的视野特性可使其获得物镜所提供的光场的整个区域。

每一摄像机与一图象获取装置（804）相连。其安装在主机中。对于所获得的每个光场，计算机记录显微样品在其上的物理位置。提供利用计算机控制的 x-y 机械平台（805）可达到此目的。摄像机提供的图象被数字化并贮存在主机的存储器中。每一物镜具有电流系统，可同时向计算机提供图象，而每一图象都包括某一部分样品面积。应该适当地校正物镜的色差，以便使图象沿其整个面积具有稳定

的质量特性。

图象的物理距离相互不同。该距离是物镜设置距离的作用结果并取决于物镜的物理尺寸。它还决定于物镜的性质即数值孔径和放大率规格，这些性质会影响所获得的光场面积。因此，由于物镜的放大率/数值孔径不同，所获得的图象的物理位置也将不同。

在使用时计算机将保持物镜阵列的特征磁道以及监测平台的位置。可利用每一图象的贮存特性以使校正位置的图象与图9所示的计算机存储器中的虚象即“合成”图象匹配。

例如，当主机启动时，样品平台移动到初始 (x_1, y_1) 位置。在该位置获得图象之后，平台以侧向方式移动到一个新位置 (x_2, y_2) 。然后获得一系列新的图象并贮存起来。如图9所示，在步骤1中，用数字“1”表示的图象片段被捕获并贮存起来。在步骤2中，片段“2”被贮存。在步骤3中，片段“3”被贮存。当获得连续的图象片段时，在计算机存储器中就“合成”了全象。

控制上述结构的主机系统由通过合适的装置驱动器控制系统的所有机械部件的软件系统驱动。软件还包括设计得当的图象组合法，该方法组合计算机存储器中的数字化图象并将所合成的图象提供给处理单元以进行下一步运算。通过图象分解，可检测到特定样品的合成与图象处理特性。

在本发明的所有自动样品实施例中，如果首先测定第一信号的产生，其次鉴定细胞的特性，那么将利用自动光学显微镜观察一个或多个涂片，以便勾画出所需数目的胎儿细胞的坐标图。只有那些发现有胎儿细胞的涂片才需要处理，以便产生第二信号，来鉴定所试验的特定遗传性质的存在。自动图象分析法用于搜索在胎儿细胞的预定坐标处以及控制母体细胞的预定坐标处是否存在第二信号。该过程也可反过来，即首先观察遗传异常的信号，然后观察细胞发射的信号以判定其是否是胎儿细胞。甚至可同时观察这两个信号，搜索在一个坐标处是否同时存在两个信号或者甚至只存在一个信号，而该信号是两个分量交叉的结果（例如第一信号与配对‘信号’的淬火，第一信号用于鉴定细胞类型，而配对‘信号’用于鉴定遗传异常）。

第一和第二信号产生的要求和限制相对简单。用于产生第一信号

的材料和技术对用于产生第二信号的材料和技术的不利干扰程度不会影响诊断。它们对待测细胞的损害或改变程度也不会影响诊断。最后，对细胞需要或要求进行的其它任何处理程序对用于产生第一和第二信号的材料或技术的干扰程度都不会影响诊断。在这个限制范围内，可使用任何适宜的第一和第二信号发生器。

本发明的实施例的特征在于：(i) 无需富集（或者是如果已经部分富集则再进一步富集）母体血液中的胎儿细胞浓度，鉴定非富集母体血样中的胎儿细胞并用于下一个处理程序中；以及(ii) 在一些实施例中只在已经染色和处理过的或者其中已经检测到胎儿细胞的涂片或涂片坐标上进行适当的单个细胞检测方法例如原位 PCR 和/或 PCR 原位杂化法。

虽然在一重要实施例中所用的母体血液含有自然存在浓度的胎儿细胞，但是本发明意指还包括胎儿细胞已经部分富集的母体血液。根据已有技术，本发明的目标是得到尽可能多的富集液，以便获得比每 1000 母体细胞中有 1 个胎儿细胞大的胎儿细胞浓度。本发明的目标尤其是将胎儿细胞从母体细胞中完全分离出来。按照本发明，所用的细胞样品中稀少细胞以每 10000 个细胞中有不大于 1 个（即不大于 0.01%）的数量存在。这样，可利用简单的处理方法例如简单的分馏方法（诸如离心或密度梯度）等来部分富集母体血样中的胎儿细胞。当使用含有胎儿细胞的细胞样品时该处理方法在本发明的范围之内，此时胎儿细胞的浓度不大于 0.01%。如上所述，在一些非常重要的实施例中本发明所采用的稀少细胞浓度为 0.001%、0.0001%、0.00001%、0.000001%，甚至 0.0000001%。母体血液中胎儿细胞的典型浓度在 10^5 个母体细胞中有 1 个胎儿细胞至 10^9 个母体细胞中有 1 个胎儿细胞之间。因此，在母体血液中胎儿细胞典型自然出现的整个浓度范围内本发明都是可用的。

在本发明的一个特殊实施例中，当稀少细胞类型存在于样品中时，本发明的方法以不小于 80% 的频率检测稀少细胞类型。在其它实施例中，检测频率不小于 85%、90%、95% 和 99%。

除了检测正发育胎儿的遗传异常之外，上述方法还可用于必需检测稀少细胞的任何情形。尤其是，本发明可用于检测来自稀少细胞信

号的任何情形，其中稀少细胞以每 10000 个其它细胞中有不大于 1 个的浓度存在。本发明特别适合用于这样的条件下，即稀少细胞与其它细胞可表型区分开，由此先利用第一信号鉴定稀少细胞，然后利用第二信号测定所鉴定细胞的遗传性质。

利用本发明的稀少细胞检测技术可诊断任何染色体异常和孟德尔遗传特性。唯一的前提是要知道潜在的分子缺陷。利用单个荧光团标记单个等位基因可产生能够同时检验的突变数目上限，然而利用组合化学可大大增加能够同时标记和检测的等位基因特异性突变的数目。本发明范围内的染色体异常包括但不限于三染色体 21、18、13 和六染色体异常例如 XXX、XXY、XYY。利用组合化学，本发明的方法可用于诊断在遗传障隘和癌症中所观察到的许多移位。本发明范围内的孟德尔遗传障隘疾病包括但不限于膀胱纤维变性、血色病、高脂血症、马方综合症和其它遗传性障隘疾病（例如结缔组织、血红蛋白病、家族性黑蒙性综合症或突变已知的任何其它遗传障隘疾病。利用组合化学染料同时标记和检测许多等位基因，由此可检测到普通障隘疾病（例如哮喘）的预布置遗传和/或针对癌症（例如前列腺癌、乳腺癌、结肠癌、肺癌、白血病、淋巴瘤等）的几个分子标记物的存在。

本发明的一个特别重要的用途是用于癌症领域。特殊类型的癌细胞可从非癌细胞背景下在形态上识别出来。因此癌细胞的形态可用作第一信号。热振荡蛋白还可作为大多数恶性癌症的表达标记物。可利用特异于热振荡蛋白的标记抗体例如荧光标记的抗体来产生第一信号。同样，可利用特异于某些癌症或某些组织的抗原（例如前列腺特异性抗原）和特异于癌症或组织抗原（例如前列腺特异性抗原）抗体来产生指示这些癌细胞存在的第一信号。

一旦由第一信号鉴定出癌细胞，则产生第二信号用于提供更多的有关癌症的信息。例如，乳腺癌对寿命的危险性在 BRCA1 或 BRCA2 位发生起始突变的女人中达到 80 - 90%。这些基因的各种突变都是公知的并且业已报导过。

前列腺癌在某种程度上对于病理学家来说其表现是独特的，即由于其组织的紊乱排列而难以确定诊断标准。为了将该疾病的病理学与其自然历史相关联起来，重要的是分析和记录前列腺癌中发现的基因

异常。这些基因异常包括公知的 P53、ras、Rb、循环 (cyclin-dependent) 激酶、致癌基因和肿瘤校正基因的突变。已知在大颗粒淋巴细胞增生中具有 T 细胞受体基因重排。已知在急性成淋巴细胞白血病和非何杰金淋巴瘤中具有 T 细胞三角区基因重排。

这样,按照本发明在其它细胞的背景下可对稀少癌细胞进行鉴定和定性。其特征在于:决定进行癌细胞是否存在的诊断、确定癌症的类型、通过测定是否存在与癌症的危险性等有关的基因变化来测定癌症的危险。正如本领域的普通技术人员所意识到的,以下标记物中的一些既可用作第一信号也可用作第二信号,这取决于本发明的目的。这些标记物包括:

- 人肿瘤特异性抗体 GM4。该抗体优选的是可与黑瘤和成神经细胞瘤反应。

- 骨形态蛋白质 (BMPs)。骨转移是前列腺癌中的普遍现象并且在前列腺癌细胞中表达出一些 BMPs。

- 生长调节基因。生长调节基因在结构和表达形式上的异常可导致恶性变异和肿瘤发展。

- 蛋白酪氨酸激酶。这种激酶在食管癌中过分表达并且在增生调节中发挥重要的作用。

- 端粒酶 (hTERT)。在一些癌组织中出现了 hTERT 高位表达。

- p53、c-erbB-2 和 p21ras。这些基因在卵巢瘤中过分表达。卵巢瘤的发展是几个癌症发生基因作用的最终结果。

- 原始致癌基因中的 BCL-2 族。这些基因是 apoptosis 的临界调节剂,它们的表达形式在人的癌症 (包括大多数类型的白血病和淋巴瘤中的某一些) 中频繁地变化。

- eKi-ras 和 c-myc。这些基因的突变与肿瘤发起和直肠癌的发展有关。

- APC、p53 和 DCC。这些基因关系到结肠直肠肿瘤的致癌作用。处理方法需要与所公知的肿瘤基因图谱配合。

基因变化的标记物能够评估癌症的危险。它们可提供有关暴露给致癌剂的信息。还可早期检测由暴露给致癌物所引起的变化并鉴定其癌症发展具有相当高危险性的个体。这些标记物包括膀胱癌中染色体

9上的LOH以及恶性肿瘤发生中所检测到的染色体1p的遗失和染色体7、17和8的增加/损失。

肺癌的发展要求许多遗传变化。致癌基因的活化形式包括K-ras和myc。肿瘤校正基因的失活形式包括Rb、p53和CDKN2。产生异常的特异性基因的鉴定对于早期检测预定要变成恶性的细胞并鉴定药物和基于基因疗法的潜在目标是有用的。

成视网膜细胞瘤途径中的基因突变关系到许多肿瘤类型的形态。肿瘤发展期涉及的两个临界成分是p16/CDKN2A和CDK4。前者的异常形式在包括黑素瘤的许多癌症中都得到了很好的证实。而后者的异常形式却很少见。

四个失配修复基因(hMSH2、hMLH1、hPMS1和hPMS2)之一的突变占70%的HNPCC。

染色体11p15.5在维尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、肾上腺皮质癌和肺、卵巢及前列腺癌中是显现LOH的重要肿瘤校正基因区域。

通过独特的基因融合序列在数字上少有的白血病细胞的鉴定包括MLL-AF4和PML/RAR(在急性早幼粒细胞白血病中)。

已知在大颗粒淋巴细胞增生中具有T细胞受体基因重排。

已知在急性成淋巴细胞白血病和非何杰金淋巴瘤中具有T细胞三角形基因重排。

FAB是由导致结肠直肠粘膜的许多腺瘤的APC基因突变引起的。

对本发明的描述涉及到观察“单层”细胞。单层用在此处具有特殊意义。它不要求群集，但涉及到单个细胞悬浮体。它简单地指细胞的排列使其不会一个堆积在另一个的顶部，虽然所有细胞是彼此分离的。这样，单层可以是一个细胞悬浮体的涂片或一薄层组织。可利用任何固体或剥脱细胞技术。

对本发明的描述还涉及到对一对信号的鉴定，其中一个信号可鉴定靶稀少细胞(例如胎儿细胞)，而另一信号有益于评估诸如具有遗传缺陷的胎儿细胞这样细胞的状态。应该理解，按照某些实施例，只需检测一个信号。例如，当胎儿细胞承载Y染色体时，诊断是针对Y染色体的异常进行的，其次鉴定遗传异常的信号才与鉴定胎儿细胞的信号一致。而在另一例子中，单个信号是用于观测特性是隐性特性的

情形。一对信号可用于检测两个等位基因的存在或者以下情形的存在，即由两个或多个不同基因突变的存在来进行诊断的情形。在这些情形中这对信号（甚至几个信号）可鉴定表型和具有该表型的细胞。这样的实施例对于本领域的普通技术人员来说是显而易见的。

6、实施例部分

6.1. 涂片的制备

由置于玻璃显微片上的一份 10 μ l 全血制备涂片。涂片可由脐带血和母体循环血液制备并进行空气干燥。

6.1.1. 细胞固定

在利用原位 PCR 或 PCR 原位杂化进行细胞渗透之前涂片的固定是在以下三个条件之一下进行的：（i）涂片在冰冻甲醇中固定 10 分钟 - 16 小时。（ii）涂片在冰冻 10% 的缓冲福尔马林中固定 10 分钟 - 16 小时。（iii）涂片在 2% 的仲甲醛中固定 10 分钟 - 16 小时。固定之后，涂片在室温下用磷酸缓冲盐水冲洗三次、10 分钟。然后对涂片进行空气干燥。

6.1.2. 细胞染色

多色染色：涂片用赖特白血球着色剂覆盖并在室温下保温 1 - 2 分钟。然后加入蒸馏水（2.5ml）以便稀释着色剂并在室温下继续保温 3 - 6 分钟。然后用流动水快速冲掉着色剂并将 1: 10 稀释的吉姆萨染剂加到玻片上。在室温下保温 5 分钟，然后用流动水快速冲掉染剂。再对涂片进行空气干燥。

抗体染色：用抗胚胎血红蛋白（血红蛋白链）单克隆抗体覆盖涂片并在室温下保温 1 - 3 小时。然后玻片在室温下用磷酸缓冲盐水洗涤两次、5 分钟。然后加入第二抗体（结合到藻红素上的抗鼠抗体）并使玻片在 37°C 下保温 30 分钟。然后玻片在室温下用磷酸缓冲盐水冲洗两次、5 分钟并进行空气干燥。

胎儿血红蛋白染色：涂片在 80% 乙醇中固定 5 - 10 分钟，其次用龙头水冲洗并空气干燥。在 37°C 水浴中在科普林缸内预加热柠檬酸 - 磷酸盐缓冲剂（37.7ml、0.1M 的柠檬酸，12.3ml、0.2M 的 Na₂HPO₄，pH3.3）。然后将所固定的涂片加入到科普林缸内并在 37°C 下保温 5 分钟。然后用龙头水冲洗涂片并用 0.1% 苏木精染色 1 分钟。再用龙

头水冲洗涂片并用 0.1% 曙红染色 1 分钟。用龙头水最后冲洗涂片并进行干燥。

细胞渗透：通过在蛋白酶 K (1-5mg/ml 的磷酸缓冲盐水) 或胃蛋白酶 (2-5mg/ml 0.01M 的盐酸) 中保温可完成细胞渗透。保温是在室温下进行 1-30 分钟。渗透之后，涂片在室温下用磷酸缓冲盐水洗涤 5 分钟，再在室温下用 100% 乙醇洗涤 1 分钟。然后对涂片进行空气干燥。

PCR 原位杂化：为了进行 PCR 原位杂化，用 50 μ l 的放大液覆盖涂片。放大液在含水的封闭剂中包括 10mM Tris-盐酸 (pH8.3)、90mM 的氯化钾、1-5mM 的氯化镁、200 μ M 的 dATP、200 μ M 的 dCTP、200 μ M 的 dGTP、200 μ M 的 dTTP、1 μ M 前端引物、1 μ M 反向引物和 5-10 单位的耐热 DNA 聚合酶。然后将玻璃盖板放到放大液上并将玻片转到热循环器中。在 94 $^{\circ}$ C 下完成 4 分钟的初始变性步骤之后，使玻片进行 25-35 周期的放大，其中每一周期放大都包括 94 $^{\circ}$ C 下变性 1 分钟、55 $^{\circ}$ C 下退火 1 分钟以及 72 $^{\circ}$ C 下拉伸 1 分钟。其次通过在室温下将玻片在磷酸缓冲盐水中保温 10 分钟而去掉盖板，再使玻片进行空气干燥。然后加入荧光素标记的低核苷酸探针杂化缓冲剂并用玻璃盖板覆盖玻片，在 94 $^{\circ}$ C 下保温 10 分钟，再在 37 $^{\circ}$ C 下保温 1 小时。然后通过室温下将玻片在磷酸缓冲盐水中保温 10 分钟而去掉盖板，其次玻片在室温下用磷酸缓冲盐水洗涤两次、5 分钟。用蛋白封闭液 (1% 牛血清白蛋白、2.5% 羊血清、0.2% 吐温-20) 覆盖玻片并在室温下保温 10 分钟。然后去掉盖板并在室温下用磷酸缓冲盐水洗涤玻片 3 次、5 分钟。用鼠抗荧光素单克隆抗体覆盖涂片并在室温下保温 20 分钟。其次倒掉溶液并在室温下用磷酸缓冲盐水洗涤玻片 3 次、5 分钟。然后用生物素化羊抗鼠 F(ab)₂ 覆盖涂片并在室温下保温 20 分钟。倒掉溶液并在室温下用磷酸缓冲盐水洗涤玻片 3 次、5 分钟。用结合有抗生蛋白链菌素的碱性磷酸酶覆盖涂片并在室温下保温 20 分钟。倒掉溶液并在室温下用磷酸缓冲盐水洗涤玻片两次。将碱性磷酸酶底物溶液 (50mg/ml BCIP、75mg/ml NBT) 加到涂片上并在 37 $^{\circ}$ C 下保温 10 分钟-2 小时。然后将玻片在室温下用蒸馏水洗涤两次并进行空气干燥。

原位 PCR: 为了进行原位 PCR, 用 50 μ l 放大液覆盖涂片。放大液在含水的封闭剂中包括 10mM Tris - 盐酸 (pH8.3)、90mM 的氯化钾、1-5mM 的氯化镁、200 μ M 的 dATP、200 μ M 的 dCTP、200 μ M 的 dGTP、0.5 μ M 的 [R110] dUTP、1 μ M 前端引物、1 μ M 反向引物和 5-10 单位的耐热 DNA 聚合酶。然后将玻璃盖板放到放大液上并将玻片转到热循环器中。在 94 $^{\circ}$ C 下完成 4 分钟的初始变性步骤之后, 使玻片进行 25-35 周期的放大, 其中每一周期的放大都包括 94 $^{\circ}$ C 下变性 1 分钟、55 $^{\circ}$ C 下退火 1 分钟以及 72 $^{\circ}$ C 下拉伸 1 分钟。其次通过在室温下将玻片在磷酸缓冲盐水中保温 10 分钟而去掉盖板, 再使玻片进行空气干燥。

6.2. 自动涂片分析

以上已经简单总结了自动涂片分析技术。现在描述本实施例中所用的装置和方法。

6.2.1. 装置

图 2 的方框图示出了适于实施本发明的系统的基本部件。这些系统的基本部件包括 X-Y 平台 201、汞光源 203、配有电动物镜转盘(转换盘) 207 的荧光显微镜 205、彩色 CCD 摄像机 209、个人计算机(PC) 系统 211 以及一个或两个监测器 213、215。

系统的各个部件是定制的或者作为标准部件现货购买的。现在更详细地描述每个部件。

X-Y 平台 201 是适于同所选择的显微镜 205 一起使用的任何电动定位平台。优选的是, X-Y 平台 201 可以是能够与个人计算机相连并利用专门编辑的软件命令电子控制的电动平台。当使用这样的电子控制的 X-Y 平台 201 时, 将一平台控制器线路卡插入将平台 201 连接到 PC211 上的 PC211 扩展总线上。还可人工驱动平台 201。诸如此处所述的电子控制平台可由显微镜生产商例如包括奥林巴斯(Tokyo, 日本)以及其他生产商例如 LUDL(NY, 美国)制造。

显微镜 205 可是任何荧光显微镜, 其配有反射光荧光反光镜 203、具有 20x 的电动物镜转盘 207 和油浸 60x 或 63x 的物镜并具有 600x 的最高放大倍率。电动转盘 207 优选地与 PC211 相连并利用专门编辑的软件命令在连续的放大倍率之间可电子开关。当使用电子控

制的电动转盘 207 时, 转盘控制器线路卡可插入将平台 201 连到 PC211 上的 PC211 扩展总线上。设立的显微镜 205 和平台 201 包括一汞光源 203, 可提供稳定的、甚至是整个光场的照明度。

显微镜 205 产生摄像机 209 所观察到的图象。摄像机 209 可以是任何 3 个单片的 CCD 摄像机或其它连有电子输出并提供高灵敏度和分辨率的摄像机。摄像机 209 的输出端馈给安装在 PC211 内的一个帧接收器和图象处理器电路板。据发现, 合适的摄像机是 SONY930 (SONY, 日本)。

不同的帧接收器系统都可与本发明一起使用。例如该帧接收器可以是从 MATROX (Montreal, CANADA) 购买的 MATROX IM-CLD (彩色图象捕获模式) 和 MATROX IM-640 (图象处理模式) 牌的组合产品。MATROX IM-640 模式的特性是具有装载硬件支撑图象处理的性能。这些性能附合 MATROX IMAGING LIBRARY (MIL) 软件包的性能。因此, 可相当快地执行基于 MIL 的软件算法。MATROX 盘支撑专用的 SVGA 监测器的显示器。该专用监测器不是与 PC 系统 211 经常使用的那种监测器。可使用适于和 MATROX 图象处理盘一起使用的任何 SVGA 监测器。一种与本发明配合使用的专用监测器是 ViewSonic 4E (Walnut Creek, CA) SVGA 监测器。

为了具有足够有价值的处理和贮存性能, PC211 可以是任何至少具有 32MB RAM 和 2GB 硬盘驱动贮存空间的基于 INTEL PENTIUM 的 PC。PC211 最好还包括一监测器。除了此处所描述的特殊性质外, PC211 是传统机型并可包括键盘、打印机或其它所需的外围设备 (未示出)。

6.2.2. 方法

PC211 执行利用 MATROX IMAGING LIBRARY (MIL) 在 MICROSOFT C++ 中编辑的涂片分析软件程序。MIL 是功能软件库, 包括那些控制帧接收器 211 的操作的软件和为了作为磁盘文件随后贮存到 PC211 中而处理由帧接收器捕获的图象的软件。MIL 包括许多特别适于完成诸如滤波、物镜选择和不同的测量功能这些图象处理任务的特殊图象处理途径。涂片分析软件程序可作为 WINDOWS95 的一种应用。在计算机监测器上显示程序提示和测量结果, 而通过成象硬件 211 获得的图象显示在专门的成象监测器 215 上。

为了利用涂片分析程序处理显微图象，首先应校正系统。校正可补偿随着一天天流失的性能偏差以及显微镜、摄像机等相互之间的偏差。在该状态下可观察到校正图象并列出了以下校正参数：

- 系统的颜色响应；
- 在含有要筛选胎儿细胞的涂片的玻片上的面积尺寸或界限；
- 使用 20x 和 60x (或 63x) 的放大倍率时的光场的实际尺寸；以及

●使用 20x 和 60x (或 63x) 的放大倍率时的最小和最大胎儿核心面积。

6.2.3. 第一（鉴定）信号的检测

胎儿细胞检测法可分两个阶段进行。第一是如图 3 的流程图所示的预筛阶段 I，其中用低倍率和高速度可鉴定出可能存在胎儿细胞的位置。选择 20x 的物镜并开始搜索胎儿细胞：

●程序将自动平台（图 2，201）移动到预置起点（例如含有涂片的玻片的一角）（步骤 301）。

●记录光场中预置起点处平台的 X-Y 位置（步骤 303）。

●利用 CCD 摄像机 209 获得光场（步骤 305）并以 RGB（红/绿/蓝）图象的形式传送给 PC211。

●将 RGB 图象转换成 HLS（色调/发光/饱和）表示形式（步骤 307）。

●色调分量是作为黑白图象被二进位编码的，从而将具有 190 - 255 色调值的象素设置到零（黑），其表示感兴趣的面积（多个点），而每个其它象素值设置到 255（白，背景）。这些点代表可能存在的胎儿细胞的核心面积。

●测量二进位编码图象中的每个点的面积。如果在 20x 的倍率下，则其尺寸在大约 20 - 200 象素的范围之外，点的象素设置到值 255（背景）；它们被从其它处理步骤中排除出来（步骤 311、313、315 和 317）。

●然后利用定制的 MATROX 功能计算每个点质量中心（CG）的坐标（步骤 3）。该斑点的质量中心是从薄而密度均匀的斑点材料层中切去的部分可在此处得到平衡的那一点。将这些坐标贮存到沿电流光场

的 X-Y 位置的数据库中，从而利用较高的放大倍率斑点又可在下一处理阶段定位。

- 类似地处理另一光场，记录每个连续光场的 X-Y 位置，一直到覆盖整个玻片为止（步骤 321 和 323）。

图 4A 和 4B 的流程图示出的阶段 II 包括最终的胎儿细胞的识别过程：

- 选择 63x 放大倍率（步骤 401）。

- 程序移动自动平台（图 2，201），以便使早期发现的 CG 的第一位置坐标即可能的胎儿细胞核心面积位于光场的中心（步骤 403）。

- 用 CCD 摄像机获得光场（图 2，209）并以 RGB 图象形式传送给计算机（步骤 405）。

- 将 RGB 图象转换成 HLS 模式（步骤 407）。

- 然后通过对其发光值等于每个可能的发光值的虚象进行计数而使程序产生发光直方图（步骤 409）。将该数目作为一个长 256 的阵列贮存起来，该阵列含有的虚象数具有对应于阵列中每个指数的灰度级值。

- 其次程序分析光度分布曲线（以阵列中所贮存的值表示）（步骤 411），并定位最后的峰值。业已发现，这个峰包括代表图象中的等离子面积的虚象值。分析光度分布曲线的作用：计算滑动曲线的 9 点移动平均值；计算由 10 点灰度级远值所限定的切线；在一定程度上计算这些线的斜率；找出曲线的斜率是零的连续点并且如果这些点表示最小值（曲线中的谷值）就将这些点（灰度级）设置成 -1，如果表示最大值（曲线中的峰值）就将其设置成 1；然后通过找出灰度级值的阵列中的 1 或 -1 的位置而找出曲线中的峰或谷的位置。

- 然后将程序设置成一个切开值，即虚象的灰度级值位于在分布曲线的最后峰之前出现的光度分布曲线的谷中（步骤 413）。

- 然后利用这个切开值，程序产生第二二进制编码图象。这是个黑白图象，其中与灰度级值小于切开点的发光图象中虚象相对应的虚象被设置成 255（白），而与灰度级值大于切开点的发光图象中虚象相对应的虚象被设置成 0（黑）。该图象的白斑点表示细胞，而黑面积表示非细胞面积。

●将闭合滤波器施加到第二二进制编码图象中（步骤 417）；以这种方式，白区域中的洞即黑点被关闭。

●现在程序测量细胞面积。如果这些细胞中的任一细胞面积都小于 200 虚象，则排除这些细胞即包括这些细胞的虚象被设置成 255 虚象值（黑）（步骤 419）。

●在 MIL 发现的盲区充填功能用于剩余的斑点中（步骤 412）。处理之后，所得到的二进制编码图象是其白区只代表细胞的掩模。

●现在基于 HLS 图象的饱和分量区分红细胞和白细胞。掩模用于限定只对细胞面积进行处理。

●现在程序对饱和值是每个可能的饱和值的虚象计数。将该数目作为一个长 256 的阵列贮存起来，该阵列含有的虚象数具有对应于阵列中每个指数的灰度级值（步骤 423）。

●现在程序分析饱和度分布曲线（以阵列中所贮存的值表示）（步骤 425），并定位最后的峰值。这个峰包括代表白细胞中所含的面积虚象值。

●将与峰值之后的第一最小值（谷值）一致的灰度级值设置成切开点（步骤 427）。

●利用这个切开值，程序产生第三二进制编码图象（步骤 429）。与灰度级值大于切开点的饱和图象中虚象相对应的虚象被设置成 255（白）。它们构成红细胞面积。而与灰度级值小于切开点的发光图象中虚象相对应的虚象被设置成 0（黑）。该第三二进制编码图象的白斑点是红细胞面积的根源。

●将闭合滤波器施加到第三二进制编码图象中；以这种方式，白区域中的洞即黑点被关闭（步骤 431）。

●在 MIL 中发现的盲区充填功能用于剩余的斑点（步骤 433）。处理之后，所得到的二进制编码图象是只含有白血球的新掩模。

●现在将 MIL 的消磁边缘斑点功能施加到剩余的斑点上，去除那些包括与图象面积边缘一致的虚象的斑点（步骤 435）。这样的斑点不能包括在下一处理程序中，因为当其与图象面积边缘一致时不知道其中有多少细胞丢失了。

●向该掩模施加 6 次侵蚀滤波器；于是任何相连的斑点（白血球

根源)都不连接了(步骤437)。

●“厚”滤波器施加14次(步骤439)。该“厚”滤波器相当于膨胀滤波器。即,通过在斑点的周围连续加一排虚象可增加斑点的尺寸。如果生长斑点遇到相邻斑点紧挨其生长,则厚滤波器不连接这两个生长斑点。这样可分开相邻的斑点。

●用 RECONSTRUCT_FROM_SEED MIL 操纵器组合第一二进制编码掩模(含有所有的细胞)和第三二进制编码掩模(含有分开的白血球根源)。如此构成的第四掩模含有从第一掩模复制的斑点(细胞),这些斑点被第三掩模认可并因此代表白血球(步骤441)。

●测量第四掩模中的斑点面积和密度:面积(A)是斑点中的虚象数;密度是从斑点的周长(P)和面积(A)中衍生出的,它等于 $p2/4(A)$ 。形状越盘旋,该值越大。一个圆具有最小密度值(1.0)。周长是斑点中边缘的总长度,具有用于阶梯效应的余量,当对角边被数字化时(内角计为1.414,而不是2.0),就产生了阶梯效应。只有在以下情况中斑点才能被保留在第四掩模中:即斑点的面积在1000-8000象素,具有小于3的密度,由此使图象具有相当粗的轮廓。从下一处理程序中排除触摸图象边缘的斑点(步骤443)。

以下列方式将第四掩模施加到色调分量中(步骤445、447、449和451)。

●将色调分量中的虚象复制到保留其色调值的新图象中,并使其坐标与“掩模”中的白(255)虚象一致;将新图象中的所有其它虚象都设置成零(黑)(步骤445)。

●每个相邻的非零虚象面积即对应于红细胞图象的那些斑点中的虚象值据检查在190-255之间。对每个斑点中的这些虚象进行计数(步骤447)。

●斑点如果具有大于200的虚象,则其代表有核红血球。贮存每个这样细胞的质量中心的坐标。掩模被二进制编码,从而将所有具有非零值的虚象设置成255(白);将掩模作为分开标记的文件格式(TIFF)的文件贮存起来(步骤449)。

●程序移动到可能是胎儿细胞的下一贮存坐标上,这些坐标与前一步骤中所贮存的任何坐标都不一致。重复整个过程,一直到已经鉴

定出无核红血球的预置数目。包括有核红血球坐标和个别掩模文件名的这些结果与血片的不同特征码一起被贮存在文本文件中。坐标被贮存起来的有核红血球是胎儿细胞的根源（步骤 451）。

鉴定出胎儿细胞之后，例如利用原位 PCR 或 PCR 原位杂化或 FISH 产生第二信号（如上所述）。

6.2.4. 第二信号的检测

将包括原位 PCR 或 PCR 原位杂化处理的细胞的涂片定位在平台（图 2，201）上。如果进行必需的校正步骤，则如前所述。校正使软件可补偿随着一天天流失的性能偏差以及显微镜、摄像机等相互之间的偏差。然后如图 5 的流程图所示按以下方式检测第二信号：

- 选择放大物镜 60x（63x）（步骤 501）。

- 按照来自第一信号的检测结果编辑的文件中的数据将 X-Y 平台移动到第一胎儿细胞的位置上（如上所述）（步骤 503）。

- 利用 CCD 摄像机（图 2，209）获得光场并以 RGB 图象的形式传送给计算机（图 2，211）（步骤 505）。

- 将 RGB 图象转换成 HLS 模式（步骤 507）。

- 以分开的图象形式装载含有黑白掩模的 TIFF 文件（步骤 509）。

- 将不对应掩模中的白面积的色调分量的虚象设置成零（黑）（步骤 511）。

- 搜索代表胎儿细胞的剩余面积的对应于以下 PCR 所产生的信号的虚象值。例如，信号可以是由于存在碱性磷酸酶而产生的彩色即红色。在 0-30 的范围内搜索色调分量的非黑面积的虚值（步骤 513）。

- 将平台移动到下一未处理的胎儿细胞中并重复以上过程（步骤 515）。

6.3. 变型

上述系统和方法的变型数目包括在本发明中。现在描述其中一些。该描述也可将其它变型暗示给本领域的普通技术人员。

利用每一非富集血样在许多各自显微玻片的每一个上制备涂片。每个玻片当以这种方式制备时可产生第一信号的检测结果。然而，只有那些检测到第一信号的玻片还需处理，以便产生第二信号，随后进行分析以便检测第二信号。按这种方式进行的过程可使用常规

样品和操纵玻片的设备。

在图 6 示意性示出的变型中，在弹性基质 603 上利用非富集血样 601 制备一个长涂片。基质 603 的长度是其宽度的 10 倍多。例如，将其任一边具有输送孔的醋酸纤维素膜条基底用作基质。这个承载涂片的膜条进行连续处理系统中的上述处理步骤（如图 6 所示）。通过检测第一信号测定胎儿细胞的位置之后，从连续膜条上切下包括那些位置的涂片部分，以便产生和检测第二信号。

在利用一弹性基质上的单个长形涂片进行的另一处理过程中，在产生和检测第一信号之前，膜条被分成与显微玻片相似的许多单个部分。按照单个显微玻片的形式进行处理过程。

以上变型及类似变型的优点是，为了产生和检测第二信号，无需处理整个涂片。只需对那些检测到第一信号的玻片或部分进行另外的处理，以便产生和检测第二信号。

在本发明的一个方面中，提供了一种将试剂只分配到检测到稀少细胞的涂片的那些部分上。参照图 7，所示出的本发明的装置包括一试剂分配器系统。使试剂分配器系统定位，以便将试剂分配到平台的精确位置上。这尤其适用于将试剂只分配到由第一信号鉴定的坐标例如稀少细胞的坐标位置（例如胎儿细胞和母体血液涂片）上。该系统包括具有一个或多个微量吸移管位于腔内的试剂分配器 701。该试剂分配器在此实施例中附着到显微镜上并相对于与显微镜具有固定关系的平台定位。试剂分配器 701 的窄尖邻近平台 201。试剂分配器 701 的另一端具有内部相通的原料输送管 703，它是一个承载许多用于将试剂传送给试剂分配器 701 的管或腔。原料输送管 703 从试剂分配器 701 处远距离连接到第一试剂容器 705 和第二试剂容器 707 上。在所示出的实施例中，原料输送管 703 是一个腔，通过该腔，可经过与试剂容器 705 相通的原料输送管 703' 和与试剂容器 707 相通的原料输送管 703'。泵 709 连接到原料输送管 703 上，用于将试剂容器 707 中的试剂打到试剂分配器 701 中并从试剂分配器 701 的窄尖输送到平台的所需位置上。另一泵 709' 连接到原料输送管 703' 上，用于将试剂容器 705 中的试剂输送到试剂分配器 701 中。由 PC211 利用“试剂控制”所指示的专门编辑的软件命令控制这些泵。试剂可以是与产生信号有

关的上述试剂的任一种，

在所示出的实施例中，试剂分配器连接到显微镜上。反之，试剂分配器无需连接到显微镜上，而是连接到相当于 X-Y 平台的任何框架上。所示的平台相对于试剂分配器移动，以便将试剂分配器的窄尖相对于平台上的玻片定位在精确的位置上。可将平台上的玻片移动到不同的位置上，可以自身转动地控制试剂分配器，以便使其相对于玻片上的一系列坐标定位。在自动模式中重要的是，相对于试剂分配器的分配端定位被检测稀少细胞的坐标，由此将材料传送到稀少细胞坐标处的离散位置上。如果试剂分配器由电动机控制并相对于平台或平台上的玻片转动，那么试剂分配器可配有相对于玻片或平台使其定位的传感器。这样，利用先定位稀少细胞的玻片上的坐标的显微镜连续处理平台上的玻片。然后将玻片移动到第二处理面积上，在该面积中，试剂分配器定位在玻片上以前鉴定的坐标处并传送试剂以便产生第二信号。可任选的是，将玻片移动到第三站例如热循环站，然后返回到用于观察的显微镜视野中。

应该确定的是，当需要鉴定不同的细胞类型或诊断不同的细胞特性时，可对涂片进行不同的处理。上述的生物化学、形态学参数在已知的方式中每个都不一样，从而满足其它诊断需要。

计算机和图象处理技术在稳定地变化。此处没有专门描述的满足上述方法和装置的需要的新技术很显然是在本发明的范围内。例如，以上提到了某些常规的虚象和图象文件格式，但是也可利用其它虚象和图象文件格式。利用本领域未知的 JPEG 或 GIF 或待开发的其它技术可压缩图象文件。在 RGB 彩色描绘空间中而不是目前使用的 HLS 空间中可进行这些处理过程。正如熟练工匠所希望的，也可使用其它彩色空间，尤其是当借此加强搜索之后的性质检测时。

本文中不仅描述了与非富集母体血样有关的本发明的实施例，而且也在常规富集或部分富集的母体血样中实施了本发明。将鉴定和诊断样品内的胎儿细胞的计算机控制的微观系统用于覆盖胎儿细胞的整个浓度范围的样品中。正如以上所述的，利用该系统的显著优点是可使用非富集的母体血样。

现在已经结合本发明的许多特例对其进行了描述。其它变型对于

本领域的普通技术人员来说都是显而易见的并且在后面所附的权利要求书及其等同物限定的本发明的范围内。

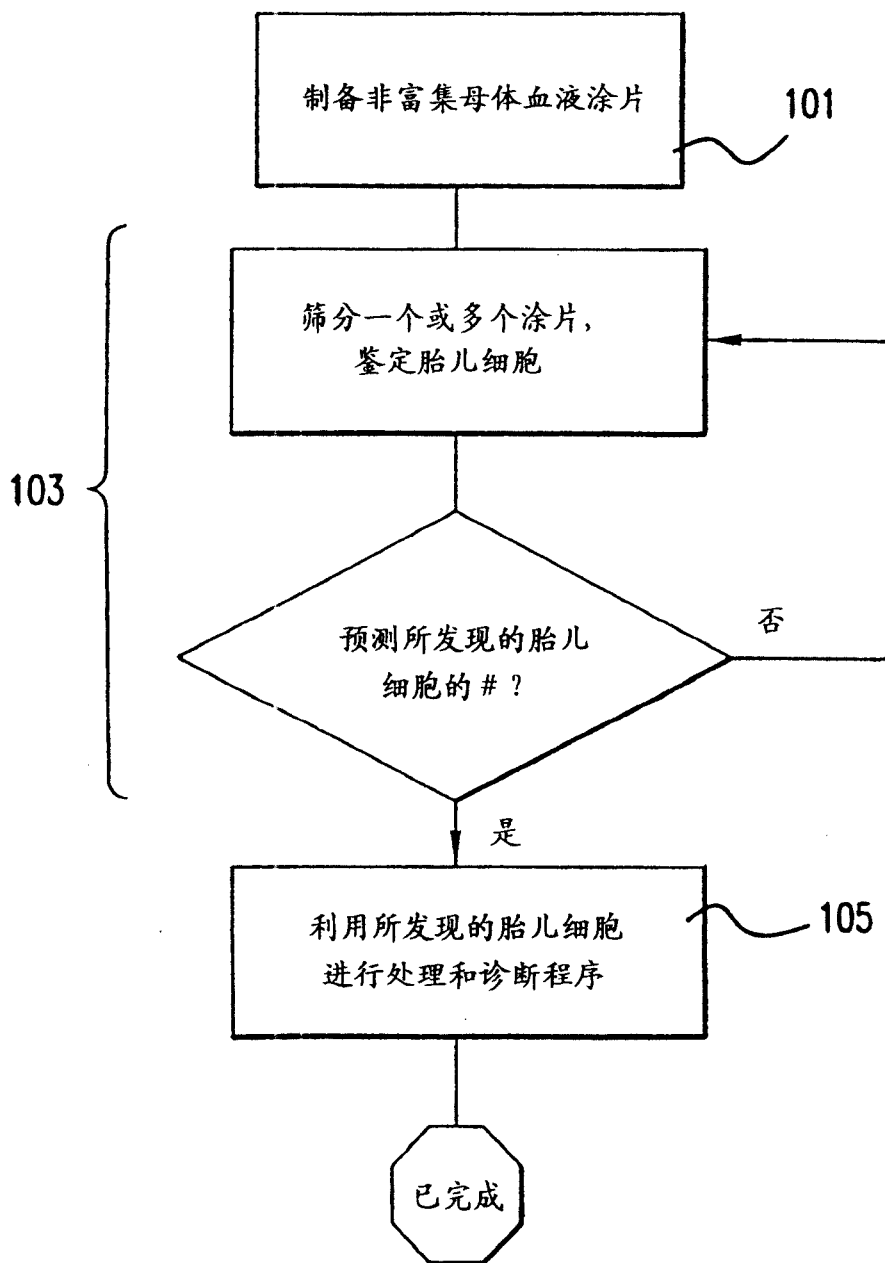


图 1

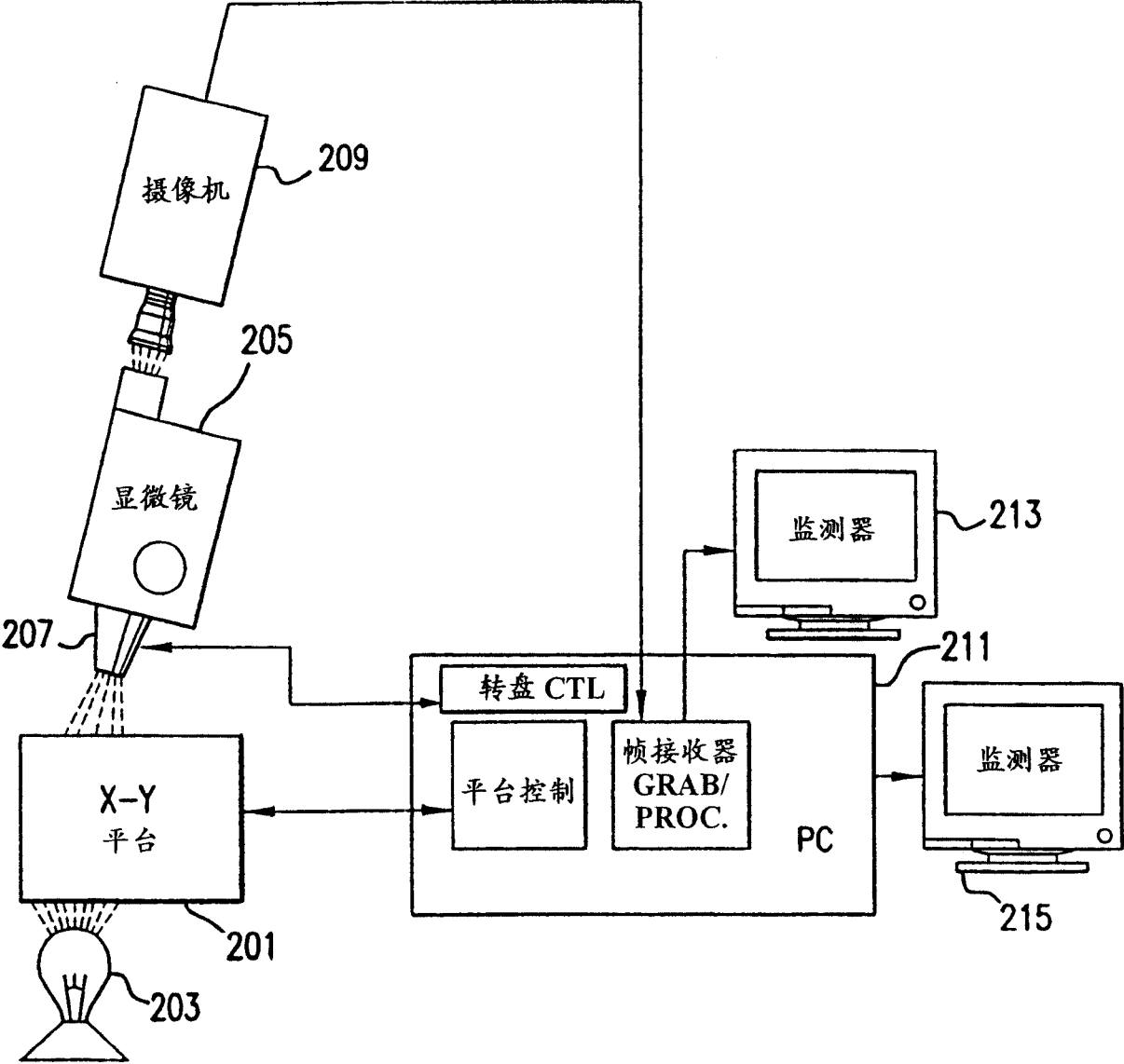
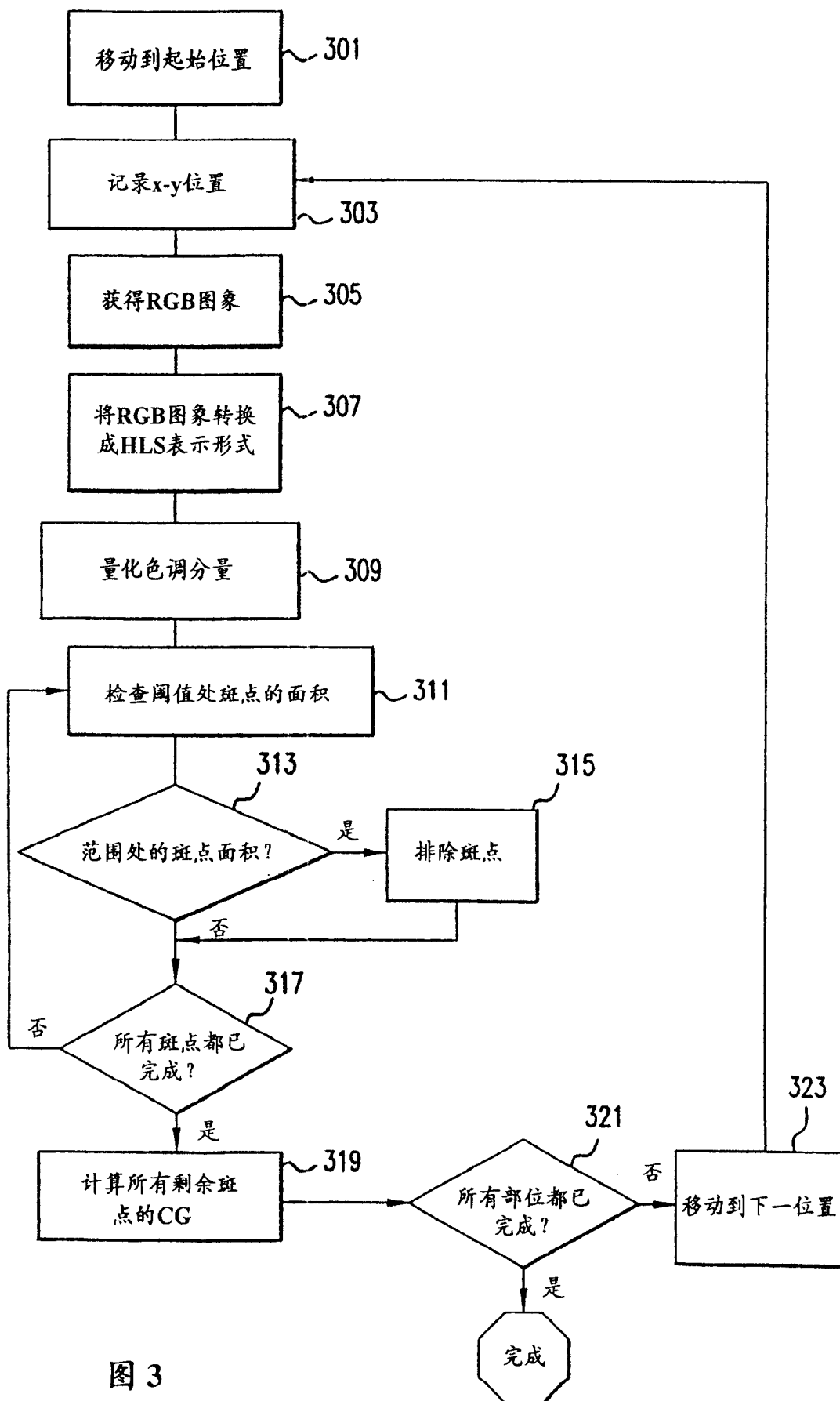


图 2



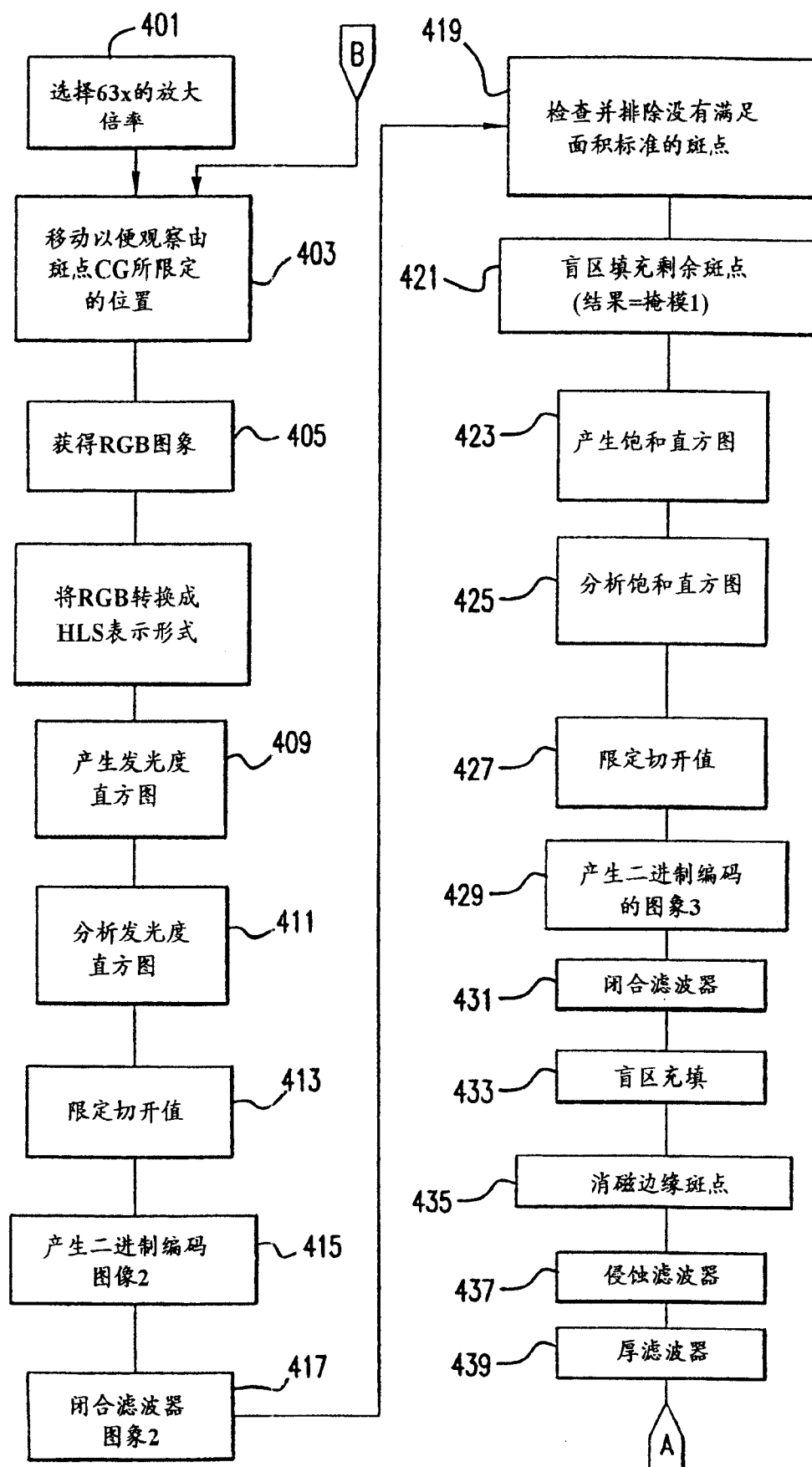
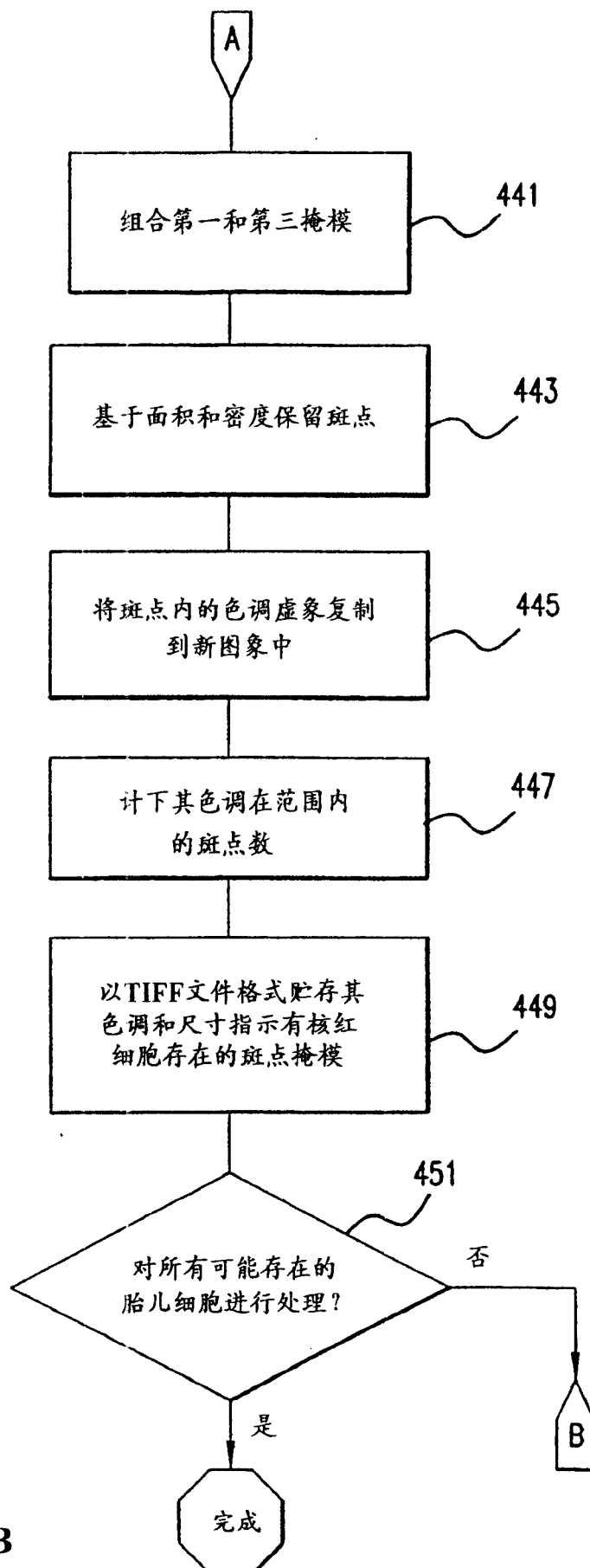


图 4A



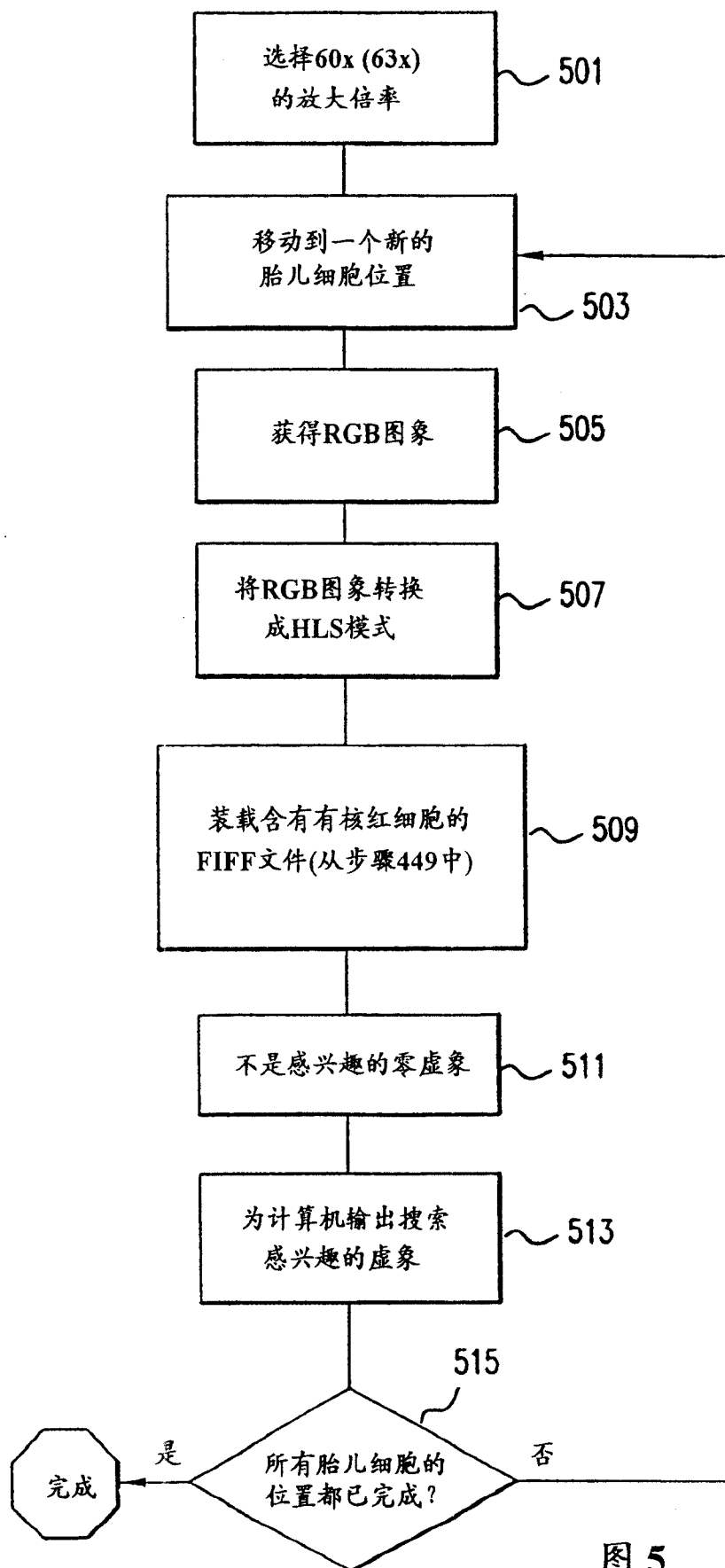


图 5

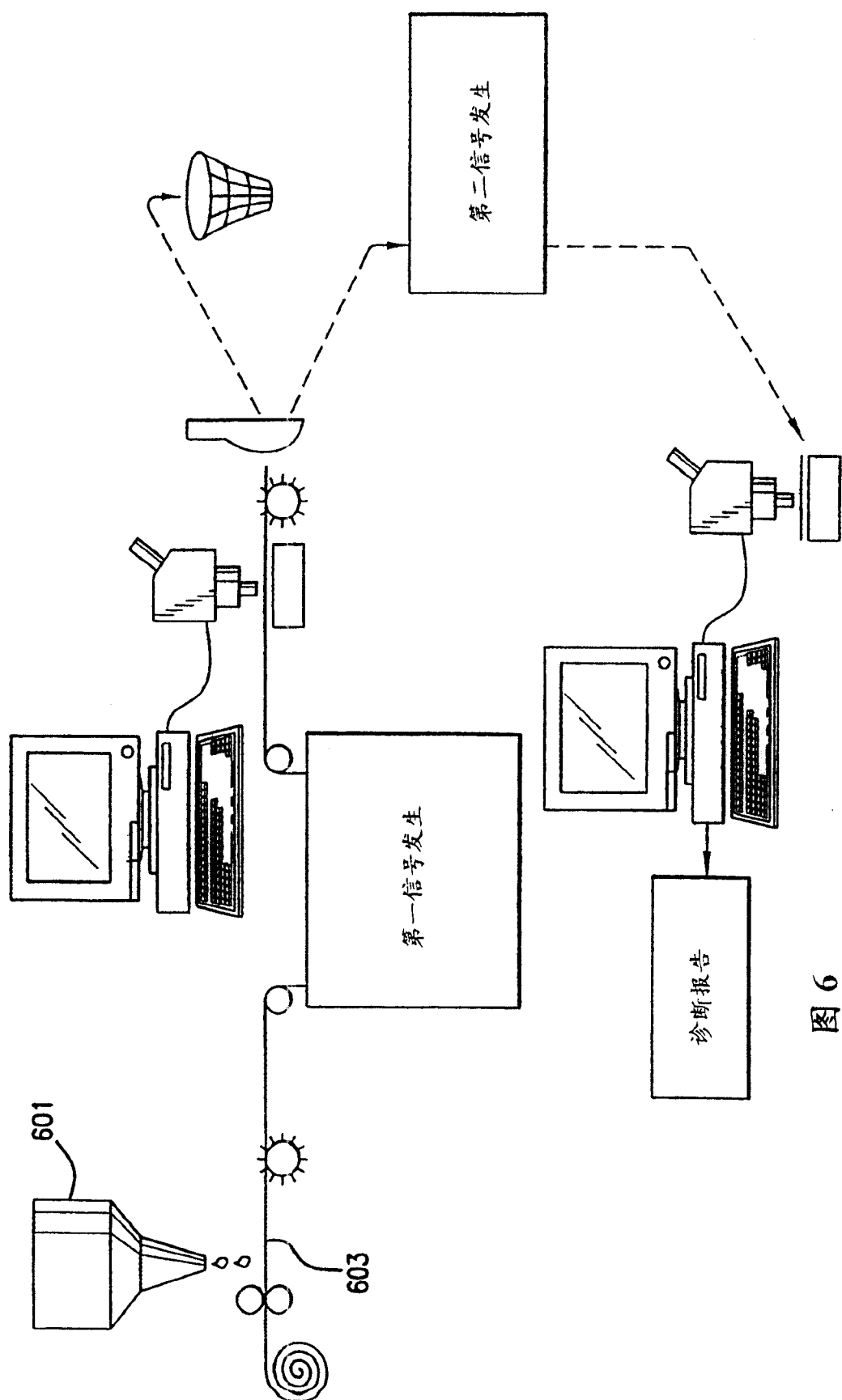


图 6

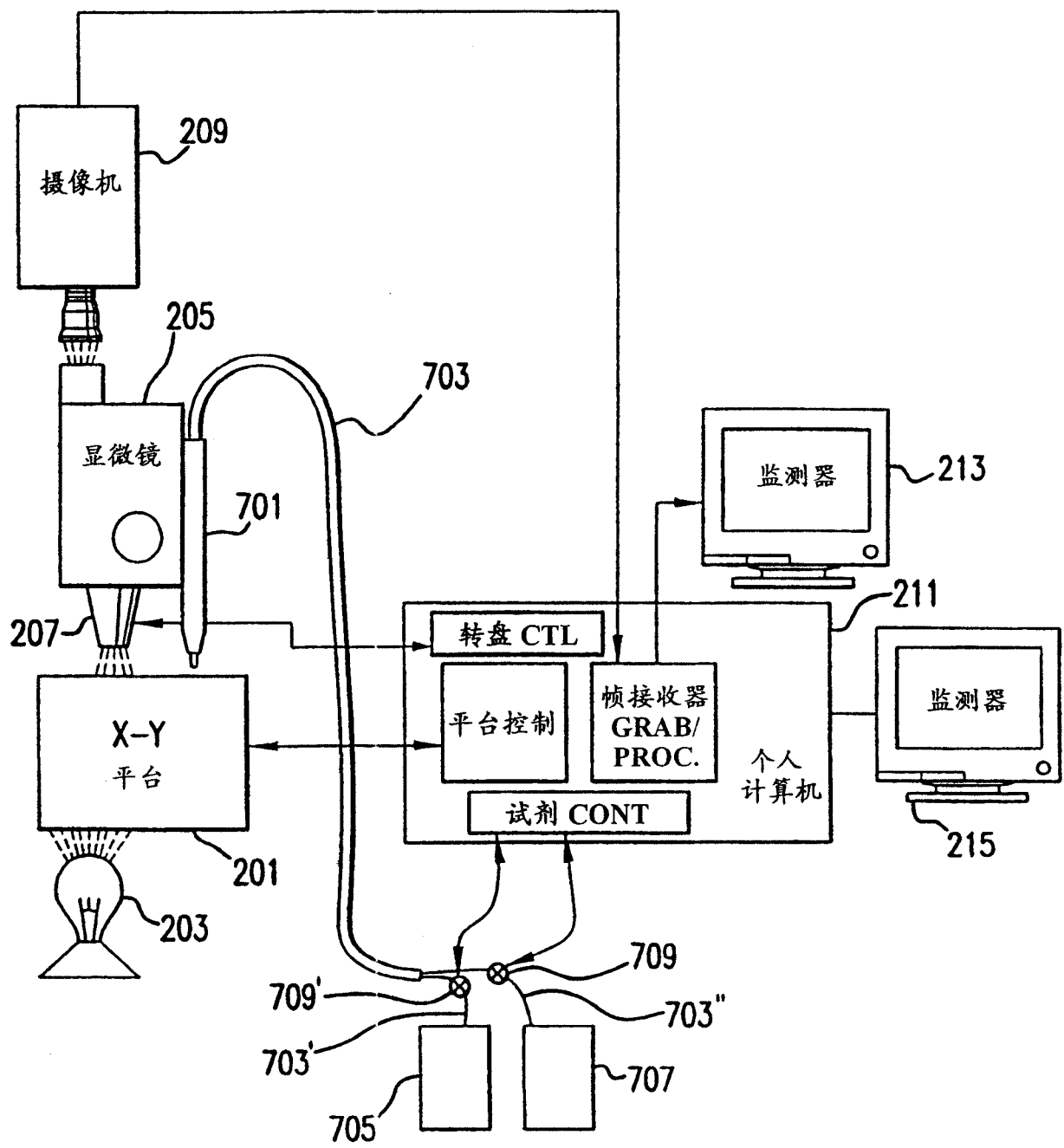


图 7

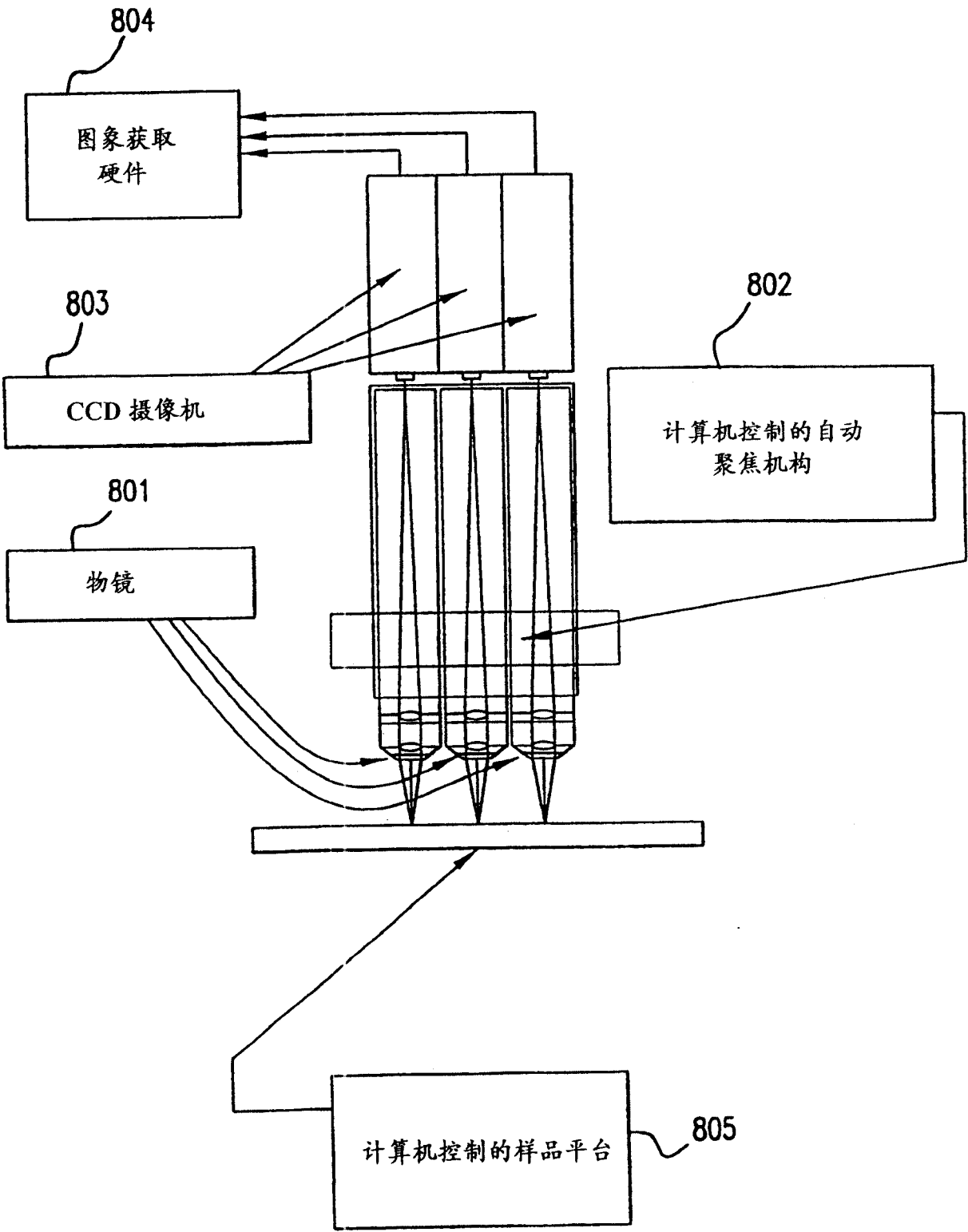


图 8

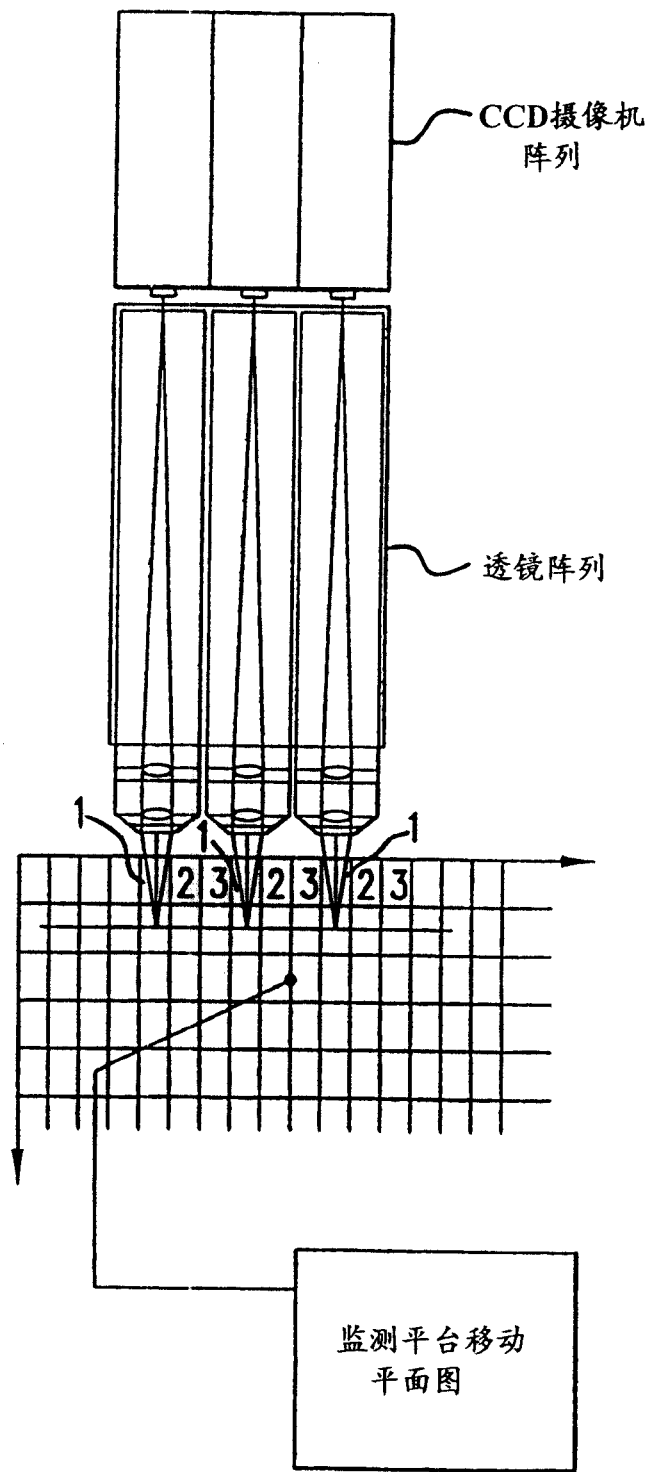


图 9