



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本 (11) 公開編號：TW 201831881 A

(43) 公開日：中華民國 107 (2018) 年 09 月 01 日

(21) 申請案號：107110107

(22) 申請日：中華民國 102 (2013) 年 07 月 25 日

(51) Int. Cl. : G01N21/01 (2006.01)

G01N21/03 (2006.01)

G01N33/48 (2006.01)

(30) 優先權：2012/07/25 美國 61/675,811

2012/07/26 美國 61/676,178

2013/02/18 美國 61/766,116

2013/03/15 美國 61/802,194

(71) 申請人：美商提拉諾斯股份有限公司 (美國) THERANOS, INC. (US)  
美國

(72) 發明人：摩漢 卡蘭 MOHAN, KARAN (IN)；潘加卡 清美 PANGARKAR, CHINMAY (IN)；沃森 詹姆斯 WASSON, JAMES (US)

(74) 代理人：惲軼群；陳文郎

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：28 項 圖式數：12 共 162 頁

(54) 名稱

影像分析及生物樣本之量測

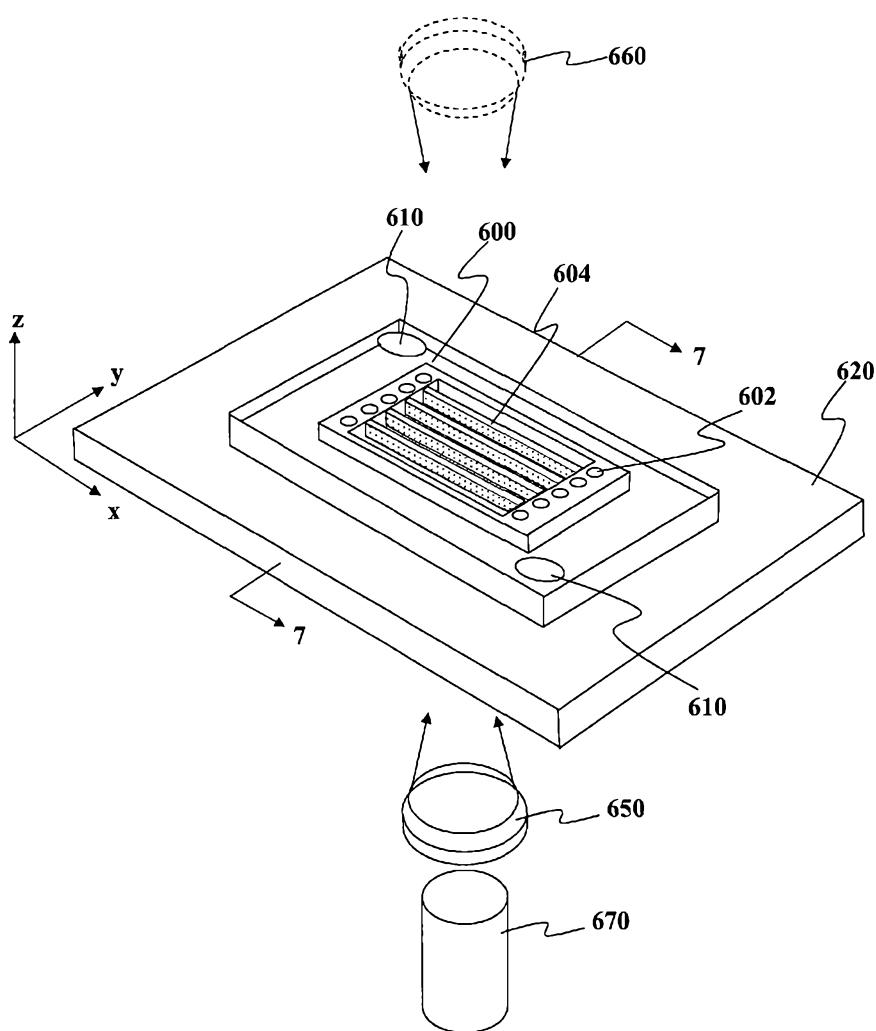
IMAGE ANALYSIS AND MEASUREMENT OF BIOLOGICAL SAMPLES

(57) 摘要

提供用於影像分析或生物樣本之量測的方法、裝置、系統、及設備。

Methods, devices, systems, and apparatuses are provided for the image analysis of measurement of biological samples.

指定代表圖：



## 符號簡單說明：

- 7 · · · 箭頭  
600 · · · 光試管  
602 · · · 開口  
604、610 · · · 元  
件、結構  
620 · · · 底座支架  
650 · · · 環燈  
660 · · · 照明源  
670 · · · 物鏡  
x,y,z · · · 座標軸

圖 6A

# 發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

## 【發明名稱】(中文/英文)

影像分析及生物樣本之量測

IMAGE ANALYSIS AND MEASUREMENT OF  
BIOLOGICAL SAMPLES

## 【技術領域】

參考相關申請案

[0001]本案請求下列各案之優先權：美國專利申請案第61/675,811號申請日2012年7月25日；美國專利申請案第61/676,178號申請日2012年7月26日；美國專利申請案第61/766,116號申請日2013年2月18日；及美國專利申請案第61/802,194號申請日2012年3月15日；該等專利申請案之全文揭示內容皆係爰引於此並融入本說明書之揭示。

[0002]本發明係有關於影像分析及生物樣本之量測。

## 【先前技術】

發明背景

[0003]從一個體獲得的生物樣本之分析對個體的健康相關診斷、監視及/或治療可能相當重要。已知多種方法可用於生物樣本的分析。但為了提供個體的更佳診斷、監視及/或治療，期望對生物樣本的分析做改進。

爰引融入發明

[0004]本說明書中述及的全部公告案、專利案、及專利申請案皆係爰引於此並融入本說明書之揭示至彷彿各個個別公告案、專利案、及專利申請案係特定地且個別地指示

為爰引於此並融入本說明書之揭示的相同程度。

## 【發明內容】

### 發明概要

[0005]此處描述的方法、裝置、系統、及設備係為光學與影像分析及/或生物樣本之量測上有用。

[0006]於一個實施例中，提出一種用於在一樣本中的一細胞族群的細胞中量測一關注成分之方法，包括：a)獲得存在於該樣本中的該細胞族群的細胞中之一標記的一定量度量；b)根據部分a)的該度量，借助於一電腦而決定存在於該樣本中的該細胞族群的細胞之一約略量；c)根據部分b)的結果，選擇添加至該樣本的試劑量，其中該試劑係專一性地結合至該細胞族群的細胞中之該關注成分，且係經組配成方便檢測；d)根據部分c)的結果，添加選定量的試劑至該樣本；e)檢定分析該樣本中的細胞有關結合至該關注成分的試劑；及f)根據結合至該關注成分的該試劑量，決定該樣本之該細胞族群的細胞中的該關注成分量。於該方法之一實施例中，部分c)之試劑為抗體。

[0007]申請人進一步於此處揭示一種用於在一樣本中的一細胞族群的細胞中量測一關注成分之方法，包括：a)獲得存在於該樣本中的該細胞族群的細胞中之一標記的一定量度量；b)根據部分a)的該度量，借助於一電腦而決定存在於該樣本中的該細胞族群的細胞之一約略量；c)添加定量之一細胞標記至該樣本，於該處該細胞標記的添加量係根據部分b)的結果，及其中該細胞標記係專一性地結合至

該細胞族群的細胞中之該關注成分，且係經組配成方便檢測；d)檢定分析樣本中之細胞的結合至該關注成分的標記；及e)根據結合至該關注成分的該標記量而決定該樣本之該細胞族群的細胞中的該關注成分量。

[0008]於另一實施例中，提出一種聚焦一顯微鏡之方法，包括：a)混合含有顯微鏡分析之一物體的一樣本與具有一已知大小的一參考粒子，有效地產生含有該樣本及參考粒子之一混合物；b)將步驟a)之混合物置於一顯微鏡的一光徑內；c)將步驟a)之該混合物曝光於一光束，該光束係經組配以讓該參考粒子變目測可見；及d)根據該參考粒子在該混合物內的該位置而聚焦該顯微鏡。

[0009]於又另一實施例中，此處提出一種識別含有複數個細胞之一樣本中之一細胞之方法，包括：(a)檢定分析該等複數個細胞中之一細胞有關下列中之至少一者：(i)一細胞表面抗原的存在；(ii)一細胞表面抗原的量；或(iii)細胞大小；(b)檢定分析(a)之該細胞有關下列中之至少一者：(i)核大小；或(ii)核形狀；及(c)檢定分析(a)及(b)之該細胞的定量細胞光散射，其中得自步驟(a)、(b)、及(c)之資訊的該組合係用以識別含有複數個細胞之該樣本中之該細胞。

[0010]於又另一實施例中，此處提出一種系統，包含一檢測器總成用於盛裝有一欲檢驗樣本的一樣本容器。於一個非限制性實施例中，該樣本容器乃一光試管，其具有特徵及/或材料使得許可該光試管接合及從一個位置移動至該檢測器總成。於若干實施例中，該檢測器總成具有一第

一表面，其係經組配以接合該樣本容器的一表面使得二者間之界面不會在從該檢測器總成至該樣本容器內的樣本的光徑上產生光干擾。於一個實施例中，在該檢測器總成上可有針對該等樣本容器中之一或多者的多於一個位置。若干實施例針對各個位置有相同樣本容器。選擇性地，若干實施例針對該檢測器總成相聯結的該等位置中之至少部分有不同樣本容器。

[0011]於此處揭示的一個實施例中，此處提出一種樣本容器諸如但非僅限於具有光學性質、維度、材料、及/或物理特徵的一光試管，許可盛裝欲藉該檢測器總成分析的樣本，同時保持樣本與該檢測器總成實體上分開而不直接接觸。此種樣本容器對其中含有成形件的樣本流體特別有用。

[0012]於此處揭示的一個實施例中，該檢測器總成可為一多槽道顯微術單元，其係經組配以檢測、獲得、或量測於一樣本中的一細胞或多細胞的形狀及物理、光學、及生化性質，全部皆於同一個裝置。可提供量化資訊及描述性資訊。該檢測器總成的一個實施例可使用同色或相同波長的多個標記，於該處該檢測器總成係經組配以解卷積源自於一樣本內的此等標記(例如結合至一樣本內的細胞)之信號，許可減少在該總成內需要的頻道及光源的數目。

[0013]須瞭解此處若干實施例可包括一樣本容器諸如但非僅限於具有呈增加暗野照明的光試管材料形狀的物理特性件之一光試管，於該處有些特性件係經組配以提供光反射比(包括但非僅限於該光試管內部的光反射比)，及有些

特性件可選擇性地經組配用於機械支撐；於實施例中，有些特性件可提供機械支撐及也提供光反射比。於實施例中，一樣本容器係經組配以藉該樣本容器內部的光反射而提供一樣本的穿透照明。於實施例中，一樣本容器係經組配以藉該樣本容器內部的光反射而提供一樣本的穿透照明；此種反射比可包括部分內反射(PIR)，及此種反射比可包括全內反射(TIR)。於實施例中，一樣本容器係經組配以藉該樣本容器內部的光反射而提供一樣本的穿透照明，其中當該等光學元件係用以檢測或量測該光時，該反射光之來源係配置於該樣本容器的同側上(亦即該光源係為表面照明光源)。

[0014]此處系統可同時使用表面(直接)及穿透(反射)照明於暗野成像。此點與傳統暗野成像不同，後者主要使用表面照明，而非穿透照明。如此，如此處揭示的表面-與穿透-照明的組合係與已知系統不同，其中該穿透-照明係源自於與該表面-照明的相同光源。選擇性地，成形樣本容器諸如光試管的使用可用以提供表面-照明。於實施例中，成形樣本容器係經組配以藉光反射而提供表面-照明。於實施例中，成形樣本容器係經組配以藉於該樣本容器內的光反射而提供表面-照明。於實施例中，一成形樣本容器的大小、形狀、表面、材料、或其它特徵中之一或者者係有效地提供光在該成形樣本容器內部的內反射。於實施例中，一成形樣本容器的大小、形狀、表面、材料、或其它特徵中之一或者者係有效地提供光在該成形樣本容器內部的部分內

反射(PIR)。於實施例中，一成形樣本容器的大小、形狀、表面、材料、或其它特徵中之一或者者係有效地提供光在該成形樣本容器內部的全內反射(TIR)。選擇性地，穿透照明的強度為不可忽略不計。於實施例中，一成形樣本容器可包括一反射面有效地提高穿透照明光強度。暗野光源可為發光二極體(LED)、雷射、或可提供期望的照明及/或激光波長的其它照明源。

[0015]於一個實施例中，顯微鏡物鏡與光源諸如但非僅限於環燈(用於暗野顯微術)的組合係在其間的實體距離許可檢測器總成具有精簡大小。於一個實施例中，只有在期望波長或在期望波長範圍以內的光被導向該樣本。於一個實施例中，該光為非偏振光。於另一個實施例中，該光為偏振光。

[0016]於又另一實施例中，得自細胞術檢定分析包括得自樣本準備期及/或得自分析期的資訊係用以導引及/或觸發二次程序。此種二次程序可提供直接供人檢核的警報。於實施例中，此種二次程序可使用在一程序的樣本準備步驟期間獲得的估計細胞數或其它資訊以指導一檢定分析的效能，於該處此種檢定分析可為該程序之一後來步驟的檢定分析，或可為另一程序的檢定分析。

[0017]計數細胞之技術也可提供因應處理具有不規則形狀及/或不平均腔室表面的樣本容器的辦法。一種方法包含運用：a)體積計量槽道技術以導入已知體積之樣本進入一分析區內，諸如樣本容器內的一槽道。該方法可包括計

數樣本容器內的全部細胞。由於樣本體積為已知，故也已知該體積的細胞濃度(此點可於斥水性容器或光試管或具有含此種表面之腔室的樣本容器進行)。另一種方法包含：b)以比值為基礎的計量技術以混合樣本與已知量之珠粒，其係用以根據觀察得的珠粒數目而求出樣本內的細胞濃度。

[0018]於此處揭示的又另一實施例中，提出一種方法包含量測所形成的血液成分，諸如但非僅限於量測一血樣中的紅血球(RBC)體積，該方法係經由使得RBC溶脹及獲得實質上球形，及使用暗野顯微術量測RBC體積。

[0019]於此處揭示的又另一實施例中，提出一種包含量測血小板體積之方法。該方法可包括以螢光染料標示血小板及量測觀察得的血小板大小；添加已知大小的珠粒至該樣本；及比較觀察得的珠粒影像大小與觀察得的血小板影像大小，使用珠粒作為校準以決定樣本裡的血小板大小及決定血小板體積。

[0020]據此，申請人於此處揭示：

[0021]一種用於分析一樣本之系統，該系統係包含：一樣本容器包含一樣本腔室經組配以盛裝該樣本，該樣本容器之至少一部分包含一光透射材料，該光透射材料包含一光透射表面及一反射表面；及一照明源經組配以提供光，該光係照明及通過該光透射表面；其中該樣本座係經組配以有效地讓來自該照明源的該光同時地提供表面照明及穿透照明二者給該樣本座內之一樣本，於該處表面照明係包

含光從該照明源行進至該樣本而不會在該樣本座的該光透射材料之一表面反射，及於該處穿透照明係包含光於該光透射材料內部行進，及在從該光透射材料之至少一個表面至少一個反射後行進至該樣本。於實施例中，具有此處揭示的特性件之一系統的一樣本容器可包含一光試管具有組配以盛裝一樣本的一長條槽道。於實施例中，該樣本容器可具有一或多個光非透射表面。

[0022]於此處揭示的系統之實施例中，該穿透照明可至少部分由於一表面的光之內反射提供，及可至少部分由在該光試管內部的光之全內反射提供。於此處揭示的系統之實施例中，該穿透照明可至少部分由於一表面的光之部分內反射提供，及可至少部分由在該光試管內部的光之部分內反射提供。

[0023]於實施例中，一樣本容器可具有用以盛裝樣本的二或多個樣本腔室。具有此處揭示的特性件之一樣本容器，例如一光試管可具有一矩形橫截面形狀；可具有一圓形橫截面形狀；可具有一鋸齒形縱剖面形狀；可具有一梯級形縱剖面形狀；或可具有其它形狀。

[0024]於實施例中，一樣本容器可相對於一照明源移動，及可相對於複數個位置移動，其中該樣本容器之一光透射表面可藉在各個位置的該照明源照明。

[0025]於實施例中，一照明源可包括一環燈。於實施例中，一環燈可選自於基於發光二極體(LED)的環燈及基於雷射的環燈。

[0026]於實施例中，如此處揭示的一系統可包括一支持結構具有一光透射表面成形為接合該樣本容器的一光透射表面。

[0027]於實施例中，如此處揭示的一系統可具有一壓縮裝置，係經組配以保有該樣本容器於一期望位置供藉該照明源照明。

[0028]於實施例中，如此處揭示的一系統可包括一檢測器經組配以成像在該樣本容器內之一槽道的至少一部分。

[0029]於實施例中，如此處揭示的一樣本容器可包括一長條槽道經組配以含有至少一部分樣本，及其中一檢測器係經組配以成像在該樣本容器內之一整個長條槽道。

[0030]於實施例中，如此處揭示的一樣本容器可經組配以於成像期間以靜態非流動方式盛裝該樣本；於實施例中，如此處揭示的一樣本容器可經組配以靜態非流動方式盛裝該樣本的一部分及以流動方式盛裝另一部分。

[0031]於實施例中，如此處揭示的一照明源可相對於該樣本容器移動。

[0032]於實施例中，如此處揭示的一樣本容器可經組配以於成像期間以流動方式盛裝該樣本。

[0033]於實施例中，如此處揭示的一樣本容器可包括完全侷限在該樣本座內的一流體回路，及其中該樣本係位在該流體回路內，有效地讓該樣本維持與該檢測器分開。

[0034]於實施例中，如此處揭示的一樣本容器相對於該檢測器係可移動。於實施例中，如此處揭示的一檢測器相

對於該樣本容器係可移動。

[0035]於實施例中，如此處揭示的一樣本容器及一照明源係包含一光學分析單元的至少一部分，該系統係進一步包含經組配以在該樣本上執行臨床分析的一臨床分析單元。

[0036]於實施例中，如此處揭示的一系統係經組配以提供一液分的單一樣本給該光學分析單元及該臨床分析單元各自，有效地讓該臨床分析單元及該光學分析單元可同時在一樣本的部分上執行光學分析及臨床分析。於實施例中，此種臨床分析可選自一般化學分析、核酸分析、及酶聯結結合分析。

[0037]於實施例中，如此處揭示的一系統可包括複數個臨床分析單元，其中該等複數個臨床分析單元中之各個臨床分析單元係經組配以提供選自於一般化學分析、核酸分析、及酶聯結結合分析中之一臨床分析。

[0038]申請人進一步提出一種光試管包含一樣本腔室經組配以盛裝一樣本，該光試管之至少一部分包含一光透射材料，該光透射材料包含一光透射表面及一反射表面，其中該光透射表面及該反射表面係經組配以有效地讓光同時通過該光透射表面，提供表面照明及穿透照明二者給該樣本腔室內之該樣本，於該處表面照明係包含光從該照明源行進至該樣本而不會在該光透射材料之一表面反射，及於該處穿透照明係包含光於該光透射材料內部行進，及在從該光透射材料之至少一個表面至少一個反射後行進至該

樣本。

[0039]於實施例中，如此處揭示的一光試管具有包含一長條槽道之一樣本腔室。於實施例中，如此處揭示的一光試管具有包含用以盛裝樣本的二或多個樣本腔室。

[0040]於實施例中，如此處揭示的一光試管可具有一或多個光非透射表面。

[0041]於實施例中，穿透照明可提供於如此處揭示的一光試管，至少部分係藉該光試管內部的光之內反射。於實施例中，穿透照明可提供於如此處揭示的一光試管，至少部分係藉在該光試管之一表面光之部分內反射。於實施例中，穿透照明可提供於如此處揭示的一光試管，至少部分係藉在該光試管之一表面光之全內反射。

[0042]於實施例中，如此處揭示的一光試管可具有一矩形橫截面形狀；於實施例中，如此處揭示的一光試管可具有一圓形橫截面形狀。於實施例中，如此處揭示的一光試管可具有一鋸齒形縱剖面形狀；於實施例中，如此處揭示的一光試管可具有一梯級形縱剖面形狀。

[0043]申請人揭示此處之方法。舉例言之，申請人於此處揭示一種於含有複數個細胞之一樣本識別一細胞之方法，包含：(a)將該樣本置於一樣本座，其係包含一樣本腔室經組配以盛裝一樣本，該樣本座之至少一部分包含一光透射材料，該光透射材料包含一光透射表面及一反射表面，其中該光透射表面及該反射表面係經組配以有效地讓光同時通過該光透射表面，提供表面照明及穿透照明二者

給該樣本腔室內之該樣本，於該處表面照明係包含光從該照明源行進至該樣本而不會在該光透射材料之一表面反射，及於該處穿透照明係包含光於該光透射材料內部行進，及在從該光透射材料之至少一個表面至少一個反射後行進至該樣本；(b)照明該樣本座以有效地同時提供該樣本的表面照明及穿透照明二者；及(c)識別在該樣本內之一細胞。於實施例中，此處揭示的方法包括其中該識別係包含使用經組配以成像該樣本腔室的至少一部分的一檢測器識別該細胞。於此處揭示的實施例中，用於此等方法之一樣本腔室可包含一長條槽道。

[0044]申請人進一步於此處揭示一種聚焦一顯微鏡之方法，包含：a)混合含有顯微鏡分析之一物體的一樣本與具有一已知大小的一參考粒子，有效地產生含有該樣本及參考粒子之一混合物；b)將步驟a)之混合物置於一顯微鏡的一光徑內；c)將步驟a)之該混合物曝光於一光束，該光束係經組配以讓該參考粒子變目測可見；及d)根據該參考粒子在該混合物內的該位置而聚焦該顯微鏡。

[0045]申請人於此處揭示一種識別含有複數個細胞之一樣本中之一細胞之方法，包含：(a)檢定分析該等複數個細胞中之一細胞有關下列中之至少一者：(i)一細胞表面抗原的存在；(ii)一細胞表面抗原的量；或(iii)細胞大小；(b)檢定分析(a)之該細胞有關下列中之至少一者：(i)核大小；或(ii)核形狀；及(c)檢定分析(a)及(b)之該細胞的定量細胞光散射，其中得自步驟(a)、(b)、及(c)之資訊的該組合係用

以識別含有複數個細胞之該樣本中之該細胞。

[0046]須瞭解本揭示內容中之實施例可調整適用於本文揭示所描述的特性件中之一或更多者。

[0047]本發明概要係供以簡化形式介紹構思的選擇，將於詳細說明部分進一步描述如後。本發明概要並非意欲識別本案所請主旨的關鍵特徵或主要特徵，也非意欲限制本案所請主旨之範圍。

### 【圖式簡單說明】

[0048]圖1顯示：(A)以辨識CD16的螢光結合劑標示的含天然殺手細胞及嗜中性細胞的一混合物細胞之側散射強度(x軸)相對於螢光強度之作圖；(B)一柱狀圖顯示天然殺手細胞(NK)及嗜中性細胞(Neu)的核面積對總細胞面積之比；(C)以抗-CD16抗體(左欄)及核染色劑(右欄)染色的天然殺手細胞；(D)以抗-CD16抗體(左欄)及核染色劑(右欄)染色的嗜中性細胞。

[0049]圖2顯示：(A)以螢光輻合CD41及CD61抗體標示的血小板(亮點)；(B)10倍(左)及20倍(右)放大的螢光標示血小板之影像強度分布；(C)螢光標示血小板之影像強度分布顯示測得的強度(淺灰)及匹配測得的強度之曲線(深灰)。

[0050]圖3顯示：一曲線圖顯示標準粒子之一標稱直徑，單位微米(x軸)及基於螢光強度的大小度量，單位a.u. (y軸)間之關係。該圖也顯示沿該曲線在不同點的代表性珠粒。

[0051]圖4顯示：在許可(A)只表面照明，及(B)表面-與

穿透-照明之混合的光試管中藉暗野顯微術成像的球狀紅血球及血小板。

[0052] 圖5顯示：(A)以抗-CD16抗體及核染色劑染色的推定帶狀嗜中性細胞；(B) 以抗-CD16抗體及核染色劑染色的推定分節嗜中性細胞。

[0053] 圖6A顯示適用作為如此處揭示的裝置或系統的部件，及適用於如此處揭示的方法的一光學系統之一實施例，包括光學元件之實施例(例如顯示為環燈的光源，及物鏡)、光試管、及組配以固定及定位一光試管用於成像的一支持結構。於本實施例中，光試管具有矩形橫截面形狀。

[0054] 圖6B顯示適用作為如此處揭示的裝置或系統的部件，及適用於如此處揭示的方法的一光學系統之一實施例，包括光學元件之實施例(例如顯示為環燈的光源，及物鏡)、光試管、及組配以固定及定位一光試管用於成像的一支持結構。於本實施例中，光試管具有圓形橫截面形狀。

[0055] 圖7A顯示適用於如此處揭示的一裝置或系統及適用於此處揭示的方法的光學系統之元件之實施例。

[0056] 圖7B顯示適用於如此處揭示的一裝置或系統及適用於此處揭示的方法的光學系統之元件之實施例，包含又一透鏡及一裂隙適用以限制到達一檢測器的散射光之角度之範圍。

[0057] 圖8A提出包括用以固定一樣本成像用的光試管之一支持結構的一光學系統之元件之視圖，其中來自環燈照明系統的光直接地落至該樣本上(表面照明)，及光也從該

光試管的特性件反射因而也提供穿透照明。於本實施例中，該光試管具有梯級形縱剖面形狀。

[0058]圖8B提出包括用以固定一樣本成像用的光試管之一支持結構的一光學系統之元件之視圖，其中來自環燈照明系統的光直接地落至該樣本上(表面照明)，及光也從該光試管的特性件反射因而也提供穿透照明。如圖所示，入射光可完全地於一表面反射(全內反射，TIR)或只有部分入射光可於一表面反射(部分內反射，PIR)。於本實施例中，該光試管具有鋸齒級形縱剖面形狀。

[0059]圖8C顯示適用作為如此處揭示的裝置或系統的部件，及適用於如此處揭示的方法的一光學系統之一實施例，包括光學元件之實施例(例如顯示為環燈的光源，及物鏡)、光試管、及組配以固定及定位一光試管用於成像的一支持結構。於本實施例中，光試管包括影響照明該光試管及光試管內部樣本的光徑之特性件。

[0060]圖8D顯示適用作為如此處揭示的裝置或系統的部件，及適用於如此處揭示的方法的一光學系統之一實施例，包括光學元件之實施例(例如導向來自橫向的光源)、光試管、及組配以固定及定位一光試管用於成像的一支持結構。於本實施例中，光試管包括影響照明該光試管及光試管內部樣本的光徑之特性件。

[0061]圖8E提供一光試管從樣本準備位置轉送至接近一光檢測器(標示為D)的樣本觀察位置之示意代表圖。

[0062]圖8F提供包括一轉運機構用以將一光試管從樣

本準備位置轉送至接近一光檢測器的樣本觀察位置的系統之又一細節示意代表圖。

[0063]圖9為複合影像顯示使用不同的成像技術及染料之取自全血的血球影像。圖9A為暗野影像；圖9B為一影像顯示來自附接至單核細胞的加標籤抗-CD14抗體的螢光；圖9C為一影像顯示來自附接至嗜鹼細胞的加標籤抗-CD123抗體的螢光；圖9D為一影像顯示來自附接至嗜中細胞的加標籤抗-CD16抗體的螢光；圖9E為一影像顯示來自附接至白血球的加標籤抗-CD45抗體的螢光；圖9F為一影像顯示以核染色劑迪格(DRAQ5®)染色的白血球及血小板細胞(紅血球缺核故不被迪格染色)。

[0064]圖10為複合影像，顯示拍攝自白血球的血球的代表性影像，顯示單核細胞、淋巴細胞、嗜伊紅細胞、及嗜中性細胞。

[0065]圖11顯示在以不同標記加標籤的細胞上檢測得的螢光之作圖(加標籤的抗體導向不同細胞表面或其它標記)；此種多重加標籤用在識別細胞係有用的。圖11A藉作圖FL-17強度相對於FL-9強度而識別單核細胞。圖11B藉作圖FL-19強度相對於FL-15強度而識別嗜鹼細胞。圖11C藉作圖FL-15強度相對於FL-11強度而識別淋巴細胞。圖11D藉作圖FL-15強度相對於FL-9強度而識別嗜中性細胞及嗜伊紅細胞。

[0066]圖12顯示藉本方法所得細胞計數(從相同血樣之液分量測)與得自其它方法(使用商用血液分析儀)之比較。

圖12A作圖藉本方法所得白血球計數相較於藉商用血液分析儀所得白血球計數。圖12B作圖藉本方法所得紅血球計數相較於藉商用血液分析儀所得紅血球計數。圖12C作圖藉本方法所得血小板計數相較於藉商用血液分析儀所得血小板計數。圖12D作圖藉本方法所得嗜中性細胞計數相較於藉商用血液分析儀所得嗜中性細胞計數。圖12E作圖藉本方法所得單核細胞計數相較於藉商用血液分析儀所得單核細胞計數。圖12F作圖藉本方法所得淋巴細胞計數相較於藉商用血液分析儀所得淋巴細胞計數。

## 【實施方式】

### 詳細說明

[0067] 可輔助瞭解此處揭示的該等裝置、系統、及方法之全部範圍及優點的描述及揭示例如可參考美國專利案第8,380,541號；美國專利申請案第13/769,798號，申請日2013年2月18日；美國專利申請案第61/802,194號，申請日2013年3月15日；美國專利申請案第13/769,779號，申請日2013年2月18日；美國專利申請案第13/244,947號，申請日2011年9月26日；PCT/US2012/57155，申請日2012年9月25日；美國專利申請案第13/244,946號，申請日2011年9月26日；美國專利申請案第13/244,949號，申請日2011年9月26日；及美國專利申請案第61/673,245號，申請日2011年9月26日，該等專利案及專利申請案之揭示全文皆係爰引於此並融入本說明書之揭示。

[0068] 須瞭解前文概要說明部分及後文詳細說明部分

係為示例說明且僅用於示例說明，並非限制如所請求專利的本發明。除非上下文另行明白指示，否則可注意如於本說明書及隨附之申請專利範圍各項中使用，單數形「一a」、「一an」、及「該」係包括複數形。如此舉例言之，述及「一材料」可包括材料之混合物；述及「一化合物」可包括多種化合物及其類。除非與本說明書明確地陳述的教示相衝突，否則此處引用之參考文獻係全文爰引於此並融入本說明書之揭示。

[0069] 於本說明書中及及於隨後之申請專利範圍各項中，將述及多個術語，須定義為具有後述定義：

[0070] 「選擇性」或「選擇性地」表示隨後說明的境況可能或可能不發生，故該描述係包括該境況發生的情況及該境況不發生的情況。舉例言之，若一裝置選擇性地含有用於樣本收集單元的一特性件，則表示該樣本收集單元可能或可能不存在，及如此，該描述包括其中一裝置具有該樣本收集單元的結構及其中不存在樣本收集單元的結構二者。

[0071] 如此處使用，「實質的」表示多於最低量或無效量；及「實質上地」表示多於最低地或無效地。如此，舉例言之，如此處使用，「實質上不同」一語表示二數值間有夠高的差異度，使得熟諳技藝人士將考慮在由該等值所度量的特性之脈絡以內，二值間之差異係為具有統計意義。因此，實質上彼此不同的二值間之差異典型地係大於約10%，及可為大於約20%，大於約30%，大於約40%，或大

於約50%，隨著參考值或比較器值之函數而變化。

[0072]如此處使用，「內反射」係指於一材料(第一材料)內部，在該第一材料與另一材料(第二材料)間之邊界的光反射。舉例言之，一第一材料可為固體，諸如玻璃或塑膠，及該第二材料可為例如空氣。被內反射的光在該光被反射之前係在該第一材料內部行進。內反射可為部分(部分內反射：PIR)或全部(全內反射：TIR)。如此，入射在一表面的全部光在該第一材料內部被反射回的內反射係為TIR，而入射在一表面的光並非全部在一材料內部被反射回的內反射係為PIR。(於PIR，有些光可通過該邊界，及有些光在該表面被反射回該材料內)。入射角乃決定內反射程度的一項重要因素；入射角乃度量的入射光線相對於該邊界表面的一垂直線的夾角。是否發生TIR係取決於光之入射角相對於該第一與第二材料間之該邊界表面；第一材料的折射率；第二材料的折射率；及其它因素(例如光波長可能影響TIR，原因在於折射率典型地隨波長而異)。光被全內反射的角度定名為臨界角；具有入射角大於臨界角的入射光將被全內反射(將留在該材料內部：TIR)。但於PIR，具有入射角小於臨界角的入射光之一部分也將被內反射(其餘光將被折射，從第一材料送出進入第二材料)。

[0073]如此處使用，「樣本」可為但非僅限於血樣、或尿液樣本、或其它生物樣本。一樣本可為例如，血樣(例如一樣本可得自手指穿刺、或得自靜脈穿刺、或動脈血樣，及可為全血、血清、血漿、或其它血樣)、尿液樣本、活體

切片樣本、組織切片、糞便樣本、或其它生物樣本；水樣本、土壤樣本、食品樣本、空氣樣本；或其它樣本(例如鼻拭子或鼻咽洗液、唾液、尿液、淚液、胃液、脊髓液、黏液、耳垢、油、腺體分泌、腦脊髓液、組織、精液、及陰道液、喉頭拭子、呼氣、毛髮、指甲、皮膚、活體切片、胎水、羊水、臍帶血、淋巴液、體腔液、痰、黏液、膿、微生物叢樣本、胎糞、乳汁及/或其它分泌物)。

[0074]如此，如此處使用，「樣本」包括部分血液、尿液、或其它生物樣本，可具有任何適當大小或體積，且較佳為小尺寸或體積。於此處揭示的系統、檢定分析及方法之若干實施例中，可使用小量體積血樣或不超過小體積分量血樣量測，於該處小體積包含不超過約5毫升；或包含不超過約3毫升；或包含不超過約1毫升；或包含不超過約1毫升；或包含不超過約500微升；或包含不超過約250微升；或包含不超過約100微升；或包含不超過約75微升；或包含不超過約50微升；或包含不超過約35微升；或包含不超過約25微升；或包含不超過約20微升；或包含不超過約15微升；或包含不超過約10微升；或包含不超過約8微升；或包含不超過約6微升；或包含不超過約4微升；或包含不超過約3微升；或包含不超過約2微升；或包含不超過約1微升；或包含不超過約0.8微升；或包含不超過約0.5微升；或包含不超過約0.3微升；或包含不超過約0.2微升；或包含不超過約0.1微升；或包含不超過約0.05微升；或包含不超過約0.01微升。

[0075]於實施例中，透過手指穿刺收集的樣本體積可為例如約250微升或以下，或約200微升或以下，或約150微升或以下，或約100微升或以下，或約50微升或以下，或約25微升或以下，或約15微升或以下，或約10微升或以下，或約10微升或以下，或約5微升或以下，或約3微升或以下，或約1微升或以下。

[0076]如此處使用，「服務位置點」一詞可包括一個體可接受服務(例如測試、監視、處理、診斷、指導、樣本收集、ID認證、醫事服務、非醫事服務等)的位置，及可包括但非僅限於個體住家、個體辦公室、健康照護提供者(例如醫生)所在位置、醫院、急診室、手術室、診所、健康照護專家辦公室、檢驗室、零售商[例如藥局(例如零售藥局、診所藥局、醫院藥局)、藥房、超級市場、雜貨店等]、交通工具(例如汽車、船舶、卡車、巴士、飛機、摩托車、救護車、行動單元、消防車/卡車、緊急車輛、執法車輛、警車、或其它組配以將個體從一點運送至另一點的車輛等)、行動醫療照護單元、行動單元、養生住宅、政府機關辦公室、辦公大樓、帳蓬、體液樣本獲得位置(例如捐血中心)、位在或接近個體期望接近的處所入口位置、位在或接近個體期望接近的裝置位置(例如電腦位置，若個體想接近電腦)、樣本處理裝置接收樣本位置、或本文它處描述的裝置位置之任何其它點。

[0077]於生物樣本脈絡中使用的「細胞」一詞涵蓋通常具有與個別細胞相似的大小之樣本，包括但非僅限於囊泡

(例如脂小體)、細胞、病毒粒子、及結合至小粒子的物質諸如珠粒、奈米粒子、或微球。

[0078]如此處使用，「結合劑」一詞大致上表示緊密地或專一性地結合至一標靶的任一種化合物或巨分子，諸如抗體。結合劑包括但非僅限於抗體(單株或多株抗體、抗體片段、免疫黏著素、及其它此等抗體變化物及模擬物)、天然結合蛋白質(例如對維生素B12具有專一性的內生因子蛋白質)、結合其標靶受體的配體、結合至特定酶的酶基質、結合對諸如抗生素及生物素、緊密地或專一性地結合至一標靶分子的小分子等。一結合劑可為，或可含，或可鏈接至一標記諸如染料，或螢光基團，或其它可檢測部分。

[0079]如此處使用，「著色」及「染色」等詞可互換及表示比較於不使用該著色或染色處理，使得物體或樣本的成分變得更容易檢測的元素、化合物、及巨分子。舉例言之，使用DNA染料諸如碘化丙烷鎓處理血樣使得孕核細胞變得更為可見，使得此等細胞的檢測及量化比較於不使用的情況下更容易，即便於非孕核細胞(例如紅血球)存在下亦復如此。

[0080]如此處使用，「倍體」一詞表示一細胞內的DNA含量，及樣本中之細胞的DNA含量之檢定分析及度量。倍體度量提供一細胞或一族群細胞是否具有正常量或異常量DNA的度量，或因於細胞分裂及增殖期間DNA複製，故提供在一族群中是否有異常數目的細胞正在增殖。倍體度量可在一樣本中使用DNA專一性染料染色孕核細胞後藉成像

技術進行。

### 定量顯微術

[0081]於若干實施例中，此處提出用於定量顯微術的方法、系統、及裝置。定量顯微術可涉及定量螢光顯微術、定量暗野顯微術、定量亮野顯微術、及定量相對比顯微術方法中之一或更多者以量測一或多個細胞屬性。此等方法中之任一者皆可提供有關細胞的形態資訊。此等資訊可定量測量。於若干實施例中，用於定量顯微術，一樣本係藉定量螢光顯微術、定量暗野顯微術、定量亮野顯微術、及定量相對比顯微術中之二或更多者分析。定量顯微術可包括使用影像分析技術及/或統計學習及分類法以處理藉顯微術拍攝得的影像。

[0082]多個不同細胞屬性可在定量顯微術期間量測。可量測的細胞屬性包括但非僅限於：

[0083]理學屬性：例如細胞大小、體積、傳導性、低及高角散射、及密度。

[0084]形態學屬性：例如細胞形狀、面積、大小、及內部結構；細胞核形狀、面積、大小、及內部結構；粒線體形狀、面積、大小、及內部結構；及核體積對細胞體積之比。

[0085]分子內屬性：例如核質心/細胞質心距(亦即核中心與細胞中心間之距離)、核葉質心距(亦即細胞核的不同葉之中心間距)、細胞內部的蛋白質分布(例如肌動蛋白、微管蛋白等)、及細胞內部胞器的分布(例如溶小體、粒線體等)。

[0086]生化屬性：例如細胞蛋白質、細胞表面蛋白質、胞質蛋白質、核蛋白質、細胞核酸、細胞表面核酸、胞質核酸、細胞核核酸、細胞碳水化合物、細胞表面碳水化合物、胞質碳水化合物、及核碳水化合物的表現程度。

[0087]於若干實施例中，此處提供用於一樣本內細胞的2、3、4、5或更多個屬性之定量量測的方法、系統、及裝置，其中該等屬性係選自理學屬性、形態學屬性、胞內屬性、及生化屬性。於若干實施例中，此處提供用於一樣本內細胞的2、3、4、5或更多個屬性之定量量測的方法、系統、及裝置，其中該等屬性係選自於：細胞大小、細胞體積、細胞傳導性、細胞低角散射、細胞高角散射、細胞密度、細胞形狀、細胞面積、細胞內部結構、細胞核形狀、細胞核面積、細胞核大小、細胞核內部結構、粒線體形狀、粒線體面積、粒線體大小、粒線體內部結構、核體積對細胞體積之比、核質心/細胞質心距(亦即核中心與細胞中心間之距離)、核葉質心距(亦即細胞核的不同葉之中心間距)、細胞內部的蛋白質分布(例如肌動蛋白、微管蛋白等)、細胞內部胞器的分布(例如溶小體、粒線體等)、細胞蛋白質之表現程度、細胞表面蛋白質之表現程度、胞質蛋白質之表現程度、核蛋白質之表現程度、細胞核酸之表現程度、細胞表面核酸之表現程度、胞質核酸之表現程度、細胞核核酸之表現程度、細胞碳水化合物之表現程度、細胞表面碳水化合物之表現程度、胞質碳水化合物之表現程度、及核碳水化合物之表現程度。

[0088]於若干實施例中，此處提供藉顯微術定量量測生物樣本內的細胞的2、3、4、5或更多個屬性之方法，其中該方法可包括下列步驟或元體中之一或多者。定量量測的細胞屬性可選自於前一段列舉的屬性。生物樣本在顯微術之前可經前處理。前處理可包括輔助樣本藉顯微術分析的任何程序包括：樣本的處理以豐富顯微術關注的細胞；樣本的處理以減少可能干擾顯微術的樣本中之成分；材料的添加至樣本以輔助藉顯微術分析樣本(例如稀釋劑、封阻分子以減少染料之非專一性結合至細胞等)。選擇性地，在顯微術之前，樣本可接觸專一性地結合至細胞成分的一或多個結合劑。結合劑可直接鏈接至染料或其它粒子用於結合劑的變可見。樣本也可接觸二次結合劑，其係結合至與細胞成分結合的該結合劑。二次結合劑可直接鏈接至染料或其它粒子用於結合劑的變可見。在顯微術之前，樣本可於分光光度計內檢定分析。用於顯微術，含有或懷疑含有顯微分析的一物體的生物樣本可導入樣本容器內，諸如載玻片或光試管。含樣本的樣本容器可導入組配以執行樣本的定量顯微術之一裝置內。顯微鏡可耦合影像感測器以拍攝經由顯微鏡物鏡所產生的影像。於該裝置中，藉顯微術可拍攝該樣本的多個影像。定量螢光顯微術、定量暗野顯微術、定量亮野顯微術、及定量相對比顯微術中之任一者或多者可用以獲得樣本的影像。選擇性地，於樣本容器內的整個樣本的影像可藉顯微術拍攝得。可能需要顯微鏡的多個視野才能拍攝得於樣本容器內的整個樣本的影像。樣本

容器可相對於顯微鏡移動，或顯微鏡可相對於樣本容器移動，以產生不同視野而檢驗在該樣本容器內的樣本的不同部分。可拍攝得在該樣本容器內的樣本之相同視野的多重影像。選擇性地，多個濾波器可用於同型顯微術及樣本的相同視野以拍攝得含有有關該樣本的不同資訊之同一個樣本的不同影像。可使用的濾波器包括但非僅限於帶通濾波器及長波通濾波器。濾波器許可某些波長的光通過而阻擋其它波長光通過。選擇性地，多型顯微術(例如螢光、暗野、亮野等)可用以拍攝樣本的相同視野之影像以拍攝得含有有關該樣本的不同資訊之同一個樣本的不同影像。選擇性地，可使用視頻以收集顯微術影像。選擇性地，顯微術影像可以3-D收集。針對如此處描述而執行的顯微術裝置或系統可經組配以鏈接在該樣本的一個影像之一細胞的資訊至在該樣本的不同影像之相同細胞的資訊。根據相同樣本及/或相同細胞的不同影像，可決定在該樣本中之細胞的多重屬性。於若干面相中，有關樣本的細胞之多重屬性/多塊資訊的組合可用以達到只根據該等細胞的單一屬性所得的資訊所不可能達成的有關該等細胞的臨床決策及/或作出結論。

[0089]於若干實施例中，提供裝置及系統用以藉顯微術定量量測在一生物樣本中的細胞之2、3、4、5、或更多屬性。於若干實施例中，裝置或系統含有顯微鏡或細胞儀及分光光度計。該裝置或系統可進一步含有一流體處理設備，該設備係組配以在分光光度計與顯微鏡或細胞儀間移

動樣本。於若干實施例中，用以執行此處揭示之方法的裝置及系統係如美國專利申請案第13/244,947號及美國專利申請案第13/769,779號所述而組配，二案全文皆係爰引於此並融入本說明書之揭示。雖然前文說明係以細胞脈絡描述，但也須瞭解前文說明之部分或全部也可應用於樣本中可見的晶體、粒子、纖絲、或其它細胞大小的物體。

#### 動態稀釋

[0090]於若干實施例中，此處提供方法、系統、及裝置用於含細胞的樣本之動態稀釋。

[0091]作為非限制性實施例，一樣本的動態稀釋方法可包括下列步驟或元體中之一或多者，使得決定樣本中之期望數目或濃度的細胞或物體，此項資訊係用作為調整下游樣本加工的一項因素。於本非限制性實施例中，可添加一或多個染色劑或染料至含細胞的生物樣本。染色劑與樣本的混合物可經培育。於染色劑與樣本的混合物中之細胞可經洗滌去除過量(未結合的)染色劑。經染色、經洗滌的細胞可準備成期望體積用於進一步分析。經染色、經洗滌的細胞可經分析以決定樣本或其部分內的細胞的約略數目或濃度。根據樣本或其部分內的被染色細胞的數目或濃度，可獲得一定體積的樣本用於進一步分析，因而獲得用於進一步分析的細胞之期望數目或濃度。於若干實施例中，樣本可如美國專利申請案第13/355,458號所述而稀釋，該案全文皆係爰引於此並融入本說明書之揭示。

[0092]於如此處描述的一個實施例中，期望提供另一項

檢測技術，諸如但非僅限於基於螢光之計數細胞之方法以替代使用細胞計數器來估算細胞濃度。描述此一估值，原因在於為了獲得病人樣本之準確的且可再現性的染色，經常期望染色劑(DNA染料/抗體/結合劑/等)針對特定數目/濃度的細胞做最佳力價決定。舉例言之，已知濃度的染色劑將施用至特定數目的細胞(例如每一千個白血球(WBC)0.2微克染色劑)。在培育期之後，樣本將被洗滌去除過量的(未結合的)染料，準備成適當細胞密度，及成像。

[0093]於本非限制性實施例中，為了針對一標靶細胞型獲得細胞濃度之估值，樣本係使用用於細胞計量術的不同模式非破壞性地量測，諸如但非僅限於分光光度計，以便獲得細胞計數檢定分析的樣本加工資訊。該方法可包含選擇該關注細胞族群獨特的另一個標記。於一個非限制性實施例中，針對B細胞可選擇CD20。該方法包含以軛合至與CD5不同的有色螢光基團的抗-CD20結合劑標記該樣本。然後使用裝置諸如但非僅限於螢光分光光度計非破壞性地快速地量測本樣本的螢光信號。利用校準，可能可以有限準確度預測B細胞濃度而提供估值。於一個非限制性實施例中，校準可將信號強度與針對該型信號的細胞數目相關聯。此等校準曲線的產生可用以估計細胞或物體數目。但不排除根據總信號強度，諸如光學、電氣等估計細胞數目的其它技術。根據B細胞的約略濃度，系統可估算抗-CD5結合劑的適當量及濃度，因而維持CD5表現與CD5螢光間之比例關係。藉此方式，染色劑及染色程序可針對特定細胞

數目而予最適化/標準化。

[0094]為了最大化病人樣本的使用(可為低量樣本，諸如得自手指穿刺的血樣，體積等於或小於約120微升)，期望發展出可計數一給定體積血液中所含WBC數目之方法(例如測定WBC濃度/微升)。如此允許在添加染色劑之前決定或至少估計WBC數目。一旦決定時，可分配期望數目的細胞用以與已知濃度的染色劑培育，獲得細胞亞群的最佳解析度。

[0095]於期望度量細胞的倍體之應用中，樣本中的細胞可以DNA染料染色，然後可量化染色強度(於該處「染色強度」因該染料所致之光信號強度)。因此種染色所致之染色信號強度係取決於DNA/染料之比(藉染料染色的DNA量對所添加的染料量之比)。若預設量之染料係添加至每個樣本，則有極高細胞濃度的樣本比較具低細胞濃度的樣本更不亮。此種情況將混淆在各個細胞內的DNA含量之量化。如此處揭示，在添加染料前，獲得一樣本內孕核細胞數目的估值，許可調整染料量，使得可執行DNA的量化及樣本中每個細胞的DNA含量。如此，例如，一樣本或一份樣本可以針對指示欲被量化的細胞之細胞表面標記的染色劑或染料處理，表面標記用以非破壞性地估計樣本中的細胞濃度。估算得的濃度然後可用以計算須添加至該樣本的染料量，因而針對隨後的量測經常性地維持一致DNA:染料比(莫耳對莫耳)。

[0096]於計數細胞的以螢光為基礎的方法之第一實施

例中，一種方法可包含細胞倍體(例如透過螢光基團軛合抗體染色而計數細胞)。於此一非限制性實施例中，期望計數血樣中的WBC數目，使得預定數目的WBC可以預定濃度的DNA染料染色(例如4',6-二脒基-2-苯基吲哚(達皮(DAPI))，或1,5-貳{[2-(二-甲基胺基)乙基]胺基}-4,8-二羥基蒽-9,10-二酮(迪格(DRAQ5®))，或碘化丙烷鎓，或其它DNA染色染料)。本實施例之方法包含使用螢光基團軛合抗體及分光光度計計數WBC。須瞭解本辦法有助於使用DNA染料染色細胞及決定倍體，於該處需要細胞數目對DNA染料濃度之比(細胞#[DNA染料])以產生可相媲美的且一致的資料。有鑑於在一健康族群內部每微升血液的血球數目有變化，典型地期望在試圖染色倍體之前，決定每微升的WBC數目。

[0097]於一實施例中，該程序包含使用細胞，該等細胞首先使用螢光基團軛合抗體染色(於該處抗體較佳地針對一泛在表現的抗原，諸如CD45，或針對T細胞的亞群專一性抗原諸如CD3)，或以標記全部細胞的螢光染料染色(例如細胞膜或胞質染色劑諸如伊紅，或凝集素或其它染色劑或染料)，於該處得自螢光基團的螢光波長在光譜上係與該DNA染料的發光波長分開(及較佳遠離)。在一培育期後，樣本經洗滌以去除過量的(未結合的)染料，製備成適量體積，及透過分光光度計分析。所得資料許可決定血樣中的WBC數目，故可分配特定體積血液(獲得特定的/期望數目的WBC)及以DNA染料染色。所得資料用在依據使用如所描

述的螢光基團軛合抗體決定的WBC數目，計算及調整欲用以染色一樣本的DNA染料量為有用的。

[0098]又一實施例包含在該等細胞的表面染色之前，決定細胞數目(透過DNA染色)。文中後述細胞計數章節可獲得額外細節。偶爾期望計數血樣中之WBC數目，使得特定數目的WBC可以最佳濃度的抗體染色。於一個實施例中，該方法包含使用DNA染料及分光光度計計數WBC，例如討論如前。

[0099]另外，若每微升的細胞數目係在染色之前決定，則已知數目的細胞可被均分及針對各個樣本染色，而與下列無關：(i)健康族群中的變異度，及(ii)疾病狀態。為了決定每微升血液的細胞數目，可能可使用DNA染料，諸如達皮(DAPI)、迪格(DRAQ5®)、或碘化丙烷鎘。選擇性地，未經結合的染料可被洗掉。分光光度計能夠用以決定每微升血液的孕核(例如迪格陽性)細胞數目。

[0100]於等量血液中的白血球(WBC)數目及濃度可因人而異。但為了適當分析血樣中的WBC，可添加足量試劑(諸如靶定於特定WBC專一性抗原的抗體)，而足夠數量係取決於血樣中的白血球(WBC)數目及濃度。定名為「動態稀釋」的程序可用以確保足量的抗體試劑添加至樣本。於一個非限制性實施例中，該程序處理血球以獲得臨時細胞數目用以定標欲用於樣本的適量試劑(例如染色白血球(WBC)的抗體混合液)以提供血球的完全染色。於該程序中，細胞係以DNA染料(例如達皮、迪格、或碘化丙烷鎘)

染色，該染色係與將用於隨後步驟或檢定分析的螢光基團軛合抗體的發光在光譜上分開/遠離。選擇性地，在一培育週期後，該樣本可經洗滌以去除過量(未結合的)DNA染料。在一培育週期後，該樣本可經製備成適量體積，及使用分光光度計成像或量測。結果所得資料許可已知量的樣本內的WBC數目被計數/決定，使得特定體積的血液可被均分(獲得特定/期望數目的WBC)及以適量抗體染色(亦即，根據使用DNA染料決定的WBC之估計數目，可決定提供抗體染色的期望飽和度所要求的抗體量)。如此，藉該DNA染料所提供的估值許可計算與添加針對該樣本液分中的WBC數目所要求的適量抗體染料。

#### 動態稀釋方案：

[0101]於一個實施例中，動態稀釋方案涉及取一份含有白血球的血樣以估計含有靶定於該樣本分析所需的WBC之抗體的試劑量。

[0102]於此一非限制性實施例中，取已知體積的血樣。已知量的核染料(例如DNA染色染料諸如碘化丙烷鎘、達皮、或迪格)係添加至此已知體積的血樣。然後混合物於25°C至40°C培育2至10分鐘週期。

[0103]其次，添加紅血球(RBC)溶解緩衝液。於此一非限制性實施例中，然後於25°C至40°C之溫度，混合物於25°C至40°C培育2至10分鐘週期。適當溶解緩衝液例如可為低張鹽水溶液；低張蔗糖溶液；等張氯化銨溶液；含溫和界面活性劑諸如皂素的等張溶液；或RBC將於其中溶解的其

它緩衝液。於實施例中，此等溶解緩衝液將含括固定劑諸如多聚甲醛以輔助穩定WBC。界面活性劑諸如皂素造成細胞膜形成大量孔洞。紅血球由於其獨特細胞性質故，對此孔洞的形成特別敏感及完全溶解，RBC內容物洩漏進入周圍液體內。固定劑的存在防止了無意地溶解白血球。血小板也保持不溶解。本步驟之目的係從該混合物中去除紅血球(RBC)，原因在於紅血球數目超過白血球數目達約1000:1。血小板不干擾成像，因而在此處理中不考慮。於實施例中，溶解緩衝液也可含有已知濃度的非螢光珠粒；此等珠粒可用作為大小及/或濃度標記。RBC的溶解連同此方案的隨後各步驟實質上去除對WBC的成像或光學度量的任何RBC干擾。

[0104]其次，分離已處理的樣本，於該處該分離可藉任一種適當方法執行，諸如但非僅限於離心機內以1200xg離心已處理的樣本3分鐘。

[0105]在分離(例如離心)後，去除上清液；然後再度懸浮其餘丸粒。於實施例中，丸粒係再懸浮於部分或全部界面活性劑內。由此一步驟獲得含有已再懸浮丸粒的已知體積之溶液。

[0106]若有所需，可執行又一分離步驟及又一再懸浮步驟。此等步驟提供含約10倍濃縮的細胞之濃縮樣本(忽略不計於各步驟可能損失的細胞)。

[0107]然後量測於已再懸浮的已濃縮樣本中的DNA染色染料量。舉例言之，可於分光光度計量測得自螢光DNA

染色染料諸如迪格的螢光。於實施例中，樣本可藉632奈米波長(迪格的激光波長)的光照明，由該細胞懸浮液發射的光可藉650奈米長波通濾波器濾波，及然後可於分光光度計內量測所發射的光。然後此發光度量與先前產生的校準曲線相關聯以估計該細胞懸浮液內的白血球之粗略濃度。典型地，細胞濃度係於約1,000細胞/微升至約100,000細胞/微升之範圍。藉此方式所得WBC數目之估值可用以計算一適當稀釋因數，以確保樣本內的細胞數當用於隨後之定量測量時，係限於環繞預定標靶濃度之範圍內(例如兩倍或其它範圍)。然後，該樣本根據求出的稀釋因數稀釋提供具有在期望濃度範圍的WBC濃度之一樣本。

[0108] 本「動態稀釋」步驟之目的係確保樣本內WBC不會以過高或過低濃度存在。若細胞濃度為過高，則影像處理演算法的準確度受損；而若細胞濃度為過低，則取樣細胞數不足。如此處揭示的濃縮樣本之稀釋提供予於期望範圍內的WBC濃度，及確保了分析期間得自該樣本的信號將落入於檢測及分析的最佳範圍內。

[0109] 此外，藉此方式估計WBC數目許可針對施用至該樣本的進一步檢定分析及方法步驟計算(在一小範圍內)試劑的需要量，原因在於樣本中的WBC數目可改變，但各個檢定分析需要的試劑量可取決於欲檢定分析的樣本中之WBC數目。舉例言之，在藉動態稀釋方案估算WBC數目後，欲添加的試劑包括靶定於不同型WBC上所見的特定抗原之抗體，或若此等抗原係出現在多型WBC上，則係以不

等量存在於不同型WBC上。於樣本中之WBC數目的此一估值不存在的情況下，預定量的染料及其它試劑須用在樣本的隨後檢定分析，結果導致不正確的試劑量及不準確或不完整的檢定分析結果。如此，此一動態稀釋方案係用作為得自病人的血樣之完整評估的重要且有用的初始步驟，及比較其它可能，許可做出更精確及更準確的度量。

### 動態染色

[0110]於若干實施例中，此處提出用於含細胞的樣本之動態染色的方法、系統、及裝置。

[0111]一細胞族群的細胞中之關注成分的度量

[0112]於一個實施例中，一種動態染色細胞樣本之方法係有關於針對一樣本中之一細胞族群的細胞中之關注成分的度量方法。

[0113]如此處使用，「關注成分」係指可存在於一細胞內的任何類型分子。「關注成分」包括蛋白質、碳水化合物、及核酸。典型地，「關注成分」為特定類別分子諸如特定抗原。一細胞的「關注成分」之非限制性實施例包括：CD5蛋白質、CD3蛋白質等。

[0114]如此處使用，「細胞族群」係指根據一或多個共通特性之細胞的任何分組。「細胞族群」可具有任何幅員程度，及可包括大量細胞或只有少數細胞。「細胞族群」之非限制性實施例包括：紅血球(RBC)、白血球、B細胞、CD34+B細胞等。

[0115]於若干實施例中，可能期望定量量測得自一個體

的一樣本中之某個細胞族群的細胞中之關注成分。舉例言之，可能期望量測得自患慢性淋巴球性白血病的一個體的一細胞樣本中於B細胞(「細胞族群」)中之CD5(「關注成分」)表現程度。關注成分含量之檢測及/或量測可涉及使用針對特定關注成分具有親和力的結合劑分子，諸如抗體或單鏈可變片段(scFv)。為了在涉及結合劑分子的使用之一方法中準確量測細胞內的特定關注成分含量，可優異地以結合劑分子對標靶關注成分之特定比值或範圍，將細胞暴露於結合劑分子。舉例言之，可能期望提出結合劑對細胞集合之量使得細胞內的關注成分含量與結合至細胞內的關注成分的結合劑量間有線性關係。舉例言之，可能不期望有過少量結合劑(因而沒有足夠結合劑以結合至細胞內的全部關注成分)或有過多量結合劑(因而結合劑非專一性地結合至細胞)。

[0116]運用傳統方法，可能難以提供適當濃度的結合劑給一樣本以準確地量測一樣本中之一細胞族群的細胞中之關注成分量，原因在於樣本中之細胞族群及/或關注成分的大小可在不同樣本間有顯著變異。相反地，此處提出動態染色細胞樣本之方法、系統、及裝置以因應含有寬廣範圍之細胞族群及關注成分的樣本。

[0117]於一個實施例中，提出一種一樣本中之一細胞族群的細胞中之關注成分的量測方法。該方法非僅限於反而可包括下列步驟中之一或者者。

[0118]第一，可獲得存在於該細胞族群的細胞內之一標

記的定量或半定量度量。該標記可為存在於該關注細胞族群中的任何標記，且可為排它地存在於該關注細胞族群中的一標記(亦即不存在於樣本中的任何其它細胞型別)。標記的度量可採任一種方法，但限制條件為該方法不會破壞該樣本且可使用任何系統或裝置。辨識該標記的一結合劑可與該樣本混合。該結合劑可附接有輔助該結合劑之檢測的一分子(例如螢光標記)。於一實施例中，該標記可藉螢光光譜術檢測及/或量測。於其中該結合劑具有一螢光標記及該標記係藉螢光光譜術量測之實施例中，該螢光光譜術可用以量測得自該樣本或其部分的本體螢光而非量測得自個別細胞的螢光。

[0119]第二，根據存在於該細胞族群的細胞內之該標記的定量或半定量度量。可決定存在於該樣本中的該關注細胞族群中之細胞的約略量或濃度。例如，可透過校準曲線的使用而決定存在於該樣本中的該關注細胞族群中之細胞的約略量或濃度。校準曲線可製備自及/或可得自不同的標記/結合劑組合。校準曲線例如可藉量測得自具有某個標記及與某個結合劑結合的已知數目之細胞信號而發展。於若干實施例中，可借助於電腦而決定存在於該樣本中的該關注細胞族群中之細胞的約略量或濃度。於某些面向中，可決定存在於該樣本中的該關注細胞族群中之細胞的約略量或濃度，此種決定偏離真正濃度不超過約10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400或500%。

[0120]第三，根據所決定的存在於該樣本中的該關注細胞族群中之細胞量或濃度，可選取添加至樣本的試劑量，其中該試劑係特別結合至該細胞族群的細胞中之關注成分。該試劑可為或可包括專一性結合至關注成分的任何分子。例如，試劑可為結合劑諸如抗體。試劑可經組配使得方便檢測(例如藉螢光或藉發光)及/或使得在至少某些情況下產生一可檢測信號。於若干實施例中，該試劑可附接至一分子以協助試劑的檢測。添加至樣本的試劑量可為任何量。於若干實施例中，可添加至樣本的試劑量使得該細胞族群的個別細胞中之關注成分含量與由結合至該細胞族群的個別細胞中之關注成分的試劑所產生的信號間約略具有線性關係。

[0121]第四，在擇定添加至樣本的試劑量之後，擇定的試劑可添加至樣本。

[0122]第五，樣本中的細胞可針對結合至關注成分的試劑作檢測。

[0123]第六，根據結合至關注成分的試劑量，可決定存在於該樣本中的該細胞族群中之細胞的關注成分量。

[0124]於若干實施例中，第五及第六步驟可一起執行，使得結合至關注成分的試劑量的度量係足以識別該樣本的該細胞族群的細胞中之關注成分量。

[0125]於其它實施例中，此處提供者為樣本之動態染色的系統及裝置。非限制性地該等系統及裝置可含有分光光度計及螢光顯微鏡。於一實施例中，動態染色的系統及方

法可如美國專利申請案第13/244,947或13/355,458號所述組配，二案全文皆係爰引於此並融入本說明書之揭示。於一實施例中，該等系統及裝置可經自動化以決定添加至一樣本的一試劑量，以根據存在於該細胞族群的細胞中之標記量之度量而測定存在於該樣本中的該細胞族群中之細胞的關注成分量。於另一實施例中，該等系統及裝置可經自動化以決定添加至一樣本的一試劑量，以根據存在於該細胞族群的細胞中之第二量之度量而測定存在於該樣本中的該細胞族群中之細胞的第一成分量。

#### 基於情境的自動聚焦

[0126]於若干實施例中，此處提供方法、系統、及裝置用於基於情境的顯微鏡自動聚焦。

[0127]生物樣本中許多臨床上相關物體的長度跨據一寬廣範圍。舉例言之，常見細胞長約1微米，常見紅血球長約6-8微米，常見白血球長約10-12微米，常見上皮細胞長約100微米，及圓柱體及晶體可長約200-300微米。此外，有許多非晶形元體諸如尿黏液，存在成索狀或絲狀長約10-400微米之範圍。

[0128]顯微術的一項挑戰係獲得含有各種尺寸物體未知的任意組成物之視野影像，諸如前述。由於許多顯微鏡物鏡的焦深有限(典型約1-10微米)，故針對含有各種尺寸元體的一給定視野，可能需要獲得該給定視野的各個元體的準確鮮明影像。許多傳統自動聚焦法的問題係其設計以聚焦在一視野中的主要特性件上，使得該特性件的鮮明度可

被最大化。用來拍攝一樣本中不同尺寸元體此種方法可能無效。

[0129]於一個實施例中，提出一種用於基於情境的顯微鏡自動聚焦之方法，包括混合具有已知尺寸的參考粒子與顯微術樣本。於實施例中，多於一個參考粒子添加至該樣本；較佳地全部或實質上全部此等參考粒子皆具有相同已知大小。於實施例中，添加至一特定體積樣本的參考粒子數目為已知。該等參考粒子可於顯微術期間檢測，及用以達成聚焦。藉由使用參考粒子以達成聚焦，可選取焦面而與總影像組成獨立無關。於一個面向中，該方法可用以達成聚焦在具有未知元體組成的一樣本上。於另一個面向中，該方法可支援精準焦面的生成而與顯微鏡精度或顯微術相關硬體獨立無關。舉例言之，當一焦面係根據一視野內部的參考粒子之鮮明度所得回授而擇定時，可達成精準聚焦在一樣本內部的各個元體而與聚焦硬體[例如顯微鏡物鏡、樣本容器(例如光試管或載玻片)的形狀、或樣本容器的非一致性]的準確度或精度無關。

[0130]於一實施例中，參考粒子可含有或標記以分子而協助於顯微術期間之該粒子的檢測。於一個實施例中，一參考粒子可標記以或含有螢光分子。螢光分子可吸收於第一光波長的光，及回應於吸收於第一光波長的光，可發射第二光波長的光。於一實施例中，混合參考粒子的樣本可暴露於在一關注參考粒子能夠激發螢光分子的一光波長，及量測來自螢光分子的發光。來自參考粒子的特定螢

光可用以檢測參考粒子，及得自一樣本中經檢測的參考粒子之資訊可用於自動聚焦。

[0131] 參考粒子可為任何形狀，諸如球體或長方體。參考粒子包括但非僅限於珠粒及微球。參考粒子可為任何尺寸，諸如具有約0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、或500微米的直徑或長度。參考粒子可由適當材料製成或可含有任一種適當材料，諸如聚苯乙烯、聚乙烯、乳膠、丙烯酸系、或玻璃。例如，參考粒子可為聚苯乙烯珠粒，例如具有約0.1微米至約50微米；或約1微米至約20微米；或約5微米至約15微米；或約10微米直徑的聚苯乙烯珠粒。

[0132] 於一個實施例中，提出一種聚焦一顯微鏡之方法，其可包括下列步驟中之一或多者。第一，含有用於顯微鏡分析的物體之一樣本(例如細菌、紅血球等)可混合一參考粒子。參考粒子可含有或標記以分子以輔助粒子的檢測，諸如螢光基團。第二，含有該參考粒子及樣本的混合物可置於顯微鏡的光徑上，例如於光試管或載玻片。選擇性地，參考粒子可沈降至光試管或載玻片中的樣本底部，使得該參考粒子停駐在該光試管或載玻片的最低表面上接觸樣本。顯微鏡可為任一型，包括螢光顯微鏡。第三，該混合物可曝光於一光束，該光束係經組配以視覺化該參考粒子。該光束可為任一型，且可為相對於參考粒子的任何

方向性。舉例言之，該光束可為能夠激光該參考粒子內部或附接參考粒子的一螢光基團的一波長。參考粒子曝光於光束可導致例如從來自參考粒子於特定波長光的生成及發射及/或從來自參考粒子的光散射。第四，來自參考粒子的發射或散射光可藉顯微鏡檢測，此項資訊可用以決定混合物內部之參考粒子的位置及/或聚焦該顯微鏡。選擇性地，顯微鏡可聚焦在適合具有與參考粒子相似尺寸的物體之一焦面。來自顯微鏡的影像可藉影像感測器拍攝。該影像可經儲存及/或用於影像分析。

[0133]於若干實施例中，複數個參考粒子可添加至一樣本。該等參考粒子可全部皆具有相同尺寸或不同尺寸。於若干實施例中，不同尺寸的參考粒子含有不同螢光基團。不同螢光基團可具有不同吸收波長，不同發射波長，或二者。

[0134]於一實施例中，提出一種聚焦一顯微鏡之方法，包括混合多於一個已知尺寸的參考粒子與顯微術樣本，其中該等參考粒子中之至少二者具有不同大小及含有不同螢光基團。該方法可包括下列步驟中之一或多者。第一，含有顯微分析物體的一樣本可混合二或多個參考粒子，其中參考粒子中之至少二者係具有不同大小且含有不同螢光基團(亦即「第一參考粒子」及「第二參考粒子」)。第二，含有參考粒子及樣本的該混合物可置於顯微鏡的光徑上。顯微鏡可為任一型包括螢光顯微鏡。第三，混合物可曝光於經組配以讓第一參考粒子變可見的一光束。該光束可屬任

一型，且可為相對於第一參考粒子的任何方向。舉例言之，光束可為能夠激光第一參考粒子內部或附接的一螢光基團之一波長。第一參考粒子曝光於光束可導致得自第一參考粒子的一特定波長光的生成及發射或散射。第四，來自第一參考粒子的發射或散射光可藉顯微鏡檢測，此項資訊可用以決定混合物內部之第一參考粒子的位置及/或聚焦該顯微鏡。選擇性地，第一焦面的影像可藉影像感測器拍攝。該影像可經儲存及/或用於影像分析。第五，混合物可曝光於經組配以讓第二參考粒子變可見的一光束。該光束可屬任一型，且可為相對於第二參考粒子的任何方向。第二參考粒子曝光於光束可導致得自第二參考粒子的一特定波長光的生成及發射或散射。第六，來自第二參考粒子的發射或散射光可藉顯微鏡檢測，此項資訊可用以決定混合物內部之第二參考粒子的位置及/或聚焦該顯微鏡至適合與第二參考粒子有相似大小的物體之一第二焦面。選擇性地，第二焦面的影像可藉影像感測器拍攝。該影像可經儲存及/或用於影像分析。

[0135]於其它實施例中，此處提供者為基於情境的顯微鏡自動聚焦用之系統及裝置。該等系統及裝置可含有一螢光顯微鏡，但非限制性。於一實施例中，該等系統及裝置可經自動化以添加具有已知尺寸的參考粒子至顯微分析樣本以形成一混合物，放置該混合物於顯微鏡的光徑上，曝光該混合物於經組配以視覺化該參的一光束，決定在混合物內部的參考粒子之位置及/或根據在混合物內部的參考

粒子之位置而聚焦該顯微鏡。於一實施例中，一種基於情境的顯微鏡自動聚焦用之系統及裝置可如美國專利申請案第13/244,947或13/355,458號所述組配，二案全文皆係爰引於此並融入本說明書之揭示。

### 定位一樣本容器

[0136]於若干實施例中，此處提出用以決定一樣本容器、或其部分、或樣本容器上的戳記之位置的方法、系統、及裝置。此種決定較佳為精密決定，即便在樣本容器已移開後，或視野已變更後(例如藉改變焦點，或藉檢驗樣本容器的不同區)仍可用以識別在一樣本容器內部的一視野中之細胞、粒子、或其它物體。

[0137]於實施例中，基於影像的回授機制可用以準確地及精密地決定光試管內，例如槽道或含樣本的其它區內(例如參考圖7及8的分析區608)的某個位置。特別係當樣本容器被移開及然後返回先前位置時，此項決定對在移動前與移動後拍攝的影像及光學度量之比較相當重要。來自多個來源的變異度可能影響樣本相對於成像系統軸的位置；例如，光試管部件的變異度、光試管總成的變異度、成像系統上光試管位置的變異度、及其它變異度的可能來源可能影響樣本相對於成像系統的位置，即便樣本留在樣本容器上相同位置亦復如此。識別樣本容器相對於成像系統的位置及加以特徵化之方法揭示於此處。舉例言之，為了準確度及可再現性地成像在一光試管內的一關注區影像，可跑一光試管登錄程式。於實施例中，此種程式始於分析在一

樣本容器中之一預定位置拍攝的影像，該預定位置係接近該視野內部的一登錄特性件或基準標記，或否則可藉該程式檢測。一光試管登錄程式包含一影像處理程式，該影像處理程式搜尋在該影像中的基準標記的存在，及回送是/否答覆(有關該基準標記是否出現在該檢視區內)或該標記在該影像的機率。當該基準標記未出現在檢視區時，使用一搜尋演算法，移動檢視區至樣本容器上或座內的不同位置，及重複拍攝影像。此項處理重複直至程式找到該基準標記為止(亦即有關該基準標記是否出現在該檢視區內的問題獲得是，或最大化該標記在該區域內的機率)。一旦已識別基準標記位置，則可決定樣本容器內或座上的全部其它位置，原因在於樣本容器的維度及布局為已知。如此，在識別基準標記位置後，可找出及成像的任何關注成像點，原因在於如此也已知關注點位置(亦即其與基準標記的距離及方向性為已知，且因基準標記的位置為已知，故關注點也為已知)。於實施例中，基準標記可為或可包括在光試管本身上特別製作的特性件(例如可為一孔、一凸部、一列印或模製圖樣、或其它特性件)，其可針對每個部件製作在相同位置至任何期望的公差。於實施例中，一基準標記可為或可包括光試管的一特性件(例如一槽道緣)其經常性距關注點有固定距離(例如當該基準標記為槽道緣時，該基準標記經常性地距該槽道中軸為一固定距離)。

#### 細胞計數/計算細胞數目

[0138]於若干實施例中，此處提供用於計算一樣本內細

胞數目之方法、系統、及裝置。

[0139]某些傳統染色含細胞的樣本之方法涉及使用特定濃度或量的染色劑染色特定體積樣本(例如血液)。可稱作「體積染色」。體積染色有多項缺點包括：(i)未能解決不同個體間的細胞亞群中的正常變異(例如不同健康個體可有寬廣不同數目的細胞亞群，諸如CD3+ T細胞(此處「CD3+」指示該等T細胞表現CD3標記))；及(ii)未能解決病變樣本比較正常樣本的細胞組成有重大差異(例如患T細胞白血病的病人體的血液中之CD3+ T細胞百分比及數目通常比正常個別的百分比及數目大為升高)。

[0140]為了準確的及可再現性的染色含細胞的樣本，可能期望添加特定量的細胞染色劑(例如DNA染料、抗體、結合劑等)至特定數目或濃度的細胞。舉例言之，可能期望添加相對於樣本中每1000白血球0.2微克特定白血球染色劑。在該染料與細胞的培育期後，樣本可經洗滌去除過量的(未結合的)染料，準備成用於顯微術的適當細胞密度，及成像。藉此方式，染色劑及染色程序可對特定細胞數目最佳化或當量化。

[0141]於一個實施例中，提出一種計數於一樣本中之關注細胞數目之方法。該方法可包括下列步驟或元體中之一或多者。將結合至一樣本中之關注細胞的第一染色劑可添加至樣本。可培育第一染色劑與樣本之混合物。第一染色劑與樣本之混合物中的細胞可經洗滌以去除過量的(未結合的)染色劑。以第一染色劑染色的經洗滌細胞可製備成期

望體積供進一步分析。以第一染色劑染色的經洗滌細胞可藉分光光度計分析。得自分光光度計的資料可用以計數樣本中之約略細胞數目。舉例言之，第一染色劑可為結合至核酸的螢光染料，分光光度計可包括以螢光染料之激光波長發光的一光源，及可檢測螢光染料之發射波長光的一光感測器。於本實施例中，根據來自染料的螢光信號，可求出樣本中之約略核酸量，及從此樣本中之約略核酸量，可決定樣本中之約略細胞數目。根據該樣本中之約略細胞數目，將結合至樣本中之關注細胞的第二染色劑可添加至樣本。於實施例中，鑑於使用第一染色劑決定的約略細胞數目，可決定添加至樣本的第二染色劑量。於實施例中，添加至樣本的第二染色劑量可藉使用第一染色劑所決定的細胞數目求出，以獲得每個細胞的期望第二染色劑比。可培育第二染色劑與樣本之混合物。第二染色劑與樣本之混合物中的細胞可經洗滌以去除過量的染色劑。以第二染色劑染色的經洗滌細胞可製備成期望體積供進一步分析。以第二染色劑染色的經洗滌細胞可藉顯微術分析。

在決定細胞的倍體之前計數一樣本中之細胞數目

[0142]於一個實施例中，提出一種在決定細胞的倍體之前計數一樣本中之細胞數目之方法，其中該方法包括下列步驟或元體中之一或多者。結合至該樣本中之關注細胞的且光譜上與DNA染料相異的第一染色劑可添加至樣本。關注細胞例如可為白血球。白血球例如可為螢光基團軛合抗體。螢光基團軛合抗體例如可結合至廣泛表現的抗原(例如

CD45)，或可結合至由細胞的專一性亞群所表現的抗原(例如T細胞的CD3)。可培育第一染色劑與樣本之混合物。第一染色劑與樣本之混合物中的細胞可經洗滌以去除過量的(未結合的)染色劑。以第一染色劑染色的經洗滌細胞可製備成期望體積供進一步分析。以第一染色劑染色的經洗滌細胞可藉分光光度計分析。得自分光光度計的資料可用以計數樣本中之約略細胞數目。根據該樣本中之約略細胞數目，將結合至樣本中之關注細胞的第二染色劑可添加至樣本。第二染色劑可為DNA染料，諸如碘化丙烷鎓或4',6-二脒基-2-苯基吲哚(達皮(DAPI))。於實施例中，鑑於使用第一染色劑決定的約略細胞數目，可決定添加至樣本的第二染色劑量。於實施例中，添加至樣本的第二染色劑量可藉使用第一染色劑所決定的細胞數目求出，以獲得每個細胞的期望第二染色劑比。可培育第二染色劑與樣本之混合物。第二染色劑與樣本之混合物中的細胞可經洗滌以去除過量的染色劑。以第二染色劑染色的經洗滌細胞可製備成期望體積供進一步分析。以第二染色劑染色的經洗滌細胞可藉顯微術分析倍體。

[0143]於決定細胞之倍體的方法中，要緊地須組合一給定數目之用於倍體分析的細胞數目與某個量或濃度的DNA染色劑以產生有關細胞之倍體的準確而一致的資料。於一個實施例中，健康族群中每體積血液的白血球數目可有變化，而在試圖染色白血球用於倍體分析前，可能期望決定一定體積血液中的白血球數目。

[0144]前文提供用於決定細胞之倍體的方法也可針對任何方法執行，其中需要在決定與一細胞的核酸含量相關屬性之前計數樣本中之細胞數目。舉例言之，前述方法可用於涉及在決定與一細胞核形態、細胞核大小、核面積對總細胞面積之比等之前，計數樣本中之細胞數目的方法。

在細胞表面染色之前計數樣本中之細胞數目

[0145]於一個實施例中，提出一種在細胞表面染色之前計數樣本中之細胞數目之方法，其中該方法包括下列步驟或元體中之一或者者。結合至樣本中之關注細胞的且光譜上與欲用以染色關注細胞表面的一染料之發光分開的第一染色劑可添加至該樣本。關注細胞例如可為白血球數目。第一染色劑例如可為DNA染料(例如碘化丙烷鎘、迪格或達皮)。可培育第一染色劑與樣本之混合物。第一染色劑與樣本之混合物中的細胞可經洗滌以去除過量的(未結合的)染色劑。以第一染色劑染色的經洗滌細胞可製備成期望體積供進一步分析。以第一染色劑染色的經洗滌細胞可藉分光光度計分析。得自分光光度計的資料可用以計數樣本中之約略細胞數目。於實施例中，鑑於使用第一染色劑決定的約略細胞數目，可決定添加至樣本的第二染色劑量。於實施例中，添加至樣本的第二染色劑量可藉使用第一染色劑所決定的細胞數目求出，以獲得每個細胞的期望第二染色劑比。第二染色劑例如可為螢光基團軛合抗體。螢光基團軛合抗體例如可結合至廣泛表現的抗原(例如CD45)，或可結合至由細胞的專一性亞群所表現的抗原(例如T細胞的

CD3)。可培育第二染色劑與樣本之混合物。第二染色劑與樣本之混合物中的細胞可經洗滌以去除過量的染色劑。以第二染色劑染色的經洗滌細胞可製備成期望體積供進一步分析。以第二染色劑染色的經洗滌細胞可藉顯微術分析細胞表面抗原。

[0146]於細胞之細胞表面抗原染色方法中，要緊地須組合用於分析的給定量細胞與給定量或濃度之細胞表面抗原染色劑，以產生有關細胞表面含量的準確而一致的資料。於一個實施例中，每體積血液的白血球數目在健康族群內有變異，如此，在試圖針對細胞表面抗原染色白血球之前，可能期望決定一定體積血液中的白血球數目。於另一實施例中，健康的與生病的個體間每體積血液的白血球數目可有變化，如此，在試圖針對細胞表面抗原染色白血球之前，可能期望決定一定體積血液中的白血球數目。至於理論實施例，健康個體每微升血液有100個血球，其中10個為CD3+ T細胞；而淋巴瘤病人每微升血液有1000個血球，其中900個為CD3+ T細胞。傳統上若染色100微升血液，則得自健康個體的樣本含有約10,000個血球，其中1000個為CD3+ T細胞。自得淋巴瘤病人的100微升血樣有100,000個血球，其中約90,000個為CD3+ T細胞。於本理論實施例中，比較得自健康個體樣本，病變樣本含有十倍的總細胞數目，及九十倍的CD3+ T細胞數目。若病變樣本以針對得自健康個體為最佳化的傳統「體積染色」辦法染色，則得自淋巴瘤個體的樣本可能染色不足。因此理由故，例如其中樣本中

細胞數目的先前估值用以調整施用至一樣本的染料量之本方法係提供優於傳統體積染色的優點。

[0147]據此，此處提出之方法可用以在細胞染色前計數樣本中之細胞數目，以產生有關樣本的準確及/或一致的資料。

### 方法速度

[0148]此處提出之方法、系統、及裝置可支援快速獲得樣本分析結果。此處提出之方法可在距該方法起始的少於例如約6小時、4小時、3小時、2小時、1小時、45分鐘、30分鐘、15分鐘、10分鐘、或5分鐘提供分析結果。

[0149]快速分析結果可用以提供有關病人之治療、診斷、或監控的實時資訊。例如，快速分析結果可用以指導外科醫師在病人體的治療決策。手術期間，手術醫師可從病人取得生物樣本進行分析。藉利用此處提供方法接收一樣本的快速分析，外科醫師可在手術過程中做治療決策。

[0150]於另一實施例中，由此處提出之方法、系統、及裝置提供的快速分析結果可支援病人在同次求診於病人提供生物樣本的服務點所在，接收到有關由病人在該服務點所提供的生物樣本之資訊。

[0151]舉例言之，申請人於此處描述快速檢定分析，準備全血血樣以分析白血球是否存在有多重標記及細胞型別。此種檢定分析可用以製備成像分析的全血樣；樣本在少於0分鐘即準備就緒可供成像。

### 得自全血的快速白血球檢定分析

[0152]本檢定分析在少於約15分鐘或少於約20內準備妥用於白血球細胞術分析的全血樣。此種製備妥細胞的細胞術分析也可快速進行，故細胞術WBC分析可從全血在約半小時以內完成。此外，此種檢定分析只使用小量血樣，因而能夠空出資源，比較需要較大量血液的檢定分析對個別較不會不便或不適。

[0153]用在本檢定分析的試劑包括：磷酸鹽緩衝食鹽水、溶解固定(Lyse Fix)緩衝液、珠粒、再懸浮緩衝液、及含有染料及染料軛合抗體的試劑混合液。該等抗體係針對專一性WBC標記。

[0154]磷酸鹽緩衝食鹽水：137 mM NaCl、3 mM KCl、8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、1.5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、pH調整至pH 7.2至7.4(使用HCl)。

[0155]再懸浮緩衝液(RSB)：5%牛血清白蛋白於PBS。

[0156]溶解固定(Lyse Fix)緩衝液：0.0266%皂素於含10%多聚甲醛(PFA)的PBS，於該處「%」指示克/100毫升(最終比例為約13:1皂素PBS:PFA)。

[0157]試劑混合液1：迪格、軛合至太平洋藍(Pacific Blue<sup>TM</sup>)染料的抗-CD14抗體、Fc嵌段(例如免疫球蛋白諸如小鼠IgG)於0.2% BSA於PBS。

[0158]試劑混合液2：軛合至藻紅蛋白(PE)染料的抗-CD16抗體、軛合至艾利薩螢光(Alexa Fluor®)647染料的抗-CD45抗體、軛合至派西(PECy5)染料的抗-CD123抗體、Fc嵌段(例如免疫球蛋白諸如小鼠IgG)於0.2% BSA於PBS。

[0159] 檢定分析步驟包括：

[0160] 從一個體獲得全血。

[0161] 50微升全血置於一試管內。若有所需，血樣可直接得自一試管。當50微升乃取自該個體的總血量時，則全部樣本添加或取得至一試管；當多於50微升取自該個體時，則50微升乃該樣本之一液分。

[0162] 以1200xg離心樣本3分鐘。

[0163] 從該管移出20微升血漿。

[0164] 試管放置熱段(以升高溫度至37°C)上，添加20微升RSB及徹底混合。

[0165] 添加混合液1(約5微升)。

[0166] 樣本於37°C 培養2分鐘。

[0167] 添加溶解固定緩衝液(於(溶解固定緩衝液)對(已染色血)約6:1之比；約300-350微升)。已知濃度的床粒可含括於溶解固定緩衝液以提供聚焦用之標靶(參考粒子)，及提供用於樣本濃度的校準(例如前文於標題「基於情境的自動聚焦」章節描述)。可使用具有約1微米至約30微米之直徑的聚苯乙烯或其它珠粒。舉例言之，可使用於約100至約2000珠粒/微升濃度的10微米聚苯乙烯珠粒。

[0168] 溶解固定緩衝液於37°C 共培養3分鐘；添加緩衝液後約1.5分鐘，藉上下吸取溶液五次混合。

[0169] 以1200xg離心樣本混合物3分鐘。

[0170] 移出上清液(約350微升)。儲存上清液俾若有所需於稍後步驟調整體積。

[0171]添加混合液2(約15微升)以提供終混合物。

[0172]將終混合物載荷至預溫熱成像光試管(37°C)。

[0173]成像前，光試管於37°C培養5分鐘。

[0174]將該樣本成像。

[0175]如此，樣本在少於約15分鐘內已經準備就緒供成像。於實施例中，若干步驟可縮短(例如於替代實施例中，離心步驟或培養步驟可縮短)。因如上揭示之方法使用含括多個染料的混合液製備樣本，故可在單一視野內部執行此等樣本是否存在有若干細胞型標記的分析，以極少複製努力提供樣本的有效成像。此相同視野的光散射影像提供又另一分析面向，其可有效施用而無需針對數個樣本之影像分析模式要求分開的樣本或分開的視野。含括已知尺寸的參考粒子，藉許可使用自動聚焦而進一步協助成像，且因參考粒子之濃度為已知，故提供於各影像中之樣本稀釋及細胞濃度的一獨立度量。

[0176]製備妥的樣本之成像也可快速完成；例如，此等成像可藉自動化裝置在約10分鐘內完成(典型地約2分鐘至12分鐘)，該裝置具有如此處描述的特性件及例如，述於美國專利申請案第13/244,947號、美國專利申請案第13/769,779號及相關申請案。如此，於實施例中，整個分析含血樣的準備及準備妥的樣本之成像可在約30分鐘或以內完成。

[0177]得自依據前文討論方法(及類似後文討論方法)製備的樣本所得影像及影像分析適合辨識得自全血的WBC

不同族群。此種辨識及量化可在相同樣本上藉使用不同的波長光照明樣本(例如循序地)及記錄與分析所得影像及光強度而快速完成。此等方法適用以提供影像及作圖，例如圖9、10及11所示，其係使用如此處揭示之方法(例如上文及下文討論之方法)製備。圖12顯示的比較證實此等方法準確可靠，且與其它方法有良好相關性(例如藉亞伯特(Abbott)細胞動態如璧系統(CELL-DYN Ruby System)(美國伊利諾州森湖亞伯特診斷公司)分析，圖12所示供比較用之參考分析儀)。

#### 病變樣本之分析

[0178]此處提供之任一種方法皆可用以分析含細胞之病變樣本。若一病變樣本為一組織樣本，則該樣本可經處理以將組織細胞藉此處提供之方法分離成個別分析細胞。

[0179]藉此處提供之任一種方法分析病變樣本可支援快速病變分析，及病變分析結果快速整合入一病人的治療決策。

#### 回應於分析結果之額外程序

[0180]於若干實施例中，此處提供之裝置及系統可經組配以回應於藉此處提供之分析方法所得結果觸發額外程序。

[0181]於一個實施例中，一裝置或系統可經規劃以當結果超出預期範圍以外時警告使用者。該警告可提示使用者或醫事人員手動分析樣本，檢查裝置或系統的運作是否合宜等。

[0182]於另一實施例中，一裝置或系統可經規劃以當結果落入某個範圍以內或以外時自動跑一或多個額外測試。於若干實施例中，此處提供之裝置及系統能夠執行多個不同檢定分析，及裝置或系統可跑一個額外測試以驗證或進一步研究藉此處提供之方法所產生的結果。

#### 使用非專一性染料分析

[0183]加速成像的一個非限制性實施例係使用「高亮度」狀況，於該處細胞係以極高濃度染料標記。於本實施例中，使用標記DNA、細胞膜或細胞其它部分的非專一性染料。本實施例不使用靶定特定罕見蛋白質或其它標記的抗體染料。

[0184]使用非專一性染料，可能獲得細胞資訊而無需分離步驟(例如藉離心分析或物理分離)。沒有此一分離步驟，能夠更快速直接移至成像樣本，諸如但非僅限於大面積細胞，可包括如下二者：a)非標靶細胞諸如紅血球(RBC)；及b)關注標靶細胞或物體諸如白血球(WBC)。如此，於成像一血樣的一個非限制性實施例中，可成像5百萬個RBC及5千個或其它數目的WBC。靶定細胞可基於細胞內部者分化，諸如但非僅限於細胞核形狀。於一個實施例中，核染色劑用以染色樣本中的細胞核，及根據特定細胞所具有的染色種類及數量(例如是否存在有核染色，或染色核形狀，或其它特性)，可根據此項染色而決定其細胞型別，即便染料為非專一性亦復如此。於其它實施例中，其它細胞內部形狀(例如胞質具有顆粒或其它物體)可為指示性或特徵性，可用

以識別及量化一樣本內的細胞。針對尿樣，任何存在的細胞及樣本中的晶體形狀皆可用以識別樣本及決定是否出現異常。藉此方式，非專一性染料可用以視需要而決定細胞之方式而快速地成像細胞。

### 使用複數個激光及/或檢測槽道之分析

[0185]於使用甚至更小量樣本進行細胞術的情境中，於進階細胞術檢定分析之實施例中，可使用額外激光及/或檢測波長。舉例言之，在淋巴球子集檢定分析中為了WBC的分類，計數各種細胞諸如T細胞、B細胞、K細胞、及其它細胞。於此種情況下，只使用兩個標記以識別該細胞為淋巴細胞。為了進一步次分離血樣中的細胞，例如，可再度使用兩個標記。如此，若有個系統一次只檢測兩色，則用於分析的波長數目不足。

[0186]於一個實施例中，可分配樣本而製作出兩個分開的樣本部分，然後，利用樣本的不同部分，於系統的一部件可成像一個組合及於系統的另一部件可成像另一個組合。不幸，如此造成體積與時間的加倍。系統內建愈多獨立槽道，則使用此等樣本部分數目或體積愈少。

### 實施例

#### 細胞處理

[0187]於實施例中，處理生物樣本用於成像、測試、及分析經常為有用的。舉例言之，處理含細胞的生物樣本用於成像、測試、及分析經常為有用的。

[0188]生物樣本的處理可包括前處理(例如製備一樣本

用於隨後之處理或量測)、處理(例如變更樣本故與其原先狀態或先前狀態不同)、及後處理(例如在樣本之量測或運用後棄置全部或部分樣本)。生物樣本可劃分為多個部分，諸如血樣或尿樣液分，或諸如切片、切碎、或將組織樣本劃分為兩塊或多塊。生物樣本諸如血樣的處理可包括樣本或部分樣本的混合、攪拌、音振處理、均化、或其它加工。生物樣本諸如血樣的處理可包括一樣本或其部分的離心。生物樣本諸如血樣的處理可包括提供一樣本的成分分離或沈降的時間，及可包括過濾(例如將一樣本或其部分通過過濾器)。生物樣本諸如血樣的處理可包括許可或致使血樣凝集。生物樣本諸如血樣的處理可包括樣本或部分樣本的濃縮(例如藉血樣或含有得自組織樣本的組織均化物之溶液的沈澱或濃縮)以提供丸粒及上清液。生物樣本諸如血樣的處理可包括部分樣本的稀釋。稀釋可為一樣本或一樣本部分的稀釋，含得自樣本之丸粒或上清液的稀釋。生物樣本可以水或以食鹽水溶液諸如經緩衝的食鹽水溶液稀釋。生物樣本可以可含或可不含固定劑(例如甲醛、多聚甲醛、或交聯蛋白質的其它作用劑)的溶液稀釋。生物樣本可以在周圍溶液與此等細胞的內部或內部腔室間有效產生滲透壓梯度的溶液，有效變更細胞體積的溶液稀釋。舉例言之，當稀釋後所得溶液濃度係低於細胞的內部或內部細胞腔室的有效濃度時，此種細胞的體積將變大(亦即細胞將溶脹)。生物樣本可以溶液稀釋而該溶液可含或可不含滲透壓劑(例如葡萄糖、蔗糖、或其它糖；鹽類諸如鈉、鉀、銨或其它

鹽；或其它滲透壓活性化合物或成分)。於實施例中，滲透壓劑可藉例如穩定或減少在周圍溶液與此等細胞的內部或內部腔室間可能的滲透壓梯度而有效維持樣本中細胞的完好。於實施例中，滲透壓劑可有效提供或增高在周圍溶液與此等細胞的內部或內部腔室間可能的滲透壓梯度而有效使得細胞至少部分塌陷(當細胞的內部或內部腔室的濃度係比周圍溶液的濃度更低時)，或有效使得細胞溶脹(當細胞的內部或內部腔室的濃度係比周圍溶液的濃度更高時)。

[0189]生物樣本可經染色，或標記可添加至樣本，或樣本可以其它方式製備用於樣本、部分樣本、樣本之成分部分、或樣本內部的細胞或結構部分的檢測、視覺化、或量化。舉例言之，生物樣本可接觸含染料之溶液。染料可染色或以其它方式使得樣本內之一細胞、一細胞部分、或與細胞相聯結的材料或分子變可見。染料可結合至一元素、化合物、或樣本的其它成分，或被其變更；舉例言之，染料可改變色澤，或以其它方式，回應於染料存在其中的一溶液的pH變化或差異而變更其性質中之一或者者，包括其光學性質；染料可改變色澤，或以其它方式，回應於染料存在其中的一溶液的一元素或化合物(例如鈉、鈣、二氧化碳、葡萄糖、或其它離子、元素或化合物)之濃度變化或差異而變更其性質中之一或者者，包括其光學性質。舉例言之，生物樣本可接觸含抗體或抗體片段之溶液。舉例言之，生物樣本可接觸含粒子之溶液。添加至生物樣本的粒子可用作為標準品(例如可用作為尺寸標準品，於該處粒子的大

小或大小分布為已知；或可用作為濃度標準品，於該處粒子的數目、含量、或濃度為已知)，或可用作為標記(例如粒子結合或黏著至特定細胞或細胞類型、特定細胞標記或細胞腔室，或於該處粒子結合至樣本內的全部細胞)。

[0190]細胞術包括細胞諸如紅血球、血小板、白血球的觀察及量測，包括細胞數、細胞型別、細胞表面標記、內部細胞標記、及關注細胞的其它特性之定性及定量觀察及量測。當一生物樣本包括或為血樣時，該樣本可分成多份，且可經稀釋(例如提供較大體積方便處置，變更樣本中細胞成分的密度或濃度以提供期望的稀釋密度、濃度、或細胞數或其範圍等)。樣本可以影響凝集的作用劑處理，或可經處理或處置因而濃縮或沈澱樣本成分(例如伸乙基二胺四乙酸(EDTA)或肝素可添加至該樣本，或樣本可經離心或許可細胞沈降)。一樣本或一樣本部分可藉添加可與特定細胞或特定細胞成分反應或加標記的染料或其它試劑處理。舉例言之，標記細胞核的染料(例如蘇木素染料、花青素染料、迪格素染料諸如迪格及其它)；標記細胞質的染料(例如伊紅染料、含螢光素染料、及其它)可分開地或一起地用以輔助細胞的變可見、辨識、及定量。更特定標記包括細胞標靶的專一性抗體及抗體片段，諸如細胞表面蛋白質、胞內蛋白質及腔室、及其它標靶用在細胞術也有用。

[0191]生物樣本可使用下列光學裝置藉細胞術測量及分析，包括例如，光二極體檢測器、光倍增器、電荷耦合裝置、雷射二極體、分光光度計、相機、顯微鏡、或測量

光強度(單波長、多波長、或光之一波長範圍或多範圍)、形成一影像或二者的其它裝置。含一樣本或一樣本部分的一視野可使用此等檢測器成像，或掃描，或二者。在處理、稀釋、分離、離心、凝集、或其它變更之前，生物樣本可藉細胞術測量及分析。在生物樣本之處理、稀釋、分離、離心、凝集、或其它變更之中或之後，生物樣本可藉細胞術測量及分析。舉例言之，恰在接收到樣本後，生物樣本可藉細胞術測量及分析。於其它實施例中，在生物樣本之處理、稀釋、分離、離心、凝集、或其它變更之中或之後，生物樣本可藉細胞術測量及分析。

[0192]例如，一樣本或一樣本部分可藉濱積或離心而準備用於細胞術。在細胞術分析前，此種樣本的濱積部分或丸粒部分可再懸浮於首選緩衝液(例如藉抽吸、攪拌、音振處理、或其它處理)。在細胞術分析前，生物樣本可以水或以食鹽水溶液諸如緩衝食鹽水溶液稀釋或再懸浮。用於此種稀釋或再懸浮之溶液可或可不包含固定劑(例如甲醛、多聚甲醛、或交聯蛋白質的其它作用劑)。用於此種稀釋或再懸浮的溶液可在周圍溶液與該樣本內細胞的內部或內部腔室間有效產生滲透壓梯度，有效變更該樣本內部分或全部細胞的細胞體積。舉例言之，當稀釋後所得溶液濃度係低於細胞的內部或內部細胞腔室的有效濃度時，此種細胞的體積將變大(亦即細胞將溶脹)。生物樣本可以溶液稀釋而該溶液可含或可不含滲透壓劑(例如葡萄糖、蔗糖、或其它糖；鹽類諸如鈉、鉀、銨或其它鹽；或其它滲透壓活性化

合物或成分)。於實施例中，滲透壓劑可藉例如穩定或減少在周圍溶液與此等細胞的內部或內部腔室間可能的滲透壓梯度而有效維持樣本中細胞的完好。於實施例中，滲透壓劑可有效提供或增高在周圍溶液與此等細胞的內部或內部腔室間可能的滲透壓梯度而有效使得細胞至少部分塌陷(當細胞的內部或內部腔室的濃度係比周圍溶液的濃度更低時)，或有效使得細胞溶脹(當細胞的內部或內部腔室的濃度係比周圍溶液的濃度更高時)。

[0193]例如，使用含染料溶液稀釋部分樣本後，一生物樣本可經量測或分析。例如，使用含抗體及抗體片段之溶液稀釋部分樣本後，一生物樣本可經量測或分析。例如，使用含粒子之溶液稀釋部分樣本後，一生物樣本可經量測或分析。添加至生物樣本的粒子可用作為標準品(例如可用作為尺寸標準品，於該處粒子的大小或大小分布為已知；或可用作為濃度標準品，於該處粒子的數目、含量、或濃度為已知)，或可用作為標記(例如粒子結合或黏著至特定細胞或細胞類型、特定細胞標記或細胞腔室，或於該處粒子結合至樣本內的全部細胞)。

[0194]舉例言之，一生物樣本可在下列處理後量測或分析，該等處理可分離一或多型細胞與另一型或多型細胞。此種分離可藉重力(例如濱積)；離心；過濾；接觸基材(例如一表面諸如一壁或一珠含有可結合至或黏附至一型細胞優於另一型細胞的抗體、凝集素、或其它成分)；或其它手段完成。分離可借助於或藉變更細胞型別完成。舉例言之，

溶液可添加至生物樣本諸如血樣，其造成樣本內的部分或全部細胞溶脹。當一型或多型細胞溶脹得比另一型或多型細胞更快時，可在添加溶液後，藉觀察或量測樣本而區別細胞型別。此等觀察與量測可一次或多次進行，經選擇使得強調回應差異(例如受此溶脹影響的大小、體積、內部濃度、或其它性質)，及因而提高此等觀察與量測的敏感度及準確度。於某些情況下，回應於此種溶脹，一或多個型別的細胞可爆裂而許可樣本中其它細胞型別的觀察與量測。

[0195]一生物樣本藉細胞術的觀察、量測及分析可包括光度學度量例如，使用光二極體檢測器、光倍增器、電荷耦合裝置、雷射二極體、分光光度計、相機、顯微鏡、或其它手段或裝置。細胞術可包括製備與分析在一生物樣本內之細胞影像(例如二維影像)，於該處細胞係經加標籤(例如使用螢光、化學發光、酶、或其它標籤)及鍍覆(例如許可沈降至基材上)及藉相機成像。該相機可包括一透鏡，可附接至或結合顯微鏡使用。細胞可藉其附接的標籤而於二維影像中辨識(例如來自標籤發射的光)。

[0196]藉如此處揭示的細胞儀製備及分析的細胞影像可包括無細胞、一個細胞、或多個細胞。如前文揭示，一細胞或如此處揭示的細胞儀的影像中之細胞可加標籤。如前文揭示，一細胞或如此處揭示的細胞儀的影像中之細胞可加標籤有效地識別該影像及取得樣本的個體。

[0197]於若干實施例中，一檢定分析系統係經組配成執行細胞術檢定分析。細胞術檢定分析典型地係用以光學、

電氣、或聲學方式度量個別細胞的特性。為了達成本文揭示之目的，「細胞」可涵蓋非細胞樣本，該樣本通常具有與個別細胞的相似大小，包括但非僅限於囊胞(諸如脂小體)、小群細胞、病毒粒子、細胞、原蟲、晶粒、由脂質及/或蛋白質形成的小體、及結合至小粒子諸如珠粒或微球的物質。此等特性包括但非僅限於大小；形狀；粒度；光散射樣式(或光率體)；細胞膜是否完好；細胞內部內容物的濃度、形態、及空-時分布，包括但非僅限於蛋白質含量、蛋白質改性、核酸含量、核酸改性、胞器含量、核結構、核含量、內部細胞結構、內部囊胞含量(包括pH)、離子濃度、及是否存在有其它小分子諸如類固醇或藥物；及細胞表面(細胞膜及細胞壁二者)標記包括蛋白質、脂質、碳水化合物、及其改性。藉使用呈純質形式、軛合其它分子或制動於或結合至奈米粒子或微米粒子的適當染料、染色劑、或其它標籤分子，細胞術可用以決定特定蛋白質、核酸、脂質、碳水化合物、或其它分子的存在、數量及/或改性。可藉細胞術量測的性質也包括細胞功能或活性之度量，包括但非僅限於吞噬作用、抗原呈現、細胞激素分泌、內部分子及表面分子表現的改變、結合至其它分子或細胞或基材、小分子的主動轉運、有絲分裂或減數分裂；蛋白質轉譯、基因轉錄、DNA複製、DNA修復、蛋白質分泌、細胞凋亡、趨化性、遷移性、黏附性、抗氧化活性、RNAi、蛋白質或核酸降解、藥物反應、感染、及特定路徑或酶之活性。細胞術也可用以決定有關一族群細胞的資訊，包括但

非僅限於細胞計數、總族群百分比、及針對前述任一特性於樣本族群中之變異。此處描述的檢定分析可用以量測針對各個細胞之前述特性中之一或多者，其可優異地決定不同特性間之交互關係或其它關係。此處描述的檢定分析也可用以獨立地量測多族群細胞，例如使用不同細胞系的專一性抗體加一混合細胞族群加標籤。顯微術模組許可使用該裝置執行組織學、病理學及/或形態學分析，也有助於根據物理及化學特性二者評估物體。組織可經均化、洗滌、沈積於光試管或載玻片上、乾燥、染色(諸如使用抗體)、培育及然後成像。當組合如本文它處描述的資料傳輸技術時，此等發明輔助影像從CMOS/CDD或類似檢測器傳輸至例如有照病理師用於覆核，此乃只執行流式細胞術的傳統裝置所不可能達成者。細胞儀可量測表面抗原以及細胞形態；比較傳統血液學檢驗室裝置，表面抗原許可更敏感且更專一性測試。細胞檢定分析的解譯可藉閾控一或多個度量而予自動化；閾控臨界值可由專家設定及/或根據統計方法從訓練資料習得；閾控規則針對個別個體及/或個體族群可為專一性。

[0198]於若干實施例中，將細胞儀模組結合入一服務裝置點提供典型地藉常用檢驗室裝置及實驗室量測細胞屬性的度量，用於藉受正統訓練的醫事人員解譯及覆核，改良臨床做決策的速度及/或品質。因此可組配一服務裝置點用於細胞術分析。

## 實施例1

[0199] 獲得含白血球包括天然殺手細胞及嗜中性細胞的一細胞樣本。該樣本以加螢光標籤的身分結合劑(抗-CD16結合劑)處理，該結合劑係結合至天然殺手細胞及嗜中性細胞二者。該樣本也以核染料(迪格)處理。該樣本藉螢光顯微術及暗野顯微術拍攝影像。記錄與分析樣本內不同細胞的螢光水平及光側向散射。含有抗-CD16結合劑信號的分段影像針對各細胞的螢光強度提供定量資訊(相對應於CD16表現程度)，及亦各細胞的大小。暗野影像提供各細胞散射性質的定量資訊。含有DNA染料信號的影像經分段以決定螢光強度、核的大小及形狀。

[0200] 如圖1A所示，根據不同細胞的CD16螢光及光散射之度量，識別兩大群細胞。具有亮/高CD16螢光信號及高散射的該組細胞(圖1A，右圓)為嗜中性細胞。具有中度CD16螢光信號及低散射的該組細胞(圖1A，左圓)為天然殺手細胞。雖然不同細胞的螢光及光散射之度量提供足夠資訊以歸類樣本中的大部分細胞為天然殺手細胞或嗜中性細胞，但對有些細胞而言，此等屬性的度量並未提供足量資訊來以高度準確度分類細胞。舉例言之，細胞的螢光及光散射之度量並未提供足夠資訊以準確歸類圖1A中最小圓(亦即中間圓)的該小群細胞。為了辨識最小圓裡的細胞是否為天然殺手細胞或嗜中性細胞，檢驗其核(迪格)及全細胞(抗-CD16)染色的影像。獲得該等細胞的核及全細胞面積之定量度量，及決定細胞核對全細胞面積之比。如圖1B所示，天然殺手細胞(NK)與嗜中性細胞(Neu)間的細胞核面積對

全細胞面積之比有明確差異。如此，使用定量顯微術以檢驗樣本中之細胞的多重屬性係用以許可細胞明確分類。圖1C顯示得自圖1A中最小圓的天然殺手細胞影像。全部影像具有相同長度刻度。左側影像為針對全細胞面積(抗-CD16)染色的細胞，及右側影像為只有細胞核(迪格)染色的相同細胞。在頂列及底列的影像為天然殺手細胞的不同實施例。圖1D顯示得自圖1A中最小圓的嗜中性細胞影像。全部影像具有相同長度刻度。左側影像為針對全細胞面積染色的細胞，及右側影像為只有細胞核染色的相同細胞。在頂列及底列的影像為天然殺手細胞的不同實施例。

[0201]此外，嗜中性細胞核具有獨特的多葉形狀，而天然殺手細胞(及其它淋巴細胞)的核為圓形、均勻、平滑。根據核本身的形狀，影像分段演算法可用以識別及分類細胞。

## 實施例2

[0202]獲得含血小板之一樣本。血小板係以螢光軛合抗-CD41抗體及抗-CD61抗體加標籤。具有3微米直徑的珠粒也添加至樣本。樣本係以10x及20x放大成像(圖2A)。個別血小板的螢光分布強度經測量(得自二抗體)，及決定具有高斯式分布形狀(圖2B)。個別血小板的螢光測量值經作圖，及決定強度分布匹配(圖2C)。於圖2C中，灰線為橫跨個別血小板量測得的螢光強度，及黑線為匹配。匹配參數諸如高斯平均、變量、體積、寬度、及底面積等可評估作為血小板體積之預測因子。已決定高斯體積及匹配寬度以與平均血小板體積密切相關聯。

[0203]針對前述度量，該等3微米珠粒用作為參考及基準以控制變量以準確地決定最佳焦面，及此變量對體積度量的影響。

[0204]此外，根據匹配2D模型估計的血小板大小可經校準至當量範圍(圖3)

### 實施例3

[0205]獲得含紅血球(RBC)的樣本。以低濃度界面活性劑(DDAPS或SDS)，紅血球經處理以將紅血球溶脹成球狀。紅血球係在兩根不同光試管內藉暗野顯微術成像：(A)一光試管只許可純粹表面照明(圖4A)；及(B)一光試管許可表面照明及穿透照明二者混合(圖4B)。在許可表面照明及穿透照明二者混合的光試管中比較只許可純粹表面照明的光試管，紅血球遠更清晰可見(圖4)。

### 實施例4

[0206]獲得含嗜中性細胞的樣本。於嗜中性細胞中，細胞核的形狀及染色質形態可指出其是否為未成熟的「帶狀」嗜中性細胞或成熟的「分段」嗜中性細胞。帶狀嗜中性細胞為晚近從骨髓萌出的不成熟嗜中性細胞。帶狀嗜中性細胞比例增加可指出感染或發炎正在進行中。

[0207]該樣本混合經螢光加標籤的抗-CD16抗體，其辨識嗜中性細胞上的細胞表面受體CD16。該樣本也以螢光核染料染色。該樣本藉螢光顯微鏡成像而從細胞獲得核染色及CD16染色資料。帶狀嗜中性細胞通常具有與成熟的分段嗜中性細胞相似的CD16表現程度，因此無法與單獨因來自

CD16染色的螢光強度區別。

[0208]含影像分段的影像分析係用以辨識帶狀嗜中性細胞及分段嗜中性細胞的染色及形態，藉此許可細胞的分類。檢驗細胞核的大小、形狀、及螢光強度。此外，分析細胞核以決定葉數(強度峰在核區)、核葉間距、及核輪廓曲率變化(第二導數)。圖5A顯示帶狀嗜中性細胞的代表性影像。於此等影像中，胞核呈顯為淺灰，胞質呈現為較深灰。當嗜中性細胞透過骨髓細胞系分化時，在達到完全成熟前發展出特徵性U字形核。圖5B顯示分段嗜中性細胞的代表性影像。於此等影像中，胞核呈顯為淺灰，胞質呈現為較深灰。分段嗜中性細胞核具有多段/多葉(典型地約3-5)。如此，本分析證實血液中不同嗜中性細胞亞群的識別及定量。

### 實施例5

[0209]獲得患慢性淋巴細胞性白血病(CLL)個體的細胞之一樣本。目的係量化得自個體的B細胞上CD5之表現程度。抗-CD20抗體係選用作為B細胞結合劑。以第一有色螢光加標籤的抗-CD20抗體係混合該樣本。經適當培育時間後，樣本經洗滌，去除未結合的抗-CD20抗體。樣本暴露於能夠激發第一螢光的一光源，及螢光信號係使用分光光度計測定。基於該螢光信號，決定樣本內的B細胞約略濃度。所決定的B細胞約略濃度實際上係落入於樣本內B細胞的真正濃度之1.5倍以內。

[0210]根據該樣本內的B細胞約略濃度，適量抗CD5結合劑添加至樣本，故維持CD5表現與CD5螢光間之比例關

係。抗CD5結合劑耦接至一第二螢光基團，具有與第一螢光基團(附接至抗-CD20結合劑)不同的峰激光波長。抗-CD5抗體係添加至樣本，及然後，樣本的個別細胞曝光至能夠激發第二螢光基團的一光源，及得自個別細胞的螢光信號經測量。根據得自細胞的螢光信號，決定樣本內B細胞的CD5平均含量。

[0211]雖然本實施例係以CD5為例描述，但須瞭解得知約略數目以指導用於隨後步驟的期望量材料的添加之此種構思非僅限於CD5，並不排除此種構思用於其它型別的細胞、被分析物、或物體。

#### 實施例6

[0212]血球可根據此處揭示之方法成像、識別、及定量。舉例言之，生物樣本中的細胞之二維影像可如本實施例之描述製備及分析，於該處細胞係經加標籤(例如使用螢光、化學發光、酶、或其它標籤)及鍍覆(例如許可沈降至基材上)及藉相機成像。相機可包括一鏡頭，且可附接至或聯結顯微鏡使用。細胞可藉其附接的標籤(例如得自由標籤發射的光)而於二維影像識別。

[0213]80微升得自手指穿刺的全血載荷入預先裝載2毫克/毫升 EDTA的有蓋樣本容器內。於此種情況下，使用包封的樣本容器(具有活動蓋或可刺穿蓋);須瞭解可使用盛裝此種小量樣本的任一種適當容器，包括但非僅限於有蓋容器或無蓋容器。樣本容器係在1200xg離心5分鐘以分離血球及血漿。樣本容器的離心導致樣本容器內的血樣分離成為

兩大成分(從樣本容器頂至底)：1)血漿及2)堆積血球。本處理程序確保並無血液小滴維持單離，反而係融入液體主體。此外，此種處理將血球與血漿成分分開，如此減低代謝，及許可樣本有更長儲存期。

[0214]已離心的樣本容器載荷入含多數個流體分離試劑、管尖、及細胞術光試管的一卡匣內。該卡匣含有該檢定分析所需的全部試劑。該卡匣載荷入裝配有至少一個離心機、滴量管及平台的裝置內以載入該光試管。在該裝置內的滴量管具有複數個噴嘴，有些噴嘴的尺寸與若干其它噴嘴的尺寸不同。

[0215]在該裝置內部，在滴量管上的一噴嘴下降至光試管載具工具上，使得接合載具工具上的一相對應孔。隨後此一工具移動至該卡匣，下降至細胞術光試管上。然後該工具上的插銷接合光試管上的相對應孔且拾取該光試管。該光試管被轉送至裝置內部它處的載荷站。

[0216]其次，於該裝置內部，該滴量管的較大噴嘴降入該卡匣內以接合該卡匣內儲存的滴量管管尖。然後，藉將該滴量管管尖置於樣本容器內及反複地抽取材料至管尖內及從管尖配送材料，該滴量管及管尖一起用以混合樣本容器內的細胞與血漿。一旦細胞再懸浮於血漿，使得全血樣徹底混合，5微升混合全血經抽取以提供一液分用以量測血樣的性質。此5微升液分用以針對樣本中的紅血球及血小板作量測。如後文討論，移出此5微升液分後剩餘的樣本部分用以針對樣本中的白血球作量測。

[0217] 5微升全血分配入含磷酸鹽緩衝食鹽水及2%重量比牛血清白蛋白的混合物之一容器內以將全血稀釋20倍(獲得100微升稀釋樣本)。於激烈混合後，5微升樣本移至含有加標籤抗體試劑的混合液之另一個容器內：抗CD235a軛合至艾利薩螢光(Alexa Fluor®)647 (AF647)及抗-CD61軛合至藻紅蛋白(PE)。混合物培養5分鐘。隨後，10微升此混合物混合90微升含小於0.1%重量比兩性離子性界面活性劑的緩衝液。界面活性劑分子修正紅血球膜的彎曲性質，使得全部細胞獲得穩定球狀。因所使用的緩衝液係與胞質為等張性，故此種變換係為恆定體積；故未見任何滲透壓驅動流體通過細胞膜交換。又培養2分鐘後，30微升此溶液混合含有戊二醛、固定劑及10微米直徑非螢光珠粒的一溶液。該混合物具有0.1%戊二醛終濃度及每微升1000珠粒。戊二醛快速固定細胞，如此防止細胞溶解及其它活性生物處理程序。

[0218] 於此一非限制性實施例中，然後滴量管在卡匣內接合一管尖，吸取7微升如上混合物及將7微升載入置於具有載具工具的一平台上的光試管內部的一槽道內。該混合物載入光試管後，滴量管從卡匣中的容器吸取10微升礦油，放置一滴礦油至光試管的已載荷槽道的兩開放端上。礦油添加至開放槽道的末端以防止液體從光試管的已載荷槽道蒸發。其次，裝置層級的樣本處置設備接合該光試管載具/光試管組合，及從含卡匣的模組轉運該光試管載具/光試管組合至裝置的細胞術模組。在該細胞術模組，該裝

置層級的樣本處置設備將該光試管載具/光試管組合置於細胞術模組的顯微鏡臺上。除了2分鐘等待時間外，此等操作所需時間許可在成像之前，已溶脹細胞沈降至光試管底部。

[0219]在該光試管載具/光試管組合置於顯微鏡臺上之後，鏡台移動至預定位置，使得細胞儀的光學系統可觀看含該樣本的槽道一端。於此位置，該光學系統中繼以來自環燈照明暗野所得的該樣本影像。此等影像耦合在垂直光試管平面的一軸上的該光學系統之作動用以找出最佳焦面。一旦已聚焦，該光學系統用以獲得樣本在匹配所使用的螢光基團之不同波長的螢光影像。舉例言之，為了讓已經以軛合至艾利薩螢光647的抗CD235之紅血球變目測可見，使用紅(630奈米波長)光源以激光樣本，及650奈米至700奈米間之波長用以成像樣本。複色鏡與帶通發射濾波器的組合用以從光信號濾波出非期望的波長。因細胞已沈降至光試管底部，在單一焦面的影像即足以讓該區的全部細胞變可見。

[0220]得自影像的資料係藉與該樣本處理裝置相聯結的一控制器處理。此處採用的影像處理演算法使用適應性臨界值處理及邊緣檢測的組合，利用細胞的螢光影像以檢測之。根據局部強度及強度梯度，環繞各個細胞產生關注區域(RoI)。使用暗野影像，樣本內的珠粒也經識別，及產生環繞珠粒的關注區域。在各個視野之全部關注區域經計算數目，及求出在該視野的各影像強度。由影像處理演算

法輸出的資訊包含針對各個關注區域的形狀或形態度量及螢光強度及暗野強度。此項資訊係使用統計方法分析以將各物體歸類為紅血球(對CD235a呈陽性，但對CD41/CD61呈陰性)、血小板(對CD41/CD61呈陽性及對CD235a呈陰性或珠粒。形狀描述符諸如周長、直徑、及圓度用以計算各個紅血球及血小板的體積。因珠粒係以已知濃度添加，故於全槽道上方的珠粒對細胞之平均比用以計算細胞濃度，以細胞/微升表示。根據用以處理樣本執行的步驟，此濃度係針對稀釋校正以來到原先全血樣中的細胞濃度。從一樣本計算下列數量：1)該光試管內的紅血球數目；2)該光試管內的紅血球平均體積；3)該光試管內的紅血球之紅血球分布寬度(RDW)；4)該光試管內的血小板數目；及5)該光試管內的血小板之平均體積。根據此等計算，對原先血樣求出下列。

測量值	結果	範圍實例
紅血球濃度(百萬細胞/微升)	4.8	4-6
紅血球平均體積，飛升(fL)	88	80-100
紅血球分布寬度(RDW)，(%)	12	11-14.6
血小板濃度(百萬細胞/微升)	254	150-400
血小板平均體積，飛升(fL)	10.4	7.5-11.5

[0221]在取5微升液分用於紅血球及血小板之資訊分析後，剩餘75微升血樣用以分析全血樣的白血球族群。剩餘75微升全血也係使用滴量管重複地抽吸與配送在相同容器

內的樣本而予混合。剩餘75微升已混合全血中約40微升抽吸入滴量管管尖，及藉該滴量管轉移至該卡匣內的一離心管。含血樣的離心管接合滴量管，及移轉至且沈積於該模組內的一離心機中的擺動桶。離心機提供1200xg離心3分鐘，將該血液分離成含EDTA的血漿為上清液及丸粒中的堆積血球。

[0222]離心後，離心管從離心機取下置回該卡匣。血漿上清液藉滴量管移出及轉移至卡匣中的一分開反應容器。從該卡匣內之一試劑容器，藉滴量管抽吸16微升再懸浮緩衝液，及添加至離心管內的細胞丸粒。然後，滴量管藉重複抽取及分配離心管內的混合物而將該細胞丸粒再懸浮於再懸浮緩衝液。其次，滴量管抽取21微升已再懸浮的全血及添加至含有2微升抗CD14-太平洋藍及迪格的另一容器內，混合，及培育2分鐘。然後20微升此混合物添加至80微升溶解緩衝液。溶解緩衝液為溫和界面活性劑諸如皂素結合固定劑諸如多聚甲醛的溶液。清潔劑造成細胞膜形成大量孔洞。紅血球因其獨特細胞膜性質所致，對孔洞形成特別易感而完全溶解，其內容物洩漏出至周圍液體內。固定劑的存在防止意外溶解白血球。血小板也保持不溶解。本步驟之目的係從混合物中去除紅血球，原因在於紅血球數目超過白血球數目達約1000:1。血小板不干擾成像，故與本處理程序獨立無關。溶解緩衝液也含有已知濃度的10  $\mu\text{M}$  無螢光珠粒。

[0223]培育5分鐘後，容器再度以1200xg離心3分鐘。上

清液藉滴量管尖抽取，去除紅血球碎片及其它殘骸，及沈積於卡匣內的廢棄區。該細胞丸粒內存在有約15微升含堆積白血球的液體。

[0224]為了決定存在於細胞丸粒內的白血球數目之粗略近似值，該滴量管首先將白血球再懸浮於容器內，及然後抽吸該液體用以轉移及藉分光光度計檢查。白血球懸浮液以632奈米波長光照明，該波長為艾利薩螢光647及迪格的激光波長。細胞懸浮液發射的光係藉650奈米長波通濾波器濾波，及於分光光度計內量測。此一測量值與先前產生的校準曲線相聯結以估計於該細胞懸浮液內之白血球的粗略濃度。典型地，細胞濃度係於約1,000細胞/微升至約100,000細胞/微升之範圍。此一估值係用以計算約略稀釋因數，以確保光試管內的細胞濃度限於預定目標濃度的兩倍範圍以內。本步驟目的係確保細胞不會以過高或過低密度存在於光試管上。若細胞密度過高，則影像處理演算法的準確度受損；而若細胞密度過低，則取樣的細胞數目不足。

[0225]根據於如上步驟計算的稀釋因數，含有抗CD45(泛白血球標記)、CD16(嗜中性細胞標記)及CD123(嗜鹼性血球標記)之加標籤抗體的稀釋劑係添加至細胞懸浮液及混合。

[0226]一旦複合光試管載具的光試管係位在光試管載具區段上，10微升白血球懸浮細胞術緩衝液的混合物載荷入該光試管中二槽道中之各者。在該混合物載荷入該光試管的槽道後，滴量管從該卡匣內的容器吸取10微升礦油，

及滴一滴礦油於載荷有白血球的光試管的二槽道的二開放端。

[0227]其次，裝置層級的樣本處置設備接合該光試管載具/光試管組合，及從含卡匣的模組轉運該光試管載具/光試管組合至裝置的細胞術模組。在該細胞術模組，該裝置層級的樣本處置設備將該光試管載具/光試管組合置於細胞術模組的顯微鏡臺上。在該光試管載具/光試管組合置於細胞術模組的顯微鏡臺上之後，含有白血球的光試管的二槽道如前文對RBC/血小板混合物所述般成像。

[0228]白血球的暗野影像用以計數一視野(如圖9A所示)中的細胞數。細胞表面標記用以決定一影像中的個別白血球的細胞型別；舉例言之，CD14標記單核細胞；CD123標記嗜鹼性細胞；CD16標記嗜中性細胞；及CD45-AF647用以標記全部白血球(圖9B-9E)。細胞核染色劑迪格用以標記細胞核，因而用以區別孕核細胞(諸如白血球)與成熟紅血球，紅血球沒有核(圖9F)。

[0229]此處採用的影像處理演算法利用細胞的螢光影像以使用適應性臨界值處理與邊緣檢測的組合而檢測之。根據局部強度及強度梯度，環繞各個細胞產生關注區域(Roi)。使用暗野影像，樣本內的珠粒也經識別，及產生環繞珠粒的關注區域。在各個視野之全部關注區域經計算數目，及求出在該視野的各影像強度。由影像處理演算法輸出的資訊包含針對各個關注區域的形狀或形態度量及螢光強度及暗野強度。此項資訊係使用統計方法分析以將各物

體歸類為淋巴細胞、單核細胞、嗜鹼性細胞、嗜伊紅細胞、嗜中性細胞或珠粒。根據不同型別的細胞計數、相對應珠粒計數及樣本處理期間所體現的稀釋比，求出每微升原先全血的細胞之絕對濃度。此點係針對全部白血球及各亞型計算，報告為絕對濃度(細胞/微升)及比例(%)二者。

[0230]此等量測結果的影像及作圖之實施例係呈示於圖9、10、及11。

[0231]圖9顯示得自全血樣的血球之代表性影像；此等影像係使用不同的成像技術及染料拍攝。圖9A顯示的影像係使用暗野照明對來自全血的血球拍攝。圖9B顯示的影像係對來自全血的血球拍攝，顯示來自以太平洋藍染料加標籤的抗-CD14抗體之螢光；螢光細胞為單核細胞。圖9C顯示的影像係對來自全血的血球拍攝，顯示來自以PECy5染料加標籤的抗-CD123抗體之螢光；螢光細胞為嗜鹼性細胞。圖9D顯示的影像係對來自全血的血球拍攝，顯示來自以PE染料加標籤的抗-CD16抗體之螢光；螢光細胞為嗜中性細胞。圖9E顯示的影像係對來自全血的血球拍攝，顯示來自以AF647染料加標籤的抗-CD45抗體之螢光；於此等情況下全部白血球皆發螢光。圖9F顯示的影像係對來自以迪格染色以染色細胞核之全血的血球拍攝。如此，於此等情況下白血球及血小板被染色且發螢光，但紅血球及血小板(缺核)不被染色而不發螢光。

[0232]圖10顯示依據此處揭示的方法拍攝得的影像顯示的全血中細胞型別的代表性複合影像。單核細胞(加標籤

及見於該圖左上象限，紅中心被藍紫圈包圍)、淋巴細胞(加標籤及見於該圖正中，亮紅中心被暗紅圈包圍)、嗜伊紅細胞(加標籤及見於該圖左下象限，綠心被紅緣包圍)、及嗜中性細胞(加標籤及見於該圖右下象限，綠心被黃及綠緣包圍)的影像係顯示於該圖。

[0233]關注地須識別與量化此等血樣中所見的各個細胞型別。此種分類法有多種處理方式，於若干實施例中可視為多維分類的統計問題。須瞭解該領域有寬廣多種方法可用以解決此等型別的分類問題。此種分析的特定實施例提供如下。

[0234]圖11顯示由本實施例描述的細胞術檢定分析識別與量化的各個細胞型別之作圖。圖11A顯示藉標記FL-17(以太平洋藍染料加標籤的抗-CD14抗體)之強度點(細胞)相對於FL-9(暗野散射信號)之強度以識別單核細胞的一作圖。圖11B顯示藉標記FL-19(以PE-CY5染料加標籤的抗-CD123抗體)之強度點(細胞)相對於FL-15(以PE染料加標籤的抗-CD16)之強度以識別嗜鹼性細胞的一作圖。圖11C顯示藉標記FL-15(以PE染料加標籤的抗-CD16)之強度點(細胞)相對於FL-11(以AF647染料加標籤的抗-CD45抗體)之強度以識別淋巴細胞的一作圖。圖11D顯示藉標記FL-15(以PE染料加標籤的抗-CD16)之強度點(細胞)相對於FL-9(暗野散射信號)之強度以識別嗜中性細胞及嗜伊紅細胞的一作圖。

[0235]初始單核細胞的識別(9.6%，如圖11A所示)係用以指導隨後嗜鹼性細胞的識別(0.68%，如圖11B所示)。如

圖11A及11B顯示的單核細胞及嗜鹼性細胞的識別係用以指導隨後嗜中性細胞及嗜伊紅細胞的識別(68%嗜中性細胞，3.2%嗜伊紅細胞，占圖11B所示WBC)。最後，淋巴細胞係如圖11C所示識別(占圖11C作圖WBC中之93%，占原先樣本中之細胞的18%)。

[0236]本方法與其它方法的相關性良好。白血球、紅血球及血小板數目係使用經以EDTA抗凝集的全血樣計數。進一步計數白血球以決定樣本中之嗜中性細胞、單核細胞、及淋巴細胞數目。於圖12顯示的度量中，經以EDTA抗凝集的全血樣一分為二，使用如此處揭示的方法在此處揭示的系統上跑一份樣本。另一份樣本係在亞伯特細胞動態如璧系統(美國伊利諾州森湖亞伯特診斷公司)市售多參數自動化血液學分析儀上跑。使用兩種方法所得結果的比較顯示於圖12。

[0237]如圖12A-12C所示，如藉此等方法分析顯示，藉此等方法測得的白血球(WBC，圖12A)、紅血球(RBC，圖12B)及血小板(圖12C)之數目與在相同樣本的相對應液分中藉其它方法測得的WBC、RBC及血小板之數目的相關性良好。如圖12D-12F所示，藉任一種方法測得的嗜中性細胞、單核細胞及淋巴細胞數目極為相似，彼此間相關性良好。

[0238]如此處使用的術語之多個面相中，「細胞術」係指有關一生物樣本的細胞之觀察、分析、方法、及結果，於該處細胞係實質上停駐在流體中或基材上。藉細胞術檢

測與分析的細胞可藉任何光學、電氣或聲學檢測器檢測與量測。細胞術可包括製備及分析生物樣本中的或得自其中的細胞影像(例如二維影像)。細胞可經加標籤(例如使用螢光、化學發光、酶、或其它標籤)及鍍覆(例如許可沈降至基材上)及典型地藉相機成像。顯微鏡可用於細胞術的細胞成像；舉例言之，細胞可藉相機及顯微鏡成像，例如藉使用顯微鏡成像的相機。藉細胞術及用於細胞術的一影像典型地包括多於一個細胞。

### 光學系統

[0239]現在參考圖6A及6B將描述適合此處使用的光學系統之一實施例。雖然該系統之此等實施例係以能夠執行細胞術之脈絡描述，也須瞭解系統之實施例也可具有超出細胞術的用途及能力。舉例說明但非限制性，此處揭示的系統之成像及影像處理能力可用於許多應用，包括細胞術以外的應用。因拍攝接受分析的樣本之影像，系統中影像資訊典型地係鏈接或關聯至定量度量，可進一步分析與定量資訊相聯結的影像以收集影像中(否則將不報告)的臨床資訊。

[0240]欲分析例如藉細胞術或其它光學或成像手段分析的樣本可置於樣本容器上進行分析。舉例言之，光試管可作為此種樣本容器。圖6A所示實施例顯示有複數個開口602以接納樣本或其部分供分析用之一光試管600的透視圖。圖6A之實施例的水平截面形狀為矩形水平截面形狀。雖然該系統係就光試管的脈絡作描述，但須瞭解其它樣本

盛裝裝置也可用以置換或組合光試管600。

[0241]如圖6A之實施例可知，開口602許可樣本處置系統(圖中未顯示)或其它遞送系統沈積樣本至開口602內，開口602可連結且可前導至光試管內的一分析區608，於該處可分析樣本。於一個非限制性實施例中，一分析區608可為一腔室。於另一個非限制性實施例中，一分析區608可為一槽道。於實施例中，組配為槽道的一分析區608可連結二進入埠口602。於又另一個非限制性實施例中，一分析區608可為一槽道，其中樣本係以非流動方式盛裝。於此處之任一個實施例中，於分析期間系統可以非流動方式盛裝樣本。選擇性地，有些替代實施例可經組配以許可樣本在分析之前、之中、或之後流經分析區。於若干實施例中，於分析後，樣本係從光試管600萃取，然後遞送至另一站(於具有多站的系統中)以供進一步處理及/或以供進一步處理及/或分析。有些實施例可於系統使用閘門以控制樣本流。

[0242]圖6A顯示於光試管600之若干實施例中，一光試管600可具有複數個開口602。樣本可透過進入埠口602加至樣本容器。一開口602可操作式地連結(例如呈流體連續)一分析區608。一分析區608可操作式地連結(例如呈流體連續)複數個開口602。須瞭解若干實施例在光試管600中可具有更多個或可具有更少個開口602。有些實施例可鏈接某些開口602使得選取的成對或其它開口602集合可接取相同槽道(例如組配為一槽道的分析區608)。舉非限制性實施例，在分析區608的各端可有一開口602。選擇性地，在分析區608

的一端可有多於一個開口602。

[0243]光試管600之實施例可具有許可一樣本處置系統接合與轉運光試管600的結構610。如圖6A及圖6B示例說明的一光試管600可透過一元件610藉一樣本處置系統接合，光試管600可從一個位置有效地轉送至另一位置。例如，於光試管600轉送至一位置(諸如光學成像及分析的檢測器上方)之前或之後，一元件610也可用以固定一光試管600於一期望位置，光試管600可藉元件610固定定位或藉利用一元件610來將一光試管600固定定位的工具或裝置固定定位。於一個非限制性實施例中，結構610可具有開口於光試管600，該等開口許可滴量管或其它長條構件接合光試管600及轉送至期望位置。選擇性地，替代或組合該(等)開口，結構610能或可包括一凸部、鉤、磁鐵、可磁化元件、金屬元件、及/或能夠用以接合一光試管轉送裝置的其它特性件。於實施例中，力(例如壓縮力或其它力)可施加至一光試管600；舉例言之，壓縮力可施加至一光試管600以加壓光試管600至一基材或表面上(例如底座支架620表面)，有效地將光試管600配置成與該表面作有效光接觸。於實施例中，此種力(例如壓縮力)可輔助提供期望的光學性質，諸如提供光試管600與底座支架620間之良好接觸，有效地許可光通過而無在界面的顯著失真，或無在界面的顯著反射，或其它期望的光學性質。於實施例中，此種力(例如壓縮力)至少部分可透過一結構610或多個結構610施加。

[0244]如圖6B(透視圖)所示，光試管600可具有圓形水

平截面形狀。一開口602(或多開口602，其可存在於相似實施例但圖中未顯示)可許可樣本處置系統或其它遞送系統沈積樣本至開口602內，然後前導至光試管內的分析區608，於該處可分析樣本。適當分析區608之非限制性實施例包含含一腔室的分析區608及含一槽道的分析區。於實施例中，此種分析區608可位在環狀結構內部，諸如圖6B顯示的環狀結構。於實施例中，一開口602可連結一分析區608。於實施例中，一結構604內部的一分析區608可形成一連續環形腔室，連結一開口608以有效地許可腔室內部之流於遠離開口602的二方向中之任一方向流動。於實施例中，一結構604內部的一分析區608可形成一環形槽道或腔室，一端連結一開口608，另一端與開口602分開或堵住開口602，有效地許可腔室內部之流只於遠離開口602的單一任一方向流動。於實施例中，此種單向環形槽道或腔室可具有一通風口或其它孔口在選離開口602的位置。於又另一個非限制性實施例中，分析區可為或可包括一槽道，其中該樣本係以非流動方式盛裝；樣本可以非流動方式盛裝於包含一環形槽道的一分析區608，該環形槽道可從二方向連結至一開口602，或該環形槽道可只從單一方向連結至一開口602。於此處之任一個實施例中，於分析期間，系統可以非流動方式盛裝樣本。選擇性地，此等替代實施例可經組配以許可樣本在分析之前、之中或之後流經該分析區。於若干實施例中，於分析後，樣本係從光試管600萃取及然後遞送至另一站(於具有多站的系統中)以供進一步處理及/或以供進

一步處理及/或分析。有些實施例可於系統使用閘門以控制樣本流。

[0245] 圖6B顯示只有單一環狀結構604；但須瞭解於如圖6B示例說明而成形的一光試管600的又一實施例中，一光試管600可具有複數個環狀結構604。舉例言之，具有複數個環狀結構604的一光試管600可具有不同尺寸的同心環狀結構604，一外環狀結構604環繞一或多個內環狀結構604。此種環狀結構604可包括在各個環狀結構604內部的分析區608。圖6B只顯示單一開口602；但須瞭解於圖6B示例說明之光試管600的又一實施例中，一光試管600可具有複數個開口602。舉例言之，有複數個環狀結構604(例如具有複數個同心環狀結構604)的一光試管600可具有複數個開口602(例如各個環狀結構604可具有至少一個開口602)。須瞭解若干實施例在一光試管600內可具有更多的或更少的開口602。有些實施例可鏈接某些開口602，使得擇定成對開口602或其它集合可接取相同通道或腔室。舉非限制性實施例，在一分析區的各端可有一開口602。選擇性地，多於一個開口602可在一分析區的一端。

[0246] 如圖6A及6B示例說明的光試管之若干實施例可提供在一光試管600的擇定區上方的結構604。於一個實施例中，結構604為加強肋，針對經擇定具有控制厚度的該光試管區(例如區613)提供該光試管區的結構支撐。舉例言之，該厚度可經選擇以提供期望的光學性質，包括期望路徑讓光在光試管600內部反射之前及之後遵循。此種反射可

為部分內反射(PIR)或全內反射(TIR)。是否出現此種反射係取決於多項因素，包括光波長；到達一表面之光的入射角；材料組成(區613及在區613邊界以外的環境或材料)；及其它因素。於圖6A顯示之實施例中，結構604之形狀為矩形，具有矩形截面。於圖6B顯示之實施例中，結構604之形狀為環形，具有矩形截面，或梯形截面，或其它形狀的截面。此等結構可具有任何合宜的剖面形狀。如圖8B之示例說明，此種結構604可具有三角形截面(例如當存在有多個加強肋時形成鋸齒形截面)。須瞭解此等結構604也可具有其它形狀及截面(例如半圓形、橢圓形、不規則形、或其它形狀)，及於實施例中，同一個系統中可存在有多於一個形狀(例如一光試管可包括矩形、三角形、或其它形狀的結構)。當控制厚度區613的厚度比該光試管的某些區之厚度相對減薄時可使用結構604，及如此獲得由結構604提供的機械支撐效果。

[0247]除了提供結構支撐之外，結構604用以提供光試管600內部光之內反射的材料及路徑為有用的。如圖8A-8D所示，一光試管600內部反射光可包括在一結構604(例如一加強肋或具有三角形截面的結構，如圖所示，或任何其它形狀，諸如圓形或半圓形截面或其它截面形狀)內部之反射光路徑。如此結構604可提供從光試管600表面614向外延伸的凸面特性件；或可提供從光試管600表面614向內延伸的凹面特性件；或可提供光試管600的一表面614上的凹面及凸面二特性件。如此，結構604可提供對光試管600的機械

支撐，可提供期望的光學性質含光路徑給光試管600，及如此處揭示可提供其它期望的及有用的特性件及能力給一光試管600。

[0248]如此支撐結構604可提供結構支撐含例如加勁給一光試管600為有用的。一光試管600的光學性質對其用在一分析區608內的樣本及此等樣本的細胞、粒子、及其它成分的光學成像及其它光學量測的用途相當重要。光試管600表面之適當平坦度的維持包括一表面614或618的基底部606之平坦度的維持；光試管600的適當方向性及組態的維持(例如沒有扭轉、彎曲、或其它失真)；及光試管600的適當定位的維持(例如在底座支架620上，或在光學組合內部)可能對使用光試管600獲得的光學測量值及影像的完整性相當重要。如此，舉例言之，支持結構604及基底部606的設計及組成可能為提供與維持光試管600的適當光學性質的重要因素。維持一分析區608的適當維度，包括維持分析區608的上表面及下表面(或側壁)的適當距離及相對夾角對於在一分析區608內部提供一樣本的正確且一致的照明相當重要。維持一分析區608的適當維度可能也對確保一分析區608的體積及因而分析區608內部的樣本體積為正確上重要。如此處討論，可施加力(例如壓縮)至一光試管600以進一步確保適當平坦度，或減少扭轉或失真，或以其它方式確保一光試管於使用期間的適當形狀、大小、及方向性。須瞭解可能無需壓縮以確保一光試管於使用期間的此種適當平坦度及適當形狀、大小、及方向性。舉例言之，於實

施例中，單獨結構604可能即足以輔助或確保一光試管600於使用期間具有適當平坦度及適當形狀、大小、及方向性。此外，須瞭解於實施例中，單獨壓縮可能即足以確保一光試管600於使用期間的此種適當平坦度及適當形狀、大小、及方向性。須瞭解於實施例中，結構604與壓縮的組合可能可以輔助及確保一光試管於使用期間的此種適當平坦度及適當形狀、大小、及方向性。

[0249]一光試管600含一支持結構606及蓋部612可由具有合宜光學性質的任一種材料製成。於實施例中，一光試管600含一支持結構606及蓋部612可由玻璃(例如石英，或硼矽酸鹽玻璃，或鋁矽酸鹽玻璃，或鈉矽酸鹽玻璃，或其它玻璃)製成。於實施例中，一蓋部612或一底座支架620可由丙烯酸系，或澄清聚合物(例如環烯烴、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚胺基甲酸酯、聚氯乙烯、或其它聚合物或共聚物)、或其它透明材料製成。除了此等材料的光學性質之外，物理性質(例如硬度、挺度、熔點、切削能力、及其它性質)、與其它材料的可相容性、成本、及其它因素可能影響製作光試管600的材料之選擇。如前文討論，結構604的存在、壓縮之利用率(例如可透過結構610施加，或直接施加至支持結構606及蓋部612的至少一部分)、及其它因素可能許可比石英(舉例)更不具剛性的材料的使用，但仍可提供用在此處揭示的系統及方法之所要求的光學及機械性質。此外，結構604的存在、壓縮之利用率、及其它因素可能許可使用否則在無此等結構、壓縮及其它因素的存在

下，不可能使用的該等製造技術及公差(例如由於失真的可能或其它因素)。此外，結構604的存在、壓縮之利用率、及其它因素可能許可使用比較在無此等結構、壓縮及其它因素存在下所使用的材料，包括更廉價材料。

[0250]如此，支持結構604及基底部606的適當設計、組成及材料對光試管600及其使用上相當重要。

[0251]於若干實施例中，此等控制厚度區613(例如參考圖8A、8B及8D)係經選擇置放於分析區608上方。於若干實施例中，此等經控制厚度區613可於分析區上方或附近賦與某些光學性質。若干實施例可組配該等結構604也對通過光試管600的光賦與某些光學性質。選擇性地，於若干實施例中，結構604可經組配以對光試管600的光學性質沒有影響。於此一實施例中，結構604可經組配以具有一或多個光吸收表面。舉例言之但非限制性，某些表面可為黑色。選擇性地，有些實施例可具有從吸光材料製成的結構604。選擇性地，結構604可設置以提供機械支持，但不與光試管600接近分析區的光學性質交互作用。

[0252]舉例言之，某些表面含控制厚度區613之一表面614及結構604之一表面618可塗覆以黑色或它色塗覆物。此種塗覆物可包括一層，及可包括多層。舉例言之，表面614或618的合宜塗覆物可包括2、3、4、5、6、7或更多層。於實施例中，例如結構604表面(例如表面618)或表面614可以3或5層塗覆物覆蓋。此種塗覆物可包括染料、墨水、塗料、表面處理、彩色帶、或其它塗覆物或表面處理。於實施例

中，黑色或它色麥克筆(例如紙媒筆(Paper Mate®)或銳筆(Sharpie®)或奇異筆(Magic Marker®)或其它麥克筆)可用以塗覆控制厚度區613之一表面614或結構604之一表面618。舉例言之，超大型黑麥克筆可用以施加多層黑墨水塗層至表面614或至結構604之一表面618以提供光吸收表面，及因而改良光試管600的光學品質。於實施例中，表面614或618可經塗覆或處理以影響或減少表面的反射比(無論PIR或TIR)。表面反射比的減低可能影響(或減少)來自一表面的背景照明。

[0253]於實施例中，某些表面含控制厚度區613之一表面614及結構604之一表面618可塗覆以或覆蓋以提升表面反射比的材料。表面的反射比可藉例如塗覆表面或附接材料至一表面而予增加；提高反射比的合宜材料包括鋁、銀、金、及介電材料(例如氟化鎂、氟化鈣、或其它鹽或金屬氧化物；或其它反射材料或其它介電材料)。此種塗層或蓋層可包括一層，也可包括多層。例如，表面614或表面618的合宜塗層或蓋層可包括2、3、4、5、6、7或更多層。表面反射比的增高可能影響(例如增加)來自表面的透射照明。表面反射比的增高可能輔助或加強在一分析區608內部的樣本之成像，或可輔助或加強在一分析區608內部的樣本之光學分析。

[0254]須瞭解光試管600典型地係從光學透明或光學透射材料製成。選擇性地，只有光試管600的擇定部分(例如分析區或與分析區相聯結區)係為光學透明或光學透射。選

擇性地，光試管600內的擇定層或區也可組配成非光學透射。光試管的一部分或一區可經覆蓋或塗覆，因而為光吸收性；舉例言之，一表面(或其部分)可經塗覆以深色或吸光染料或墨水。於又一實施例中，一表面(或其部分)可經覆蓋以深色或吸光塗覆層，諸如深色或吸光材料，例如膠帶、或帶、或紙、或橡膠、或塑膠。

[0255]圖6A、6B、及8A-8D示例說明實施例，其中光試管600停駐在一底座支架620上，其中部分或全部底座支架620係從光學透明或透射材料製成。於若干實施例中，光學透明或透射部係經組配而與光試管600的分析區對齊，以許可於該分析區中的該樣本之光學查詢。於一個非限制性實施例中，底座支架620可於X、Y、及/或Z軸移動以移動光試管600至期望的成像位置。於若干實施例中，底座支架620包含一平台或臺只在該等軸中之二者移動。選擇性地，有些支持結構可只於單軸移動。光試管600可經組配以透過摩擦、機械耦合、或藉安裝於該等組件中之一或二者的扣件而操作式耦接至支持結構600。於實施例中，壓縮力或其它力可施加至一光試管600或一底座支架620或二者以確保一光試管600與一底座支架620間之適當接觸及適當匹配。於實施例中，此種壓縮可輔助確保一光試管600或一底座支架620的光學透射表面或二者的此種表面係為光學平坦及實質上不含失真。舉例言之於實施例中，一光試管600可對一底座支架620加壓以減少或消除可能由光試管600的光學表面的瑕疵或異常所可能引起的任何可能光學失真。於實施

例中，此種力(例如壓縮)可輔助提供期望的光學性質，有效地許可失真光通過界面而非產生失真光。於實施例中，此種力(例如壓縮)可至少部分透過一結構610或透過多個結構610施加。

[0256] 圖6A、6B、8A、8B、8C、及8D進一步顯示實施例其中可藉放置於底座支架620下方的照明源650(諸如但非僅限於如圖所示的環燈)以定位發光設備在光試管600高度下方，提供暗野及/或亮野觀察的發光。本組態留下滴量管、樣本處置系統、或其它設備可利用的光試管600之上區具有未經遮掩的接取光試管600頂面上的開口或其它特性件。選擇性地，有些實施例可定位一照明源660(圖中以虛線顯示)於光試管600上方，欲用以置換與底側發光(例如如圖所示底側照明源650)的單一或多重重組合。一物鏡670可定位成如圖所示或於其它組態以觀察發光樣本。須瞭解光試管600與光學部650及670間之相對移動可用以許可系統視覺化光試管600內的不同分析區。選擇性地，此等組件中唯有一者係配置成活動式以查詢光試管600內的不同分析區。

[0257] 現在參考圖7A，將以進一步細胞描述合宜成像系統的一個實施例。圖7A顯示位在底座支架620下方的各個組件之示意剖面圖。截面係沿圖6A中箭頭7指示該區。

[0258] 圖7A顯示一實施例其中光試管600包含一基底部606及由一蓋部612所界定的分析區608。選擇性地，分析區608可界定於單件內部。選擇性地，分析區608可使用多於兩件界定，諸如但非僅限於針對分析區608各自的一分開

蓋件。於一個實施例中，層606包含光學透明塑膠，諸如但非僅限於遞送優異的光學組件及應用的環烯烴聚合物熱塑性聚合物。有些實施例可從玻璃、丙烯酸系、透明聚合物、或其它透明材料製成一或多個層或組件。圖7A示例說明的光試管600包括五個分開分析區608；此等區以剖面圖顯示於附圖；有此種剖面圖的分析區608可為矩形、或方形、或其它形狀。舉例言之，分析區608可包含長條槽道，提供淺腔室具有相對大量表面積，藉此可觀察樣本。須瞭解一光試管600可包括單一分析區608；或可包括二個分析區608；或可包括三個分析區608；或可包括四個分析區608；或可包括五個(如圖7A所示)或更多個分析區608。

[0259]於此一非限制性實施例中，欲查詢的樣本可全部或部分罩在分析區608內。舉非限制性實施例，在底座支架620下方的光學元件可包括環燈650，包含一環面反射器652及一光源654。可使用適用於暗野發光的其它發光組件；如此光學元件可包括其它照明源，單獨地或組合此種環燈。若干實施例可使用一鏡。若干實施例可使用一經塗覆之反射面。若干實施例可使用與圖中顯示者不同的反射器(例如於照明一樣本時可不使用環面反射)。若干實施例可使用拋物面反射器。若干實施例可使用呈橢圓拋物面形的拋物面反射器。若干實施例可使用複數個個別反射器塊。若干實施例可不使用任何反射器。若干實施例可透過彎角光源的使用獲得斜向照明，該光源定位以導引光有或無來自一或多個外部反射器的進一步協助。

[0260] 圖7A示例說明之實施例顯示激光能源680、682及684，諸如但非僅限於特定波長的雷射二極體，安裝以導引光進入分析區608中的樣本。於一個非限制性實施例中，為了協助精簡封裝，能源680、682及684可導引光至雙色元件690(例如雙色鏡或分束器)，然後將激光波長導引入分析區608。激光波長造成欲由樣本中的標記、染料及/或其它材料的螢光基團發射的螢光波長。發射的螢光波長透過物鏡670，透過雙色元件690，透過選擇性濾波輪692，及進入檢測器700，諸如但非僅限於相機系統。舉非限制性實施例，雙色元件690係經組配以反射激光波長，反而通過螢光波長及光學觀察的任何期望的波長。

[0261] 於一個實施例中，全部螢光激光波長同時照明分析區608的樣本。舉例言之，檢測器700可耦接至可規劃處理器710，可拍攝信號及/或影像及解構與發螢光的螢光基團相聯結的波長。於若干實施例中，激光源可循序地或於激光源整個數目的子集照明。當然，須瞭解系統並非限於樣本中的螢光基團之以螢光為基礎的激光，其它檢測技術及激光技術可用以置換或單獨或與螢光多重組合。舉例言之，若干實施例也可同時地或循序地組合螢光檢測以收集暗野照明散射資訊。

[0262] 由樣本容器(例如細胞、或珠粒，或晶體)內部的樣本之一物體散射光將以多個散射角散射，於該處一散射角可就從光源通至物體的入射光線測量。此種複數個散射角包含一定範圍的散射角。此種樣本容器可具有如此處揭

示的特性件，且可經組配以提供內部光反射的路徑。經組配以成像物體的一物鏡將收集及聚焦散射光，於該處光可通至一檢測器。由一物鏡聚焦及聚焦在檢測器上的此種光可形成檢測器上的光點。於實施例中，從物鏡通至檢測器的光可由又一透鏡聚焦；此種聚焦可縮小在檢測器上形成的光點大小。聚焦在檢測器上的光無論是否通過又一透鏡，將包含來自樣本容器內部的物體在複數個散射角散射光。

[0263]申請人於此處揭示比較其它可能許可檢測較小範圍的散射角之方法、系統、及裝置(例如樣本容器)，藉此提出在樣本內部的樣本及物體的較高解析度及較佳成像。申請人於此處揭示設計光試管的特性件，其可透過PIR及TIR用以控制入射在樣本上的光線之角度及強度，有效地控制散射光的量角。

[0264]因許多系統的非成像光學元件加諸的限制(例如光學擴展量，或通過系統的光擴展程度)，到達檢測器的光之散射角可比期望更寬。舉例言之，於使用LED作為光源的某些環燈-光試管組合中，撞擊樣本的光線可環繞主要角度展開成至少20度。換言之，若主光線以60度撞擊樣本，則光線束的其它光線可以約50度至約70度散射角撞擊樣本。須瞭解由物鏡收集的光的散射角錐的展開係取決於透鏡的數值孔徑。於此種情況下，由物鏡(例如具有70度的數值孔徑)所收集的光將呈約30至70度的錐形。結果，透過寬廣範圍的散射角散射的光將到達檢測器；例如，此種系統

將量測於取中於約60度±40度的大錐角內由樣本散射的全部光。但如此處揭示，某些應用要求檢測於較窄範圍散射光，例如極窄角度範圍(例如 $60\pm 5$ 度)內的光。申請人於此處揭示為了提供來自此較窄範圍內的光度量，一孔隙可置於物鏡的富利葉平面(或背焦面)(或與此平面軛合的任何位置)。於該富利葉平面，角資訊係經空間編碼。因此，取決於此孔隙的形狀及大小，來自樣本的特定角度光可避免到達檢測器(例如被阻斷或濾掉)。環狀孔隙將阻擋或濾掉內角(例如 $60\pm 30$ 度)。因此所得度量可調整至期望角度。

[0265] 於實施例中，可設置一孔隙，來自物鏡的光在接觸檢測器之前係通過該孔隙。於實施例中，可設置一孔隙，來自又一透鏡(在通過物鏡之後)的光在接觸檢測器之前係通過該孔隙。當該孔隙係組配成通過檢測器的光時，比較無此種孔隙存在時通過檢測器的光，通過檢測器的該光將縮減成來自較少散射角的光，且縮減成來自較小範圍散射角的光。於實施例中，此種孔隙可包含單孔，諸如圓孔。於實施例中，此種孔隙可包含單環，諸如光可通過圓環，及具有光不通過的中區(例如圓形區)。於實施例中，此種孔隙可包含2或3或更多個光可通過其中的同心環，及包括光不通過的中區(例如圓形區)。於實施例中，此種孔隙可包含圓形或環形的形狀。

[0266] 配置於一物鏡與一檢測器間的，例如配置於又一透鏡及一檢測器(於該處在通過又一透鏡之前，光通過一物鏡)的此一孔隙提供從樣本散射光的更鮮明甄別之優點，改

進得自樣本的光散射影像(例如暗野影像)的解析度。於實施例中，於該處光強度可為一項因素，比較缺乏如此處揭示的孔隙之組態，具有如此處揭示的孔隙之組態可增高施加的光(例如來自一光源，或來自多光源)強度。

[0267]一系統可包括具有如此處討論的及描述的特徵之一樣本容器，及光源、雙色鏡、及如圖7A所示的其它元件。如圖7B之示例說明，具有相似的特性件之系統(例如圖7A及此處其它圖式所示)可包括一樣本容器600、一光源650(例如光源654，或激光源680，或二者)、一物鏡670、一孔隙694、又一透鏡696、及一富利葉透鏡698。孔隙694可具有單一通道以許可光通過至一檢測器700。檢測器700可操作地鏈接至一處理器710(例如可規劃處理器)。於實施例中，一孔隙694包含兩個通道以許可光通過檢測器700。於實施例中，一孔隙694包含三個通道以許可光通過檢測器700。於實施例中，一孔隙694包含四或更多個通道以許可光通過檢測器700。於實施例中，一孔隙694中的一通道可包含一圓孔以許可光通過檢測器700。於實施例中，一孔隙694中的一通道可包含2、或3、或4或更多個圓孔以許可光通過檢測器700。於實施例中，一孔隙694中的一通道可包含一環經組配以許可光通過檢測器700，及可包括一中部其係不允許光通過檢測器700。於實施例中，一孔隙694中的一通道可包含2或更多個環(例如於實施例中同心環)，其各自係經組配以許可光通過檢測器700，及此種孔隙694可包括一中部其係不允許光通過檢測器700。此種環及此等環可

具有圓形，或橢圓形，或其它環形。

[0268]據此，申請人揭示用以成像一樣本之系統，包含：一樣本容器；用以照明保有在該樣本容器內部的一物體之一光源；一物鏡其係經組配以收集並聚焦從保有在該樣本容器內部的一物體所散射的光，其中該散射光包含以複數個散射角散射之光；用以通過來自該物鏡的光之一光孔隙；及經組配以將來自該物鏡的光聚焦至該光孔隙上的又一透鏡，其中該光孔隙係經組配以只許可由該物鏡聚焦的一部分光通過該孔隙，藉此許可通過該孔隙的該部分光係由只於該等複數個散射角中之一部分所散射的光組成。

[0269]如此處使用，「表面」及「表面照明」係指藉於一方向行進的光照明一樣本，該方向係大致上遠離用以觀察或成像該樣本的一物鏡或其它光學元件。如此，於無螢光存在下，藉表面照明所形成的照明樣本影像係以從該樣本反射或散射的光形成(光從光源行進至該樣本，藉該樣本反射或散射回光學元件用於觀察、成像、或量測)。如此處使用，「穿透」及「穿透照明」係指藉於一方向行進的光照明一樣本，該方向係大致上朝向用以觀察或成像該樣本的一物鏡或其它光學元件(光從光源行進至且通過該樣本，及繼續前進至光學元件用於觀察、成像、或量測)。如此，於無螢光存在下，藉穿透明所形成的照明樣本影像係以從該樣本通過或散射的光形成。

[0270]當一光源係設置於一樣本之與以觀察或成像該樣本的該物鏡或其它光學元件的同側上時，來自光源的光

直接行進至樣本，如此，樣本典型地係藉表面照明觀察或成像。但即便當唯一光源係設置於一樣本之與該物鏡或光學元件的同側上時，除了表面照明外，如此處揭示的樣本容器能夠提供樣本的穿透照明。如此，許可二照明方向而不要求光源置放於一樣本的兩側上。此種組態精簡，節省資源，且因光源及其它光學元件只配置於樣本容器的一側上，故該組態許可無障礙地接取樣本容器該側而不受光學元件干擾。如此，此種組態提供許可載荷、混合、及移出樣本容器內的樣本及試劑之優點，而不與光學成像或量測干擾，或不與用於光學成像或量測的設備及元件干擾。

[0271]如圖4A及4B顯示的影像之示例說明，添加穿透照明至暗野影像，大為增強影像及大為提升得自影像之資訊。此處揭示的方法及系統藉使用來自單一方向的照明，及於實施例中只來自單一光源的照明，藉組合表面照明及穿透照明二者而提供如此大為增強的影像。

[0272]如此處揭示，一樣本容器諸如一光試管600(例如如圖8A-8D之示例說明)係經組配以許可來自一光源光的內部反射(包括PIR或TIR)，故於光試管600的分析區608之一樣本容器係藉直射光照明(表面照明；例如沿路徑830行進之光)，及也藉間接反射光照明(穿透照明；例如沿路徑820或825行進之光)。如此處揭示，來自配置在一光試管600的與光學元件670、690、700等同側上的一光源之光可提供一樣本的表面照明及穿透照明二者。

[0273]現在參考圖8A-8D，現在將描述又另一實施例。

圖8A-8D顯示一光試管600的一部分及暗野散射照明源，諸如但非僅限於圖6A及6B顯示的環燈650之一部分的剖面示意圖。底座支架620也顯示於圖8A-8D。圖8A-8D包括括號及箭頭以指示結構或部分結構；例如，標示為600的括號指示該圖顯示的整個光試管600；標示為612的括號指示光試管600的蓋部612。圖8A中之箭頭621至626指示蓋部612的所指示部分之維度。須瞭解此等維度於一光試管600的不同實施例中可相異，及此等變異可取決於大小、應用、材料、光波長、樣本、及與一光試管600的組成及使用相關的其它元件及因素。舉例言之，於實施例中，支持結構604間距621可為約0.1毫米(mm)至約1厘米(cm)，及於實施例中可為約1 mm至約100 mm，或約1.5 mm至約50 mm，約2 mm至約20 mm。於進一步實施例中，支持結構604間距621可為約0.5 mm至約10 mm，或約1 mm至約5 mm。於實施例中，支持結構604之高度622可為約0.1 mm至約100 mm，或約0.5 mm至約50 mm，或約1 mm至約25 mm。於進一步實施例中，支持結構604之高度622可為約0.1 mm至約10 mm，或約1 mm至約5 mm。同理，於實施例中，經控制厚度區613之高度623可為約0.1 mm至約100 mm，或約0.5 mm至約50 mm，或約1 mm至約25 mm。於進一步實施例中，經控制厚度區613之高度623可為約0.1 mm至約10 mm，或約1 mm至約5 mm。於實施例中，一層800之厚度624可為約0.01 mm至約10 mm，或約0.05 mm至約1 mm，或約0.1 mm至約0.5 mm。於實施例中，分析區608之寬度625可為約0.05 mm至約100

mm，或約0.5 mm至約50 mm，或約1 mm至約25 mm。於進一步實施例中，分析區608之寬度625可為約0.1 mm至約10 mm，或約1 mm至約5 mm。於實施例中，支持結構604之寬度626可為約0.1 mm至約100 mm，或約0.5 mm至約50 mm，或約1 mm至約25 mm。於進一步實施例中，支持結構604之寬度626可為約0.05 mm至約10 mm，或約0.5 mm至約5 mm。

[0274]須瞭解如此處之任一圖示例說明，用於照明、激光、觀察發光等的光學組件及配置可提示可應用於其它圖式之實施例的組件及配置，即便此等特定組件或配置並未明確地顯示於各圖亦復如此。舉例言之，雖然環燈650或其它照明源650並未含括於圖8D，但於所示之任一個實施例中及於其它實施例中，環燈650或其它照明源650(例如參考圖8A、8B、及8C)可用以照明分析區608(分析區608係顯示於圖8A及8B)。作為適用於一光試管600的光學組件之實施例，環燈組件652及654顯示於圖8A、8B、及8D；於實施例中可利用其它或其它數目的照明組件。舉例言之，光源654可為白光或光源，諸如但非僅限於有特定波長或波長輸出的發光二極體(LED)或雷射二極體。選擇性地，光源654之環可為光纖纜經組配以提供一燈環(例如有許多絞接處)。選擇性地，光源654可為LED，具有由反射器控制的特定窄發散角。可能期望透過光源的選擇及/或透過反射器的設計而控制來自環燈650的發散角。

[0275]舉非限制性實施例，一光源654可運用雷射發光

以提供窄燈樣式，結果導致在目前表面樣式照明組態(於該處發光組件皆係在該樣本的一側上)中的較低穿透照明背景，原因在於該光源：提供一窄光點(導向樣本分析區608內部)；提供窄頻寬之光(例如在取中於一特定主波長的一狹窄範圍內部的波長光)；且為一內聚光源。選擇性地，使用LED作為照明源654也可提供小光點(例如在分析區608內部的一小點大小)，及提供由雷射光源達成的若干有利性質。因此等及其它理由故，雷射光源(或提供小光點的LED)比較其它照明組態係有效地降低背景信號位準。比較使用更加漫射光源典型出現者，雷射照明可減少散射光，如此藉減少光從一鄰近槽道(例如來自相鄰第二分析區608)散射入一個槽道(例如在第一分析區608內部)，可減少該槽道的背景。如此，比較從藉更加漫射光源照明預期者，雷射照明可導致較少穿透照明背景。當然期望穿透照明的減低係少於背景的減低，於該處更顯著的背景減低導致更加可區別的信號。選擇性地，利用LED作為照明源654，提供漫射光樣式，有增加的背景及增加的穿透照明。當然期望穿透照明的增加係大於背景的增加。

[0276]若干光試管實施例可包括從複數個個別層黏合在一起所形成的光試管，具有從一或多種材料模製成的光試管，及/或具有反射層於不同表面添加至該光試管以增強單一或多重重內反射(例如加強TIR或PIR)。

[0277]於實施例中，如此處揭示的系統、光試管、及光學元件可組合螢光操作，可能期望用於此等系統及光試管

的暗野照明係非為白光照明。但例如若螢光檢測未組合暗野及亮野顯微術使用，則若干實施例可只使用白光。

[0278] 圖8A及8B顯示於若干實施例中，該裝置在光試管600可具有典型為不透光的多層，諸如層800。如此於光源654為漫射及光不導向特定位置之實施例中可為有用。層800可阻擋非以期望角度及/或位置進入光試管600的光。層800可經組配以配置以防止照明，但穿過分析區608下方區除外。有些可只有特定區在最接近分析區608之處封鎖。若干實施例可在多於一層具有封鎖材料或非透射材料。有些可在不同方向具有封鎖材料或非透射材料，諸如但非僅限於一個方向為水平，及一個方向為垂直或非水平。

[0279] 於實施例中，須瞭解一層800可為光透射性。例如圖8D呈現其中一層800可為光透射性之一實施例。於若干實施例中，一層800可包含光透射材料，具有與經控制厚度區613或底座支架620或二者的折射率不同的一折射率。於若干實施例中，一層800可包含光透射材料，具有與經控制厚度區613或底座支架620或二者的折射率相同的一折射率。

[0280] 於圖8A、8B、及8C中，一光源係顯示為位在一光試管600下方(接近光學元件652及654)，及提供從基底部606下方導向光。可瞭解此種光源也可位在圖8D示例說明之實施例中。如此等圖式顯示，一光源650可包括一環燈654及一環面反射器652。其它元件包括但非僅限於透鏡、濾波器、光柵、鏡、及其它反射面、光纖、稜鏡、及其它元件。

於實施例中，一光源可包含雷射、或LED、或其它光源；及可包含一光纖載有來自此光源至另一位置的光，及/或導引光朝向一光學元件。光學系統的一項設計標準為來自該光源的光發散，或發散角；比較具有高發散的寬度D之一光束，具有低發散的寬度D之一光束在距該光源的一給定距離提供一小點。一般而言，以提供有低發散光的一光源650為佳。此等光學元件及組態可經設計因而提供實質上準直光，例如大半或全部光係沿朝向該樣本(例如朝向一分析區608)的實質上平行路徑導向。但於其中漫射光或散射光為佳之實施例中，可使用具有高發散的一光源650。

[0281]如圖8C所示，適用作為如此處揭示的裝置或系統部件之一光學系統的實施例可包括光學元件(例如光源650，例如圖8C顯示為環燈654，及物鏡670)、一光試管600、及一底座支架620經組配以盛裝及定位一用於成像的光試管。於如圖8C顯示之實施例中，一底座支架620可包括光學特性件802，經組配以折射(或繞射，或否則變更光路徑)來自光源650的光。如圖8C之示例說明，光學特性件802可包含一陣列之小透鏡。須瞭解光學特性件802可包含任何合宜光學特性件。於實施例中，光學特性件802可包含小透鏡、或繞射光柵、或費茲涅透鏡、或凸面鏡、或凹面鏡、或可折射、繞射、或以其它方式變更光的其它形狀及特性件、或其組合。於實施例中，此種光學特性件802可包含與底座支架620不同的材料，且可具有與底座支架620不同的折射率。舉例言之，受光學特性件802影像的光可直接地，或透

過適用於此處揭示的方法之反射(例如內部反射)間接地被導引朝向一分析區608，例如因而提供在一分析區608中一樣本的表面照明及穿透照明二者。如圖8C所示實施例示例說明，此等實施例也包括繞道光學特性件802的一光徑。比較要求穿過光學特性件802成像的光徑，此種光徑可能更適合在一分析區608內部成像一樣本。於實施例中，可同時提供兩型光徑(亦即繞道光學特性件802及穿過光學特性件802)，如此提供藉來自位在一光試管600的與一光源650同側上的一光源的表面照明及穿透照明二者所照明的一樣本供影像分析用的合宜光學元件。

[0282]光試管600包括特性件，其影響照明該光試管及該光試管內部樣本的光徑。此種穿透照明可愛在光試管600內部反射(例如藉內部反射)光的影響，包括或主要藉例如來自一表面612、一表面604、或其它表面或表面的組合之部分內反射(PIR)或全內反射(TIR)影響。進行TIR的光路徑之其它實施例例如係顯示於圖8A、8B、及8D。

[0283]如圖8D之示例說明，於實施例中，如此處揭示的且適用於此處揭示的方法之一裝置或系統的一光學系統之一光試管600可包括特性件，該特性件影響照明光試管600內部的光徑，諸如照明分析區608之光徑，及光試管600的分析區608內部之樣本。如圖8D所示，一層800可包括特性件，該特性件折射、繞射、或以其它方式影響或改變進入分析區608的光徑。此種光徑的變更可能影響且可能改良在分析區608內部之樣本的照明。於圖8D所示實施例中，光

從橫向進入層800；光徑被層800的形狀(及材料性質)改變，且如所期望被導向至分析區608內。舉例言之，一層800的外表面可為平坦(例如外表面674)或可為彎曲(例如外表面676)。舉例言之，一層800的一內表面可為平坦(未顯示於圖8D；但參考圖8A及8B的此等表面(雖然圖8A及8B的800並非光學透射性，但此等表面顯示為平坦))或可為彎曲(例如圖8D所示內表面678)。於實施例中，此種光徑的變更係有效提供於分析區608的樣本之表面照明及穿透照明二者。

[0284] 圖8A、8B、8C、及8D提供在一支持結構604之一蓋部612及/或表面618的TIR及PIR實施例。一樣本容器諸如光試管600可具有光可通過其中的一光透射表面；於實施例中，此種光透射表面許可光通過而不顯著失真或減弱光強度。一樣本容器諸如光試管600可由透光材料製成，有效地光可通過樣本容器內部。於實施例中，於該處一樣本容器係至少部分由透光材料製成，光可通過樣本容器之透光表面，及可在樣本容器內部行進。於實施例中，在樣本容器內部行進的光可於一或多個表面反射，及沿樣本容器內部的反射路徑行進。當來自設置於一樣本容器外部的一光源之光通過樣本容器之透光表面進入樣本容器，及此種光可在樣本容器內部遠離光源行進，及可在樣本容器表面反射，故於反射後，反射光可於朝向光源方向前進。此種反射可藉PIR或TIR。

[0285] 換言之，通過光試管600內部的光可反射離一表面(例如表面614或表面618)。此種內反射可有效地以間接光

照明一分析區608內部之一樣本；組合直接照明(於該處光撞擊一表面之前不被反射)，樣本可藉此方式接收表面照明(來自該光學檢測元件同側的照明)及穿透照明(來自該光學檢測元件對側的照明)。

[0286]須瞭解增強或提升PIR的光波長、材料、表面及組態可能不適合或無法有效增強或提升TIR。須瞭解增強或提升TIR的光波長、材料、表面及組態可能不適合或無法有效增強或提升PIR。如此有些設計及組構於該處PIR及TIR中之一者或另一者可在無另一者存在下被提升。於實施例中，有些設計及組構於該處PIR及TIR二者可被提升。於實施例中，有些設計及組構於該處PIR及TIR中之任一者皆不可被提升。

[0287]如圖8A之示例說明，支持結構604可具有矩形或方形截面。須瞭解支持結構604可具有方形或矩形以外的截面形狀；舉例言之，如圖8B所示，支持結構604可具有三角形截面形狀；其它截面形狀(例如圓形或半圓形，或鋸齒形，或不規則形)也適用於如此處揭示的系統及光試管。PIR及TIR為可調式特性件，該特性件可根據用於光試管600的材料、所施用的任何塗覆層、包覆層、或蓋層、及該光試管600的經控制厚度區613之幾何形狀及/或厚度而選用。於實施例中，以PIR為較佳，可選擇光、材料、及組態以提升PIR。

[0288]於實施例中，以TIR為較佳，可選擇來自光源650之光的波長以提升TIR。於實施例中，可選擇光試管600的

材料、厚度、表面組態、及其它特性件以提升TIR。舉例言之，經控制厚度區613之高度(從接觸層800的蓋部612底部量起)將影響到達分析區608的被TIR反射光的角度及強度。使得在光試管內部之光的TIR許可樣本的斜角照明(來自樣本上方的照明)之一光試管600組態為合乎所需，特別係用於暗野顯微術。於若干實施例中，期望最大化得自如上樣本上方的TIR。選擇性地，於若干實施例中，一光試管600可經組配以只從分析區608上方表面提供TIR。選擇性地，若干實施例可經組配以只從經控制厚度區613上方表面提供TIR(例如於圖8A及8B所示實施例中，大致上在分析區608上方)。選擇性地，於若干實施例中，一光試管600可經組配以來自光試管600中之其它表面的光提供TIR；舉例言之，可提供來自光試管600中之其它表面的光的TIR俾以斜角散射光，有效地該光被導向回分析區608。

[0289]用以組成一光試管600的設計及材料可經選擇與組配而提供光的TIR。舉例言之，於若干實施例中，提供TIR或提供增加的或提升的TIR量之組態包括但非僅限於：其中經控制厚度區613的尺寸係與TIR可相容或促進TIR的組態；其中表面614或表面618之夾角(例如相對於入射光)係與TIR可相容或促進TIR的組態；其中表面614或表面618之形狀、紋理、或塗覆層係與TIR可相容或促進TIR的組態；其中組成經控制厚度區613的材料之折射率與接觸形成經控制厚度區613邊界的一表面614的材料或空間的折射率間之差係與TIR可相容或促進TIR的組態；其中組成支持結構604

的材料之折射率與接觸形成支持結構604邊界的一表面618的材料或空間的折射率間之差係與TIR可相容或促進TIR的組態；及其它組態及設計。為了提供TIR，光將被(內部)反射的第一材料將具有比光若不被內反射則將通過其中的第二材料更高的折射率；由於第二材料通常為空氣，具有接近1的折射率，故通常不難確保此點。入射角須大於臨界角以提供TIR。舉例言之，參考圖8所示實施例，組成經控制厚度區613及支持結構604(例如表面614及618外部區域)的材料須具有大於空氣的折射率之折射率。其中期望一層800內部全內反射的實施例中，該層800的材料須具有比經控制厚度區613的材料更低的折射率以確保在該等壁面出現TIR，如圖8A、8B、及8D之示例說明。於替代實施例中，該層800的材料可具有折射率係高於經控制厚度區613的折射率，將在邊界(層800與經控制厚度區613間)形成TIR，有效地角度及材料可經調整因而最佳化導向至分析區608內一樣本的穿透照明光成分。

[0290]於實施例中，一表面614或618可經塗覆或經處理因而影響或減低表面的反射比(無論PIR或TIR)。於實施例中，一表面614或618可經塗覆或經處理因而減少洩漏出表面的光。舉例言之，即便於該處一表面614或618係與TIR可相容或提供TIR量，有些光也可透射出或折射出該表面614或618。光吸收塗覆物或材料可置於或施用於一表面614或618或其一部分或多部分，以減少從一光試管600洩漏出的雜散光量。此種吸光塗覆物例如可為染料、墨水、塗料、

表面處理、黑色帶或彩色帶、或其它塗覆物或表面處理。於實施例中，黑色或其它吸光固體材料可設置成背靠或相鄰一表面614或618以提供光學吸收表面。

[0291]選擇性地，於若干實施例中，一光試管600可經組配俾從該光試管的一部分或多部分不提供光的全內反射(或只提供無意義量的全內反射)，或俾不提供光的部分內反射(或只提供無意義量的部分內反射)。於若干實施例中，一光試管600可經組配俾從支持結構604不提供光的TIR或PIR(或只提供無意義量的TIR或PIR)。選擇性地，於若干實施例中，一光試管600可經組配俾從一表面618不提供光的TIR或PIR(或只提供無意義量的TIR或PIR)。不提供光的TIR或PIR，或只提供無意義量的TIR或PIR之組態包括但非僅限於：其中經控制厚度區613的維度係與TIR或PIR不可相容或不會提升TIR或PIR的組態；其中一表面614或一表面618的夾角(例如相對於入射光)係與TIR或PIR不可相容或不會提升TIR或PIR的組態；其中一表面614或一表面618的形狀、紋理、或塗覆層係與TIR或PIR不可相容或不會提升TIR或PIR的組態；其中組成經控制厚度區613的材料之折射率與接觸形成經控制厚度區613邊界的一表面614的材料或空間的折射率間之差係與TIR或PIR不可相容或不會提升TIR或PIR的組態；其中組成支持結構604的材料之折射率與接觸形成支持結構604邊界的一表面618的材料或空間的折射率間之差係與TIR或PIR不可相容或不會提升TIR或PIR的組態；及其它組態及設計。

[0292]選擇性地，於若干實施例中，反射材料可置放於或附接至一表面614及/或一表面618。此種反射材料例如可為金屬諸如銀、或金、或鋁；可為介電質諸如氟化鎂或氟化鈣、或其它鹽或金屬氧化物；或其它反射材料。典型地，此種反射塗覆層可為極薄(例如可為少於約0.1微米，或高達約100微米厚度)。選擇性地，反射材料(例如反射塗層)可只置放於或附接至表面614。選擇性地，反射材料可只置放於或附接至表面618。選擇性地，表面618可經處理為黑色俾成為光吸收性。於其它實施例中，表面614可經處理為黑色俾成為光吸收性。若干實施例可選擇經控制厚度區613之寬度比分析區608更寬。針對若干使用雷射照明之實施例，該層800可被移除或為光透射性，原因在於雷射照明被充分聚焦俾無需在分析區608間阻擋。

[0293]舉例言之但非限制性，PIR、TIR、或二者的使用許可來自相鄰區沿路徑820行進的光被導入分析區608內。如圖8A、8B、及8D所示，沿路徑820行進的光被反射朝向分析區608，及沿路徑825行進的光當在光試管600內部前進時進行多重反射及最終到達分析區608。如圖所示，於圖8B中沿路徑820行進的光當在光試管600內部前進時進行多重反射及最終到達分析區608。如圖8B之示例說明，此等反射可為PIR或可為TIR。遵照傳統術語，圖8A顯示的藉沿路徑820及825行進的光之照明，及圖8B顯示的藉沿路徑820行進的光之照明乃穿透照明。圖8A及8B顯示的藉沿路徑830行進的光之照明顯示光直接來自環燈，而非透過全內反

射而來：此乃表面照明。來自位在樣本下方(或只有樣本一側)的一光源之兩型光成分的組合，比較只提供其中一種光成分的光源，許可具有改良的效能。此點對暗野顯微術特別有用。

[0294] 圖 8A-8D 所示實施例的運用之一個非限制性實施例為暗野照明以量測樣本內細胞的散射性質。暗野顯微術乃已確立的主要用作為反差加強技術之方法。於暗野顯微術中，影像背景為全暗，原因在於只有藉該樣本散射光或反射光被成像。定量暗野顯微術未曾以與流式細胞術中使用傳統「側散射」參數可相媲美的方式而用以量測細胞的散射性質。

[0295] 從硬體觀點，用於暗野顯微術的照明期望為斜向，亦即並無來自光源發光的光線能夠進入物鏡而不會先接觸樣本。舉例言之但非限制性，發光的波長須為不會激發已經存在於樣本內的任何其它螢光基團。選擇性地，此種發光許可使用高數值孔徑(NA)透鏡來成像。舉例言之但非限制性，針對與光學顯微鏡相聯結的傳統透鏡大小，NA 可為至少約 0.3。選擇性地，NA 為至少 0.4。選擇性地，NA 為至少 0.5。選擇性地，有些實施例可利用油浸沒物鏡以獲得期望的 NA，特別當透鏡尺寸不限於低於某個程度時尤為如此。

[0296] 傳統暗野照明方法已經使用穿透照明，於該處樣本係在成像透鏡與暗野光源間。如此，於本傳統配置中，檢測組件及照明組件並非在該樣本的同側上。傳統表面照

明方法(於該處成像透鏡/物鏡與光源係在該樣本的同側上)要求使用特別製造的物鏡，及典型地不許可使用高NA物鏡，如此限制全系統的能力。

[0297]相反地，此處描述的暗野照明系統之至少若干實施例具有下列屬性。就硬體而言，圖8A-8D之實施例的方案為「表」，原因在於用於暗野照明的環燈係在該樣本之與該物鏡同側上。從系統觀點此點為合乎所需，但有光源在另一側上的替代實施例可單獨使用或組合此處描述的實施例使用。於一個非限制性實施例中，該環燈係設計成該光源654的LED及/或雷射全部皆在同平面且具有相同方向性(光源在相同水平面及導引光向上)。有些實施例可具有燈在該樣本平面，但以非平行方式導引光，諸如但非僅限於錐狀方式。有些實施例可具有燈在不同平面，但以相同方向性引光。有些實施例可具有燈在不同平面，但以非平行方式導引光，諸如但非僅限於錐狀方式。於若干實施例中，光係藉環面鏡652反射以達成樣本的斜向照明。

[0298]除了環燈及環面反射器的光學性質之外，圖8A-8D之實施例中顯示的光試管600的光學性質也顯著影像暗野照明。於本實施例中，細胞術光試管600係設計成來自環燈650的光直接地照射至樣本上；但除此之外，光也從該光試管的特定件「反射」至樣本上因而模擬「穿透」照明。此種反射可藉TIR及/或真反射。

[0299]注意任一種穿透照明方案許可量測來自一樣本的正向散射光，而表面-方案只許可量測來自一樣本的反向

散射光。正向散射光的強度通常比反向散射光大2次幕幅度。如此，穿透照明的使用許可使用遠更低的照明強度，及減少對樣本的有害副作用。

[0300]如於圖8A之實施例中可知，環燈650(或其它照明光源)及光試管600提供一系統，該系統可經調整使得穿透-及表面-照明強度經調整以獲得優於傳統表面照明的效能。同理，於圖8B實施例中，環燈650(或其它照明光源)及光試管600提供一系統，該系統可經調整使得穿透-及表面-照明強度經調整以獲得優於傳統表面照明的效能。藉所選用的材料(例如針對其光學性質)及光試管幾何形狀的設計以控制全內反射的角度及程度可達成此項調整。

[0301]如圖8C所示，特性件802可變更入射光路徑，及因而用以加強穿透照明及表面照明二者。如圖8D示，表面674、676、及678之形狀及組態可變更入射光路徑(例如橫向照明)，及因而用以提供或加強穿透照明、或表面照明、或二者。

[0302]圖8E提出一光試管600從一樣本準備位置轉送至接近一光學檢測器D的一樣本觀察位置之示意代表圖。如該圖指示，一樣本容器600可從一個位置移動至相鄰於或位在一檢測器D上的一位置。一檢測器D可包括一臺座係經組配以接納、保有、及定位一光試管600。樣本可透過進入埠口602(例如六個進入埠口602係顯示於圖8E所示實施例)添加至該樣本容器，及然後可在一分析區608內部的光學觀察及光學量測位置(圖中未顯示，原因在於在圖8E顯示的光試管

600表面內部(例如支持結構604內部))。保有於分析區608內部的樣本可經照明，且可藉一檢測器D檢測。於實施例中，一檢測器D可經組配以進行定性觀察或成像；於實施例中，一檢測器D可經組配以進行定量觀察或成像。

[0303]如圖8E顯示的一檢測器D可包含一細胞術單元或細胞術模組或為其中一部分。此種細胞術單元或細胞術模組可包含用於樣本分析的獨立單元或模組。於實施例中，其它分析能力及裝置可含括於一檢測器D內，或可連同一檢測器D一起罩住，或可經組配以連結一檢測器D使用。於實施例中，如此處揭示的用於樣本分析的系統可包含此種細胞術單元或細胞術模組，例如包含用以分析一光試管600內的一樣本之一檢測器D。於實施例中，如此處揭示的用於樣本分析的系統可包含此種細胞術單元或細胞術模組，及除了用以分析光試管600內的一樣本的一檢測器D之外，提供其它分析能力及裝置的其它單元或模組。於此等系統中，此等其它單元或模組可連同一檢測器D一起罩住，或可經組配以連結一檢測器D使用。此等其它分析能力及裝置可施加至一樣本；例如，此等分析能力及裝置可用以分析存在於一光試管600中的樣本或樣本部分。於實施例中，此等分析能力及裝置可用以分析存在於一光試管600中的不同樣本部分(例如一樣本可劃分成2或多個液分，於該處一個液分係置於一光試管600內接受細胞術分析，及一或多個其它液分係藉罩在、或接近、或結合一細胞術單元或細胞術模組操作的其它裝置分析)。如此，舉例言之，與藉

此細胞術模組執行的分析獨立無關，一樣本(或其部分)可於一化學分析單元、或於一核酸分析單元、或於一蛋白質分析單元(例如利用抗體或其它專一性結合分子以分析一樣本的一單元)、或其它此種單元或單元與能力的組合內進行量測及/或分析。此種分析可包括針對存在於一樣本的小分子及元素的分析(例如藉通用化學單元)；針對存在於一樣本的核酸分子的分析(例如藉核酸單元)；針對存在於一樣本的蛋白質及/或抗體反應性抗原的分析(例如藉酶聯結免疫吸附檢定分析(ELISA)單元)；或此等分析之組合。此外，如圖8E示例說明及如此處討論的系統可包括一控制器及控制與排程在該等單元或模組中之一或更多的操作。

[0304] 圖8F提供包括用以將一光試管從樣本準備位置轉運至接近光學檢測器D的樣本觀察位置之一轉運機制的系統之又一細節示意代表圖。系統諸如圖8F所示實施例之系統可包括多重樣本分析模組，其係可經組配以獨立地工作，或有些實施例中可經組配以一起工作。圖8F顯示的系統包括具有一檢測器D的單一細胞術單元707；於實施例中，在分析模組701、702、703、704、705、及706中之任一者或全部內分析的樣本(或其部分)可被轉運至細胞術單元707以供藉檢測器D觀察與量測。與藉細胞術單元707執行的分析獨立無關，一樣本(或其部分)可於一化學分析單元715中量測及/或分析。此種於化學分析單元715內的分析可包括針對存在於一樣本內的小分子及元素的分析(例如藉一般化學單元)；針對存在於一樣本內的核酸的分析(例如藉

核酸單元)；針對存在於一樣本內的蛋白質及/或抗體反應性抗原的分析(例如藉酶聯結免疫吸附檢定分析(ELISA)單元)；或此等分析之組合。

[0305]如圖8F示例說明之系統可包括一控制器以控制及排程於模組701-707中之一或更多的操作。樣本可載荷至樣本容器或其它元件以於系統內分析，如圖8E所示實施例示例說明。此等系統及系統模組包括例如樣本處置系統708；獲得、移動、及滴量樣本的滴量管，包括抽取型滴量管711及正位移滴量管712；離心機713；分光光度計714；化學分析單元715；光學倍增器管(PMT) 716；盛裝拋棄式補給品及工具的卡匣717，諸如滴量管尖頭及其它尖頭；及其它元件。模組及其它元件可藉一支架709或其它支持結構支撐。樣本、拋棄式用品、工具、及其它元件可於一模組內部轉運，及可於模組間(例如模組701-706及細胞術單元707間轉運)。

[0306]圖8E及8F顯示樣本容器諸如光試管600可從一個位置(諸如樣本準備位置)及然後轉運至另一位置(諸如至檢測器D，如圖8E及8F可知)。光試管600不會釋放流體至檢測器D內或上，反而係自容式單元將全部樣本保有於其中。可有一或多個、二或多個、或三或多個位置在檢測器D上或接近檢測器D，檢測器D上有透明表面，光試管600或其它樣本容器可接合其上以提供樣本信號檢測的透明界面。圖8F之元件及有關此等元件及其使用的進一步揭示可參考美國專利申請案第13/769,779號，該案全文皆係爰引於此並融

入本說明書之揭示。

### 暗野

[0307]此處至少若干實施例包括暗野照明源及光試管。光試管600的相關特徵係與光試管尺寸及光學材料及光試管的幾何形狀之設計有關。光試管透過反射(例如透過TIR、或PIR、或二者)提高暗野照明的程度。於一個實施例中，系統可同時利用一樣本的穿透暗野及表面暗野照明。

[0308]於此處揭示的若干實施例中，光試管600組合光源650許可以表面組態(亦即光源及物鏡在樣本的同側上)使用一物理系統執行穿透-及表面-照明。基本光試管係設計以含有生物樣本及呈現用於視覺化。於實施例中，蓋部612可具有特定設計。已知不同材料可具有不同折射率；具有期望折射率的材料可選用以製造一蓋部612、或一底座支架620、或光試管600的其它元件及組件及相聯結的元件及組件。舉例言之，於若干實施例中，一蓋部612或一底座支架620可由玻璃製成。舉例言之，於若干實施例中，一蓋部612或一底座支架620可由石英製成。舉例言之，於若干實施例中，一蓋部612或一底座支架620可由丙烯酸系、或澄清聚合物(例如環烯烴、聚碳酸酯、聚苯乙烯、聚乙烯、聚胺基甲酸酯、聚氯乙烯、或其它聚合物或共聚物)、或其它透明材料製成。

[0309]能夠設計頂蓋部612材料以協助照明及影像收集。於實施例中，為了照明一樣本，光源650可為環燈650(亦即可為圓形)，可具有光源654定位成分開的或連續的樣

式，及可使用曲面反射器652以導引光至該樣本。

[0310]於暗野顯微術中，樣本係藉斜射線照明。於暗野顯微術中，進入顯微鏡光學元件的光乃藉該樣本散射光，許可量測樣本中的細胞、粒子、及其它物體及結構的散射性質。若無細胞、粒子、結構或其它物體存在於該樣本，則暗野影像為黑。

[0311]於本非限制性實施例中，環燈650的反射器652及LED 654係設計來反射光，故極少光分量被導回該物鏡作為非專一性背景。該系統係設計成藉在光試管表面的TIR將光導回分析區608。從一表面反射無論藉TIR或其它反射而反射的光如此被導向照明於分析區608中的一樣本。於分析區608中的樣本中的細胞、粒子、及結構接收來自下方細胞之環燈的直接光(亦即透過表面照明)。此外，如此處揭示，來自頂面之光(反射)也被導向分析區608(亦即透過穿透照明)。

[0312]如此，根據如此處揭示的系統及方法，環燈650在相同位置，來自單一環燈光源的光可從二方向被導引而照明分析區608(表面照明及穿透照明二者)。於實施例中，此項照明皆為斜向照明。藉光試管的設計及用於光試管的材料可控制兩個光成分之相對強度。

[0313]此暗野照明係與習知暗野不同。舉例言之，於此處揭示的實施例中，暗野照明係由在光試管表面藉TIR反射光提供。舉非限制性實施例，於實施例中，如此處揭示的系統可使用在蓋部612某些表面的背側上的一反射層以反

射全部光。舉非限制性實施例，於實施例中，如此處揭示的系統可使用在光試管600某些表面的背側上的一反射層以反射全部光。若干實施例可使用全反射或選擇性地反射背景。

[0314]舉例言之，於實施例中，期望以斜角導引光，該光維持照明暗野。於若干實施例中，光源654可以一角度導引光，如此可無需或可不使用反射器652。反射器652可改良光源654的製造性，原因在於全部光皆係在同平面，係導向於同方向。選擇性地，彎角光源654也可用以置換或組合反射器。

[0315]須瞭解即便一照明的穿透照明成分之光強度可比相對應的表面照明成分弱10倍，從該樣本中的細胞或其它物體因穿透照明所致的散射光強度可更強200倍。換言之，當來自表面照明量的散射與來自等量穿透照明的散射作比較時，因穿透照明所致的散射光強度可比藉該樣本中的細胞或其它物體之表面照明的散射光更強200倍。如跌，小量穿透照明能顯著加強來自細胞的散射光。

[0316]只有表面照明時，藉物鏡收集的光只有從一樣本的反射光。但繞射為散射中的一實質成分，使用穿透照明提供某個量的繞射(例如藉樣本之繞射光)。但收集自表面照明的光不包括藉樣本的繞射光(並無光在繞射之後朝向光源反射回)。如此，當使用穿透-及表面-照明時，對於由物鏡所收集的光有反射、折射及繞射成分。傳統方法使用全穿透暗野照明，由於光學組件係位在樣本的兩側上，故組

配上耗用顯著大量空間。相反地，如此處揭示的系統及方法運用組配單獨用於表面照明的光學元件，提供表面-照明及穿透-照明二者。此處揭示的實施例可獲得表面照明組態之節省空間，同時提供表面-照明及穿透-照明二者效果。

[0317]將樣本容器及光源設計在一起，許可表面照明組態增加樣本的穿透照明量，及更明確言之，可提供一致穿透照明。若干實施例可使用鏡像表面。若干實施例使用TIR，可經調整以產生期望的穿透照明，包括一致地且呈斜角至分析區608用於該樣本之暗野照明的穿透照明。一光試管600可經組配以運用反射，例如使用TIR、或PIR、或二者，只從呈表面照明組態的一光源提供分析區608的穿透照明。於一個非限制性實施例中，較厚的蓋部612許可進行TIR(或PIR、或二者)反射返回分析區608。此外，此處揭示的系統及方法不僅提供光，該光因TIR(或PIR、或二者)之故而返回分析區608，也提供一致地返回分析區608的光。圖8A、8B、及8D之實施例具有於某些角度的某些表面，具有某些黑表面，及某些反射表面，使得光一致地返回分析區608，有效地提供樣本於一分析區608的一致穿透照明。選擇性地，可在頂部放置一全反射面(諸如但非僅限於一平坦蓋部612，如圖7A及7B所示，及選擇性地在圖8A、8B、及8C的區613頂部擇定區上方)。相反地，在傳統硬體內部行進的光可進行若干反射，含可能可進行TIR(或PIR、或二者)，但該光可能不會返回區608。

[0318]舉非限制性實施例，此處揭示的實施例利用以成

像為基礎的平台，替代使用高度複雜高成本系統，例如可具有16個雷射光源，本實施例選用一種更整合式檢測系統以許可成像與辨識一樣本中之細胞及型別的差異。

[0319]於一個非限制性實施例中，全部此等不同型別資訊的組合為有用及有效地達成期望的分析目標。如此可包括定量度量及/或鏈接至定量度量的定性度量，或鏈接至定量度量的影像。此處揭示的方法及系統提供不同的螢光通道，於該處各個通道具有一或多個靶定的特定分子標記(亦即定量資訊)。此處揭示的方法及系統可包括且可用於顯微術，此處揭示的實施例提供觀察與度量在細胞內部形成染色(例如是否在胞質，是否集中在表面，在細胞核或它處)的背景，其可鏈接所產生的影像及/或定性資訊至所產生的定量資訊。藉此方式，若定量度量觸發警報或符合提供需要進一步分析的臨界值，則產生定量結果的原先影像之鏈接係可用於進一步分析。此處實施例可查詢在一分析區608內部的一樣本中之細胞產生染色的背景影像及資訊。此等影像及資訊許可決定該染色是否係在細胞內，例如在胞質，在細胞核，在細胞膜，或其它胞器或細胞位置。

[0320]於此處揭示的方法及系統之若干實施例中，可觀察與量測細胞的定量散射性質、細胞形狀、及/或細胞大小的組合，及用以辨識及/或特徵化一樣本。於此處揭示的方法及系統之若干實施例中，可仕部在同一個裝置同時觀察與量測一樣本或其部分的物理性質、光學性質、及生物/生化性質。全部此等量測及觀察可組合於可規劃處理器或其

它處理系統以連結各型資訊而達成檢定分析之目標(例如達成檢定分析之臨床目標)。

[0321]雖然傳統裝置可能適合一種或其它種觀察或度量，但不適合來自單一光源的表面照明及穿透照明；此等不同類別資訊間也無鏈結。舉例言之，於此處揭示的若干實施例中，於該處可取回產生定量度量的影像資訊，該等系統及方法可用於組織形態學度量。選擇性地，該系統可應用於子宮頸抹片檢查，較為類似傳統細胞術。可擴延至使用傳統顯微術的任何檢查。用於尿液，至少部分本發明之實施例可觀察與分析晶體而非僅細胞。可觀察得自尿樣的無機鹽及化學物質晶體，在線圖的一部分產生某些定量讀數。此外，可觀察與分析存在於血中的細胞及粒子，包括分析不同型別及族群的血球，諸如但非僅限於圖1A可見資料的不同區域被圈起。某些資料區域的影像資訊可被取得用於進一步分析潛在細胞影像，產生的測量值以線圖或圖表作圖。

[0322]此處若干實施例組合成像特徵與病理特徵。例如，組織的準備可出現在經組配以含括此處揭示的光學元件之裝置或系統內部(一系統可為或例如可包括組配以進行一樣本的光學及其它分析的一模組或多模組)，及此等準備的材料可於本平台成像。然後影像或分析可送至伺服器以進行影像分析，做診斷，或進行數位病理分析有效地輔助或使得病理師分析一樣本。

[0323]如此處揭示的方法、系統、及裝置之實施例包括

例如圖8C及8D示例說明的系統及裝置，提供寬廣範圍的細胞術能力可一起應用於分析一樣本。此等細胞術能力包括細胞術成像，諸如典型地限於顯微術；此等生物樣本的顯微術成像及影像分析係由如此處揭示的裝置、系統及方法提供。此外，如此處揭示的系統及裝置係經組配以提供生物樣本的光譜光度計量分析。此等影像分析包括暗野、亮野、及其它影像分析。揭示施加來自單一光源的表面照明及穿透照明二者的新穎改良方法，該方法許可血樣之更敏感更準確的成像及分析。結合此處揭示的方法，可獲得有關RBC、WBC及其亞類的分開度量。如此處揭示的影像分析及光譜光度計量分析可用以識別及定量WBC的不同族群，用於血樣的決定特徵及許多臨床病況的診斷上係有用的。如此處揭示的裝置及系統可用以提供臨床報告，該報告係包括一般化學分析資訊、以核酸為主的分析資訊、以抗體(或蛋白質或外顯子)為主的分析資訊、分光光度分析資訊及此外，提供被分析的細胞及樣本之影像。能夠產生此等資訊及提供此等報告，包括影像以及其他臨床資訊相信可提供新穎而出人意表的能力及結果。

[0324]此外，此項資訊及此等報告可在短時間內產生(例如少於1小時，或少於50分鐘，或少於40分鐘，或少於30分鐘，或其它短時間)。此外，此項資訊及此等報告可從小樣本例如小量血液或尿液樣本產生。此種小樣本的大小不大於約500微升，或小於約250微升，或小於約150微升，或小於約100微升，或小於約75微升，或小於約50微升，或

小於約40微升，或小於約20微升，或小於約10微升，或其它小體積。於樣本為血樣之實施例中，此種小樣本可採集自手指穿刺。典型地，只有小量血係採集自手指穿刺(例如血液量可為約250微升或以下，或約200微升或以下，或約150微升或以下，或約100微升或以下，或約50微升或以下，或約25微升或以下，或其它小量)。

[0325]包括如此處揭示的細胞術資訊及影像(包括影像、散射作圖、及其它光學及成像資訊)、及也包括一般化學分析資訊、以核酸為主的分析資訊、以抗體(或蛋白質或外顯子)為主的分析資訊、及分光光度分析資訊的臨床報告相信可提供寬廣且臨床上豐富的資訊而用在許多臨床病況的診斷及特徵決定上及提供優於技藝界的優點係有用的。此等報告可在服務點(或照護點)位置快速地準備，且可快速地通訊(例如藉無線、陸上通訊線、光纖、或其它通訊鏈路電子式通訊)至病理師或其它臨床專家以便分析及解譯。然後，此種專家分析及解譯快速地通訊回送(例如藉無線、陸上通訊線、光纖、或其它通訊鏈路電子式通訊)至個體臨床照護者、或回送至服務點(或照護點)位置、或二者以獲得快速回授。若有所需，此種快速回授許可在服務點或照護點位置，根據可獲得的、可分析的或二者樣本，藉由提供資訊及分析而即時治療或避免不必要的治療。此種迅速分析、報告、及回授提供優於曠日費時的方法之優勢，及藉由許可即時治療及藉由避免不必要的治療，可提供更有效的、更有效率的、及成本更低的臨床服務及治療。藉此處

揭示的裝置、系統及方法可免除此等更為耗時的方法包括但非僅限於：個體須從住家旅行至遠端檢驗室或診所及遠離受託照護該個體的臨床醫師所造成的延遲及不便；一樣本從採集地點送至分析地點的轉運造成的延遲及可更樣本降解；傳送此等分析結果給病理師或其它專家所致的延遲；傳送一專家意見給該個體的臨床醫師所致的延遲；在傳送一專家意見給臨床醫師後，傳輸該個體的臨床診斷及治療的延遲。此等延遲、不便、及可能的樣本降解可藉使用此處揭示的方法、系統、及裝置而予減少或消除。

[0326]如圖6A、6B、7、8A、8B、8C、及8D及其它圖式且如此處揭示示例說明系統及裝置之實施例提供精簡式的細胞術能力，包含精簡格式用於一或多個其它樣本分析能力。申請人於此處揭示包括如此處揭示的新穎細胞術能力於裝置及系統連同其它樣本分析能力的新穎裝置及系統。申請人於此處揭示提供如此處揭示的新穎細胞術能力的裝置及系統，結合藉一般化學單元做樣本分析的裝置及系統；結合藉核酸分析單元做樣本分析的裝置及系統；結合運用抗體檢定分析(例如ELISA)單元做樣本分析的裝置及系統；及其組合。如此，如此處揭示的樣本處理裝置可經組配以在一樣本上執行複數個檢定分析。此種樣本可為小型樣本。

[0327]於實施例中，全部樣本檢定分析動作或步驟係針對單一樣本進行。於實施例中，全部樣本檢定分析動作或步驟係藉單一裝置或系統執行且可在單一裝置的機殼內部

執行。此等系統及裝置包括細胞術，特別為在單一單元內提供影像分析以及光譜光度分析或其它光學分析的細胞術相信為新穎且出人意表。提供系統及裝置包括細胞術，特別為在單一單元內提供影像分析以及光譜光度分析或其它光學分析的細胞術相信可提供先前於技藝界所無法達成的優點。

[0328]如圖6A、6B、7、8A、8B、8C、及8D及其它圖式且如此處揭示示例說明系統及裝置之實施例提供可攜式的細胞術能力，於該處此等裝置及系統可罩在夠小而容易運送的包圍體內。舉例言之，此等裝置及系統可方便運送至照護位置點(例如醫師診療室、診所、醫院、臨床檢驗室、或其它地點)。舉例言之，此等裝置及系統可方便運送供服務位置點使用(除了前文討論的照護位置點之外，例如藥局、超級市場、或其它零售位置或服務位置)。服務位置點可包括例如個體可接收服務(例如測試、監視、治療、診斷、指導、採樣、ID認證、醫事服務、非醫事服務等)的任一個位置所在。服務位置點包括但非僅限於個體的居家、個體的事業、健康照護提供者(例如醫生)的所在、醫院、急診室、手術室、診所、健康照護提供者的辦公室、檢驗室、零售商[例如藥局(例如零售藥局、診所藥局、醫院藥局)、藥妝店、超級市場、雜貨店等]、交通運輸工具(例如汽車、船舶、卡車、公共汽車、飛機、摩托車、救護車、行動單元、救火車/消防車、緊急服務車輛、執法車輛、警車、或組配以將一個體從一點轉運至另一點的其它交通工具等)、旅行醫

護單元、行動單元、學校、日托中心、保全篩檢位置、戰爭位置、健康協助生活住宅、政府辦公室、辦公大樓、帳篷、體液樣本取得位置(例如捐血中心)、個體可能期望接近的位置入口位置或附近位置、個體可能期望接近的裝置位置或附近位置(若個體想接近電腦則為電腦所在)、樣本處理裝置接受樣本的位置、或本文它處描述的任何其它服務點。

### 深奧細胞術及專用細胞術標記

[0329]多種傳統進階或深奧細胞術檢定分析要求傳統系統量測細胞上的大量標記；典型地，此等標記係同時量測。該領域的一般辦法繫於高能儀器，含例如6個或以上雷射及18根不同PMT管以同時量測全部此等標記。但於許多臨床設備中，無需同時量測多重標記。例如，於許多臨床要求中，針對一個標記有多少細胞為陽性，或針對二或更多個標記或數個標記的其它此種組合有多少細胞為陽性。此處若干實施例提出染色方案之多重組合，於該處例如可有一組10個標記，於該處可組合成3-4或5-6個標記一組其中可組合成即便兩個標記為同色，本系統之若干實施例可將影像及資訊去卷積以決定哪個信號係來自哪個標記。如此許可本系統之若干實施例就光源數目、用於樣本分析的槽道數目、及其它簡化及效率而言減低硬體需求。如此，使用多個標記的子集，或以預定配對以非同時方式使用或量測標記用在深奧細胞術為有用。舉例言之，有些標記可視為「閘控」標記；及有些標記係首先量測，及若此種初步量測結果為陰性(例如該等標記為不存在或只以低量存在

於樣本)，則無需使用其它後續標記進行量測。於實施例中，此等非同時方法及系統可減少分析所需樣本體積，及可減少分析所需標記量(例如若後續追蹤標記典型地只用在少數被分析樣本分量)。

[0330]須瞭解運用樣本諸如血樣或尿樣的細胞術分析成像，許可獲得實際細胞數目，及因而也比不含此等測量值的傳統細胞術方法更準確。樣本的成像含樣本中之細胞(及粒子或結構)的成像實際上比其它方法諸如傳統流式細胞術更準確。舉例言之，傳統流式細胞術閘控不允許實際計數。流式細胞術中的閘控為主觀的，因而會因系統而異。此外，傳統流式細胞術未能提供樣本中之細胞影像。

[0331]此處若干實施例也閘控，但該閘控係根據各項因素以演算法為基礎而非限於病人健康。分類手段係根據病人族群作訓練，知曉其是否健康或生病。此處若干實施例可標記一病人為異常及標記病人用於綜覽。自行學習式閘控可根據有關病人健康狀況所傳遞的資訊是否需要不同閘控。如此，此處揭示的若干實施例針對樣本的閘控係以演算法完成，可能地使用可規劃處理器，及根據病人健康而改變閘控。

[0332]於成像方法及系統之實施例中，可能期望最小化所需硬體量及複雜度，若屬可能，期望重複使用部分或全部樣本以減少需要的樣本量。如此，從一樣本影像中擷取資訊的能力愈高，則從一樣本及當可能時從較小量樣本獲得資訊的最大化愈佳。如此，從最少數圖像可獲得以區別

不同細胞類型的資訊愈多，則愈能夠減少需要的樣本量。

[0333]選擇性地，於一個非限制性實施例中，用在顯微術鏡臺的光試管可組配如下(參考圖7、8A、及8B所示實施例及元件)。一中間槽道層包含薄塑膠膜800芯層，具有感壓黏著劑(ps<sub>a</sub>)在兩面上。一面黏著至窗層606及另一面黏著至模塑頂層蓋部612。芯層為黑色的擠塑膜，主要原因在於防止光散射及不同液體槽道間的光學串擾等光學理由。芯膜的厚度較佳沿其長度及寬度為一致，例如可從黑聚對苯二甲酸伸乙酯(PET)或黑HDPE(聚乙烯)擠塑膜製成。兩面上的感壓黏著劑(ps<sub>a</sub>)亞層較佳地係儘可能地薄以保有總液體槽道(例如分析區608)的緊密一致的尺寸，但又較佳地夠厚以提供環繞該液體槽道的良好流體密封。於實施例中，對此種樣本容器為有用的ps<sub>a</sub>黏著劑本質上為丙烯酸系，對低表面能塑膠具有高黏著強度。在中層上的液體槽道、埠口及其它排齊特性件可利用雷射切削法或模切法製作。

[0334]本實施例也顯示磁性元件諸如但非僅限於磁性定標器或圓錠，或可被磁鐵吸住的金屬定標器或圓錠可摻混入光試管內。舉例言之，此等磁性元件可含括於或可包含樣本容器或光試管的模塑頂層。磁性元件可用以簡化用來轉運光試管的硬體。例如，處置系統可接合光試管中的磁性特性件以轉運光試管，而無需額外樣本處置裝置。

[0335]雖然已經參照某些特定實施例描述及示例說明本發明，但熟諳技藝人士將瞭解可不背離本發明之精髓及範圍做出程序及方案的各項調整適應、改變、修正、取代、

刪除、或添加。舉例言之，不同材料可用以產生光試管內的不同反射表面或沿光學系統中之一光徑的其它表面。選擇性地，該反射表面係經選擇使得反射只有漫射。選擇性地，該反射表面係經選擇使得反射只有鏡射。有些實施例可使用如Coumans, F. A. W., van der Pol, E., & Terstappen, L. W. M. M. (2012)，藉雙微透鏡陣列於表面螢光顯微鏡的平坦頂部照明方案，細胞計量術，81A:324-331. doi: 10.1002/cyto.a.22029陳述的平坦頂部照明方案，該文件完整地爰引於此並融入本說明書之揭示用於全部目的。

[0336]此外，濃度、含量、及其它數值資料可於此處以範圍格式呈現。須瞭解此種範圍格式係只為了方便簡約而使用，且應彈性解譯為不僅含括明確地引用為該範圍的極限之數值，同時也含括涵蓋在該範圍內的全部個別數值或小範圍，彷彿個別數值或小範圍係明確地引述般。例如，約1奈米至約200奈米之大小範圍須解譯為不僅包括明確地引用的約1奈米至約200奈米之極限，同時也包括個別大小諸如2奈米、3奈米、4奈米、及小範圍諸如10奈米至50奈米、20奈米至100奈米、及其它範圍。

[0337]此處討論的或引述的公開文獻係只因其揭示日期係在本案申請日之前。此處內容絕非解譯為承認本發明的日期先於先前金明之此等公開文獻。又復，此處提出的公開日期可能與實際公開日期有別需要作個別確認。此處所述全部公開文獻皆係爰引於此並融入本說明書之揭示，及描述關聯此等公開文獻引述的結構及/或方法。下列申請

案也係爰引於此並融入本說明書之揭示用於全部目的：美國專利案第7,888,125號；美國專利案第8,007,999號；美國專利案第8,088,593號；美國專利案第8,088,593號；美國專利案第8,380,541號；美國專利公告案第US20120309636號；PCT申請案第PCT/US2012/057155號；PCT申請案第PCT/US2011/53188號；PCT申請案第PCT/US11/53189號；美國專利申請案第13/769,779號；美國專利申請案13/244,946；美國專利申請案13/244,947；美國專利申請案13/244,949；美國專利申請案13/244,950；美國專利申請案13/244,951；美國專利申請案13/244,952；美國專利申請案13/244,953；美國專利申請案13/244,954；美國專利申請案13/244,956；美國專利申請案13/769,798；美國專利申請案13/769,818；美國專利申請案13/769,820；美國專利申請案61/766,113；美國專利申請案61/673,245；美國專利申請案61/786,351；美國專利申請案61/697,797；美國專利申請案61/766,076；及美國專利申請案61/733,886，該等專利案及專利申請案之揭示文全文皆係爰引於此並融入本說明書之揭示用於全部目的。

[0338]本專利文件含有受著作權保護之材料。當本專利出現在美國專利商標局的專利檔案或記錄時，著作權擁有者(本案申請人)並不反對任何人複製專利文件或專利揭示文，若不然則保有全部著作權。適用如下註釋：著作權2012-2013席拉諾公司(Theranos, Inc.)。

[0339]雖然前文為本發明之於較佳實施例的完整描

述，但可能使用各個替代、修改及相當物。因此本發明之範圍不應參照前文詳細說明部分決定，反而取而代之，應參照隨附之申請專利範圍各項連同其相當物的完整範圍決定。任何特定件無論是否為較佳皆可組合任何其它特定件無論是否為較佳。除非功能手段用語限制係使用「用之手段」一詞明確地引述於一給定的申請專利範圍各項，否則隨附之申請專利範圍各項不應解譯為包括此種限制。須瞭解如此處詳細說明部分及後文申請專利範圍各項全文中使用，除非內文另行明白指示否則「一」及「該」的意義包括複數形。又，須瞭解如此處詳細說明部分及後文申請專利範圍各項全文中使用，除非內文另行明白指示否則「於」的意義包括「於其內」及「於其上」。最後，須瞭解如此處詳細說明部分及後文申請專利範圍各項全文中使用，除非內文另行明白指示否則「及」及「或」的意義包括連詞及轉折連詞且可互換使用。如此，於使用「及」或「或」等詞的上下文中，除非內文另行明確指示否則此等連詞的使用並不排除「及/或」的意義。

## 【符號說明】

7...箭頭	612...蓋部
600...光試管、樣本容器	613...經控制厚度區
602...開口	614...上表面
604、610...結構	618...表面
606...支持結構、基底部	620...底座支架
608...分析區	621-626...箭頭

621...距離	707...細胞術單元
622、623...高度	708...樣本處置系統
624...厚度	709...支架
625、626...寬度	710...可規劃處理器
650、654、660...照明源、光學部、 環燈	711...抽取型滴量管 712...正位移滴量管
652...環面反射器	713...離心機
670...物鏡	714...分光光度計
674、676...外表面	715...化學分析單元
678...內表面	716...光學倍增器管(PMT)
680、682、684...激光源	717...卡匣
690...雙色元件	800...光透射層
692...濾波輪	802...光學特性件
694...孔隙	820、825、830...路徑
696...額外透鏡	D...寬度、光學檢測器
698...富利葉透鏡	PIR...部分內反射
700...檢測器	TIR...全內反射
701-706...分析模組	x,y,z...座標軸

201831881

201831881

## 發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※ I P C 分類：

### 【發明名稱】(中文/英文)

影像分析及生物樣本之量測

IMAGE ANALYSIS AND MEASUREMENT OF BIOLOGICAL SAMPLES

### 【中文】

提供用於影像分析或生物樣本之量測的方法、裝置、系統、及設備。

### 【英文】

Methods, devices, systems, and apparatuses are provided for the image analysis of measurement of biological samples.

【代表圖】

【本案指定代表圖】：第（ 6A ）圖。

【本代表圖之符號簡單說明】：

7...箭頭	650...環燈
600...光試管	660...照明源
602...開口	670...物鏡
604、610...元件、結構	x,y,z...座標軸
620...底座支架	

【本案若有化學式時，請揭示最能顯示發明特徵的化學式】：

## 申請專利範圍

1. 一種用於分析一樣本之系統，該系統係包含：

一樣本容器，其包含一樣本腔室經組配以盛裝該樣本，該樣本容器之至少一部分包含一光透射材料，該光透射材料包含一光透射表面及一反射表面；及

一照明源，其係經組配以提供光，該光係照明及通過該光透射表面；

其中該樣本容器係經組配以有效地讓來自該照明源的該光同時地提供表面照明及穿透照明二者給該樣本容器內之一樣本，於該處表面照明係包含光從該照明源行進至該樣本而不會在該樣本容器的該光透射材料之一表面反射，及於該處穿透照明係包含光於該光透射材料內部行進，其在該光透射材料之至少一個表面之至少一個反射後行進至該樣本。

2. 如請求項1之系統，其中該樣本容器係包含一光試管，其係具有一長條槽道經組配以盛裝一樣本。
3. 如請求項1或2之系統，其中該樣本容器係包含一或多個光非透射表面。
4. 如請求項1或2之系統，其中該穿透照明至少部分係由在一表面之全內反射的光所提供之。
5. 如請求項2之系統，其中該穿透照明至少部分係由在該光試管內之全內反射的光所提供之。
6. 如請求項1之系統，其中該樣本容器係包含二或多個樣

本腔室用以盛裝樣本。

7. 如請求項2之系統，其中該光試管係具有一矩形的水平截面形狀。
8. 如請求項2之系統，其中該光試管係具有一圓形的水平截面形狀。
9. 如請求項2之系統，其中該光試管係具有一鋸齒形的垂直截面形狀。
10. 如請求項2之系統，其中該光試管係具有一梯級形(step-shaped)的垂直截面形狀。
11. 如請求項1之系統，其中該樣本容器係相對於該照明源可移動至複數個位置，其中該樣本容器之該光透射表面係可藉在每一該等位置之該照明源照明。
12. 如請求項1之系統，其中該照明源係包含一環燈。
13. 如請求項12之系統，其中該環燈係選自一基於發光二極體(LED)的環燈及一基於雷射的環燈。
14. 如請求項1之系統，其係進一步包含一支持結構，其包含一光透射表面成形以接合該樣本容器的一光透射表面。
15. 如請求項1之系統，其係進一步包含一壓縮裝置經組配以保持該樣本容器於一期望位置以藉該照明源照明。
16. 如請求項1之系統，其係進一步包含一檢測器經組配以成像該樣本容器內之一槽道的至少一部分。
17. 如請求項16之系統，其中該樣本容器係包含一長條槽道經組配以含有該樣本的至少一部分，及其中該檢測器係

經組配以成像該樣本容器內之一整個長條槽道。

18. 如請求項16之系統，其中該樣本容器係經組配以在成像期間以一靜態、非流動方式保有該樣本。
19. 如請求項16之系統，其中於成像期間，該樣本容器係經組配以一靜態、非流動方式保有該樣本之一部分及以一流動方式保有另一部分。
20. 如請求項16之系統，其中該照明源相對於該樣本容器係為可移動。
21. 如前述請求項中之任一項之系統，其中於成像期間，該樣本容器係經組配以一流動方式保有該樣本。
22. 如請求項16之系統，其中該樣本容器係進一步包含完全侷限在該樣本容器內的一流體回路，及其中該樣本係位在該流體回路內，有效地讓該樣本維持與該檢測器分開。
23. 如請求項22之系統，其中該樣本容器相對於該檢測器係為可移動。
24. 如請求項22之系統，其中該檢測器相對於該樣本容器係為可移動。
25. 如請求項1之系統，其中該樣本容器及該照明源係包含一光學分析單元的至少一部分，該系統係進一步包含經組配以在該樣本上執行臨床分析的一臨床分析單元。
26. 如請求項25之系統，其中該系統係經組配以提供一液分的單一樣本給各個該光學分析單元及該臨床分析單元，有效地讓該臨床分析單元及該光學分析單元可同時

在一樣本的部分上執行光學分析及臨床分析。

27. 如請求項25之系統，其中該臨床分析係選自一般化學分析、核酸分析、及酶聯結(enzyme-linked)結合分析。
28. 如請求項25之系統，其係包含複數個臨床分析單元，其中該等複數個臨床分析單元中之各個臨床分析單元係經組配以提供選自於一般化學分析、核酸分析、及酶聯結結合分析中之一臨床分析。

















9/22

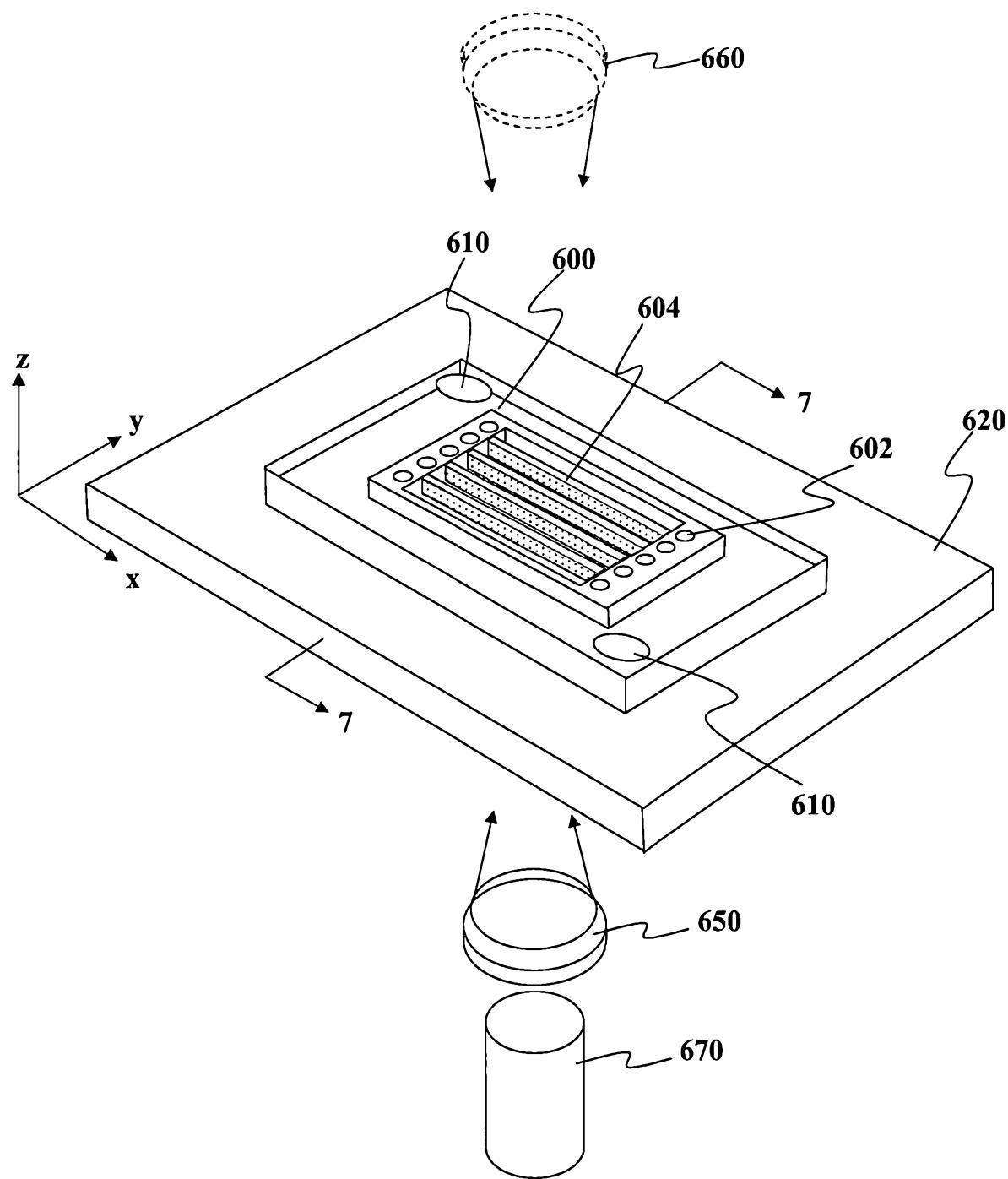


圖 6A

10/22

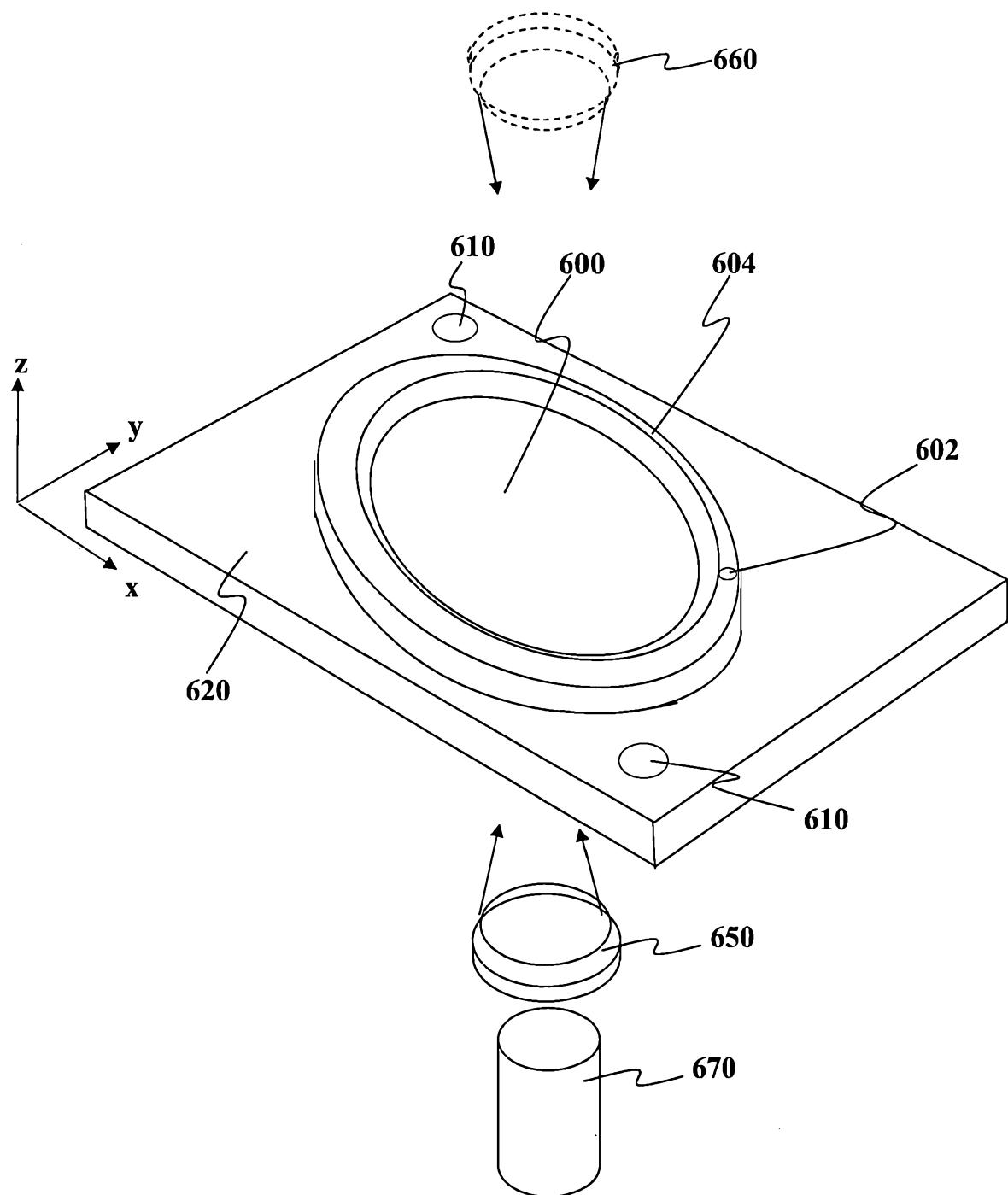


圖 6B

11/22

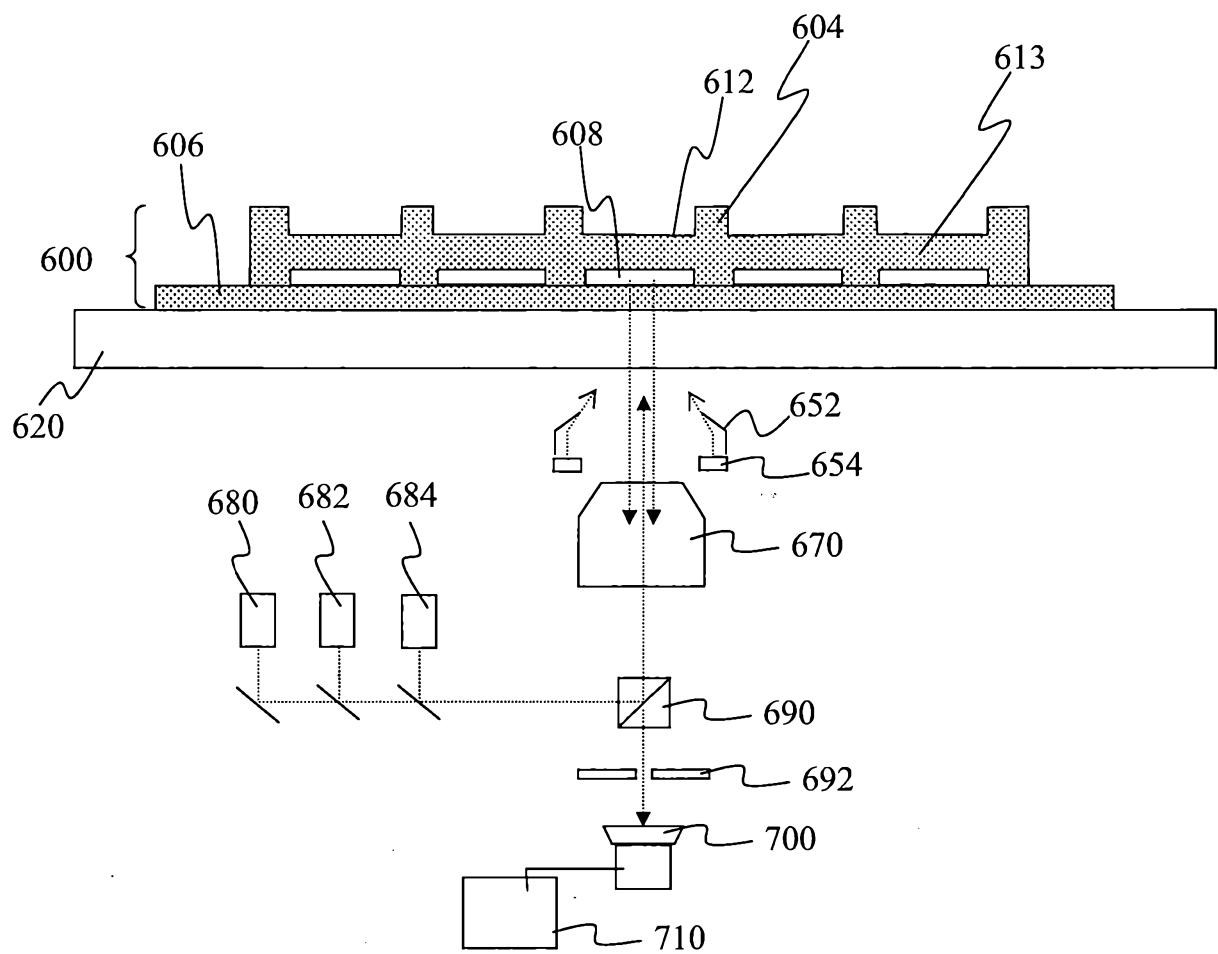


圖 7A

12/22

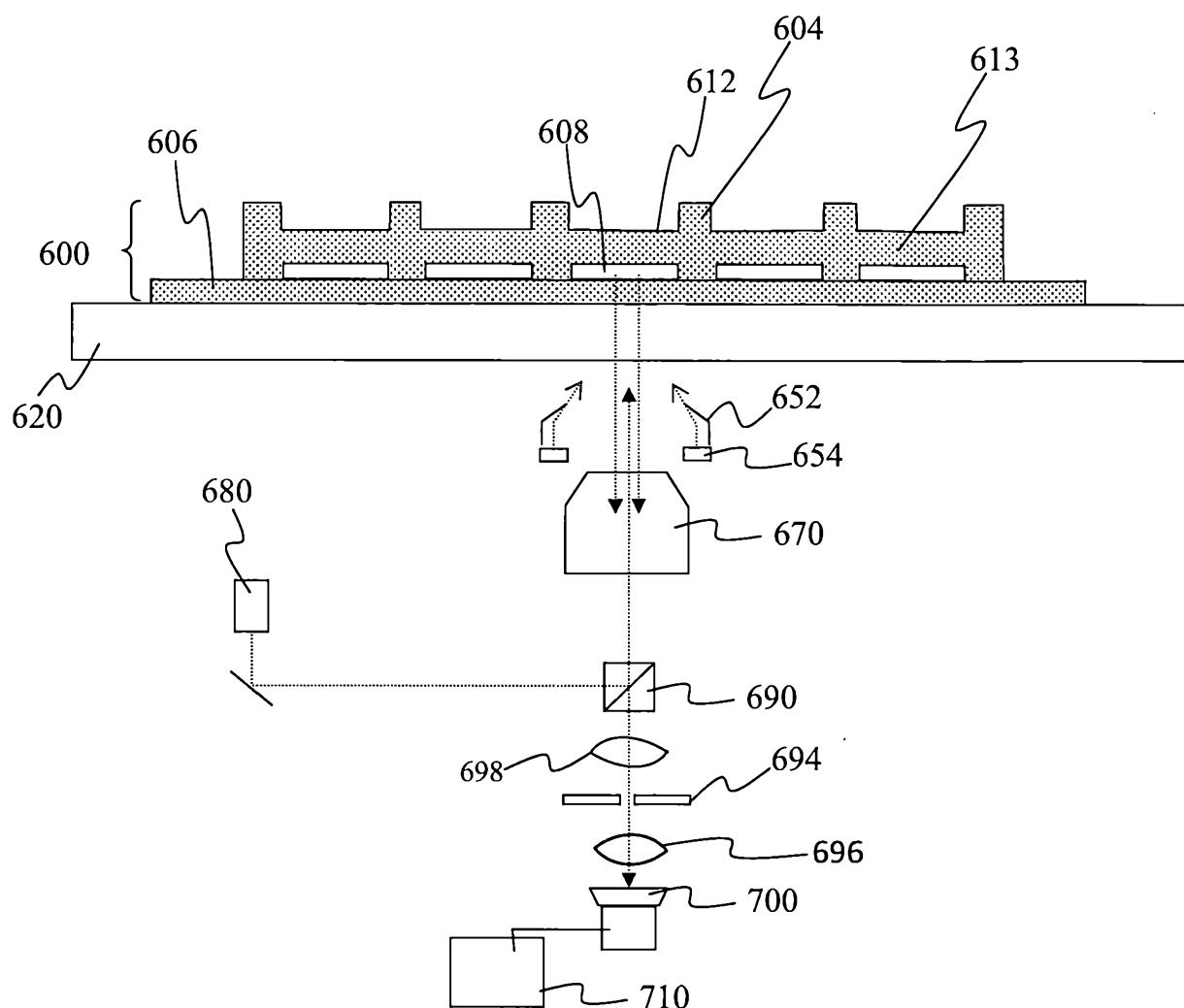


圖 7B





15/22

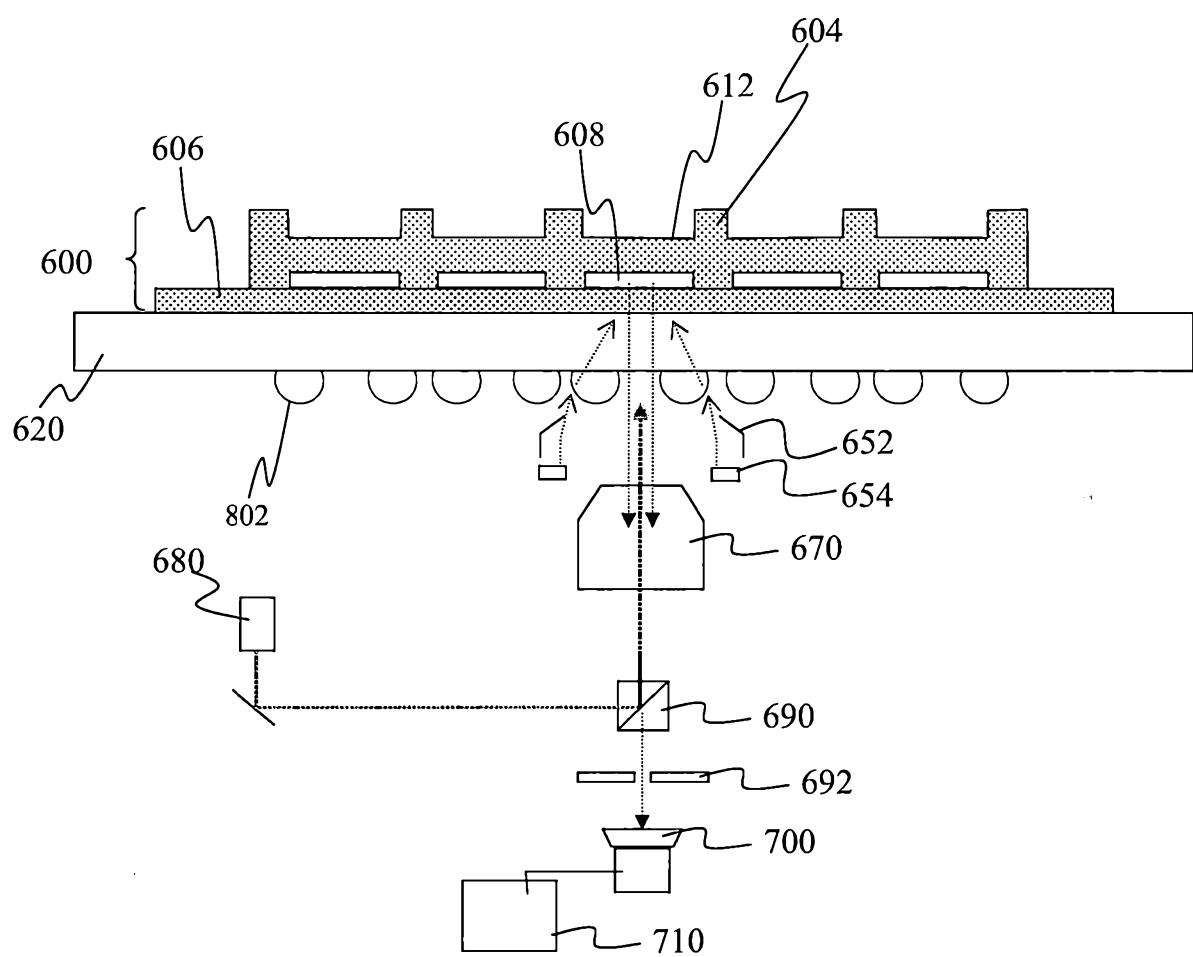


圖 8C





18/22

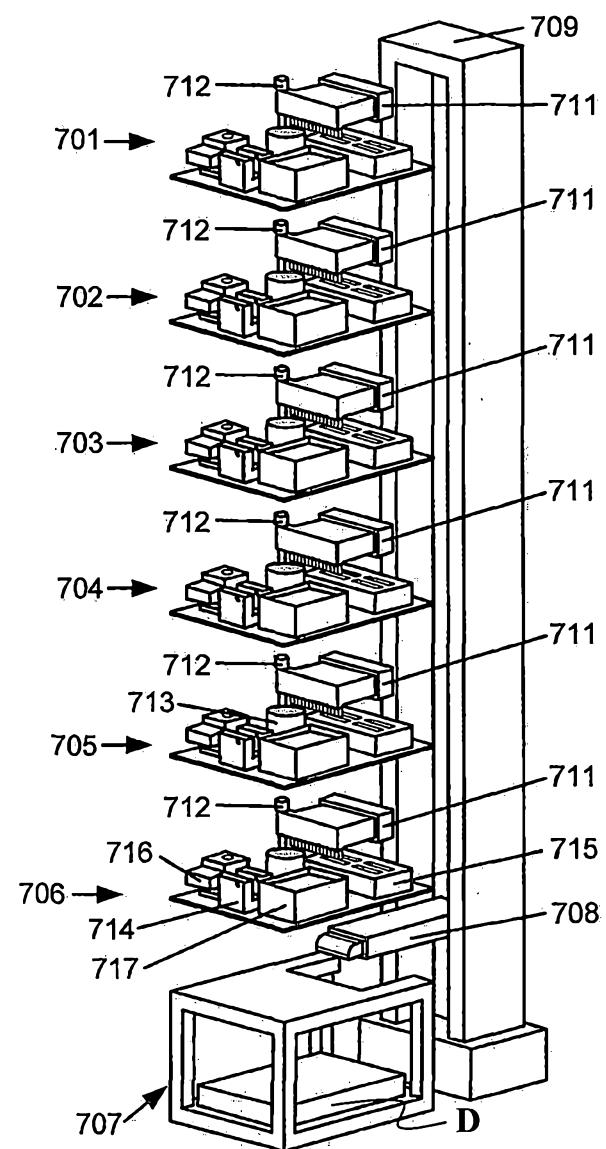


圖 8F







22/22

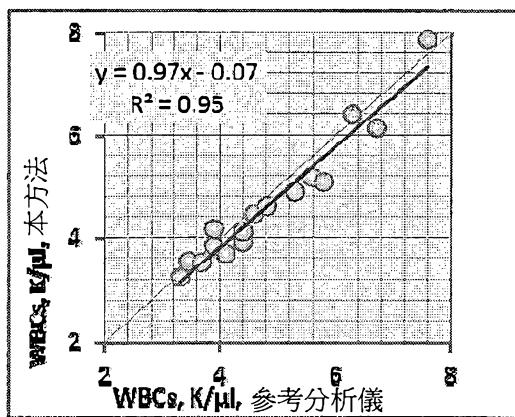


圖 12A

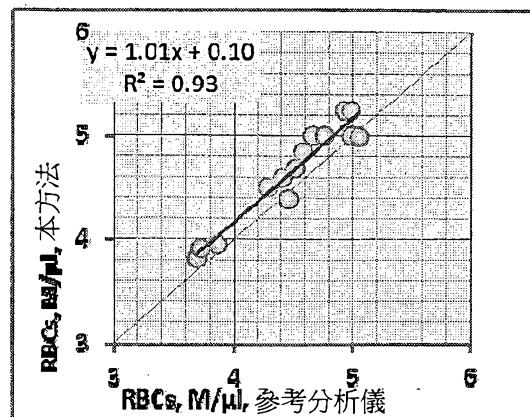


圖 12B

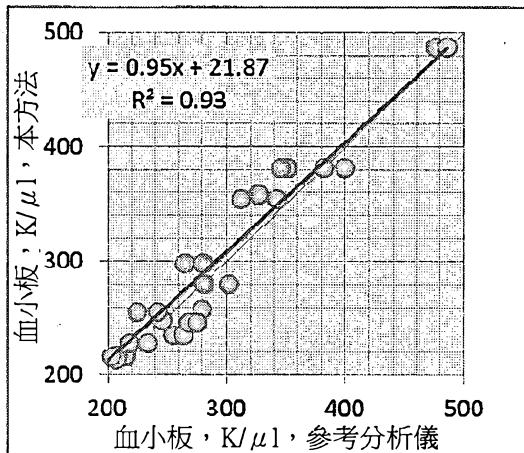


圖 12C

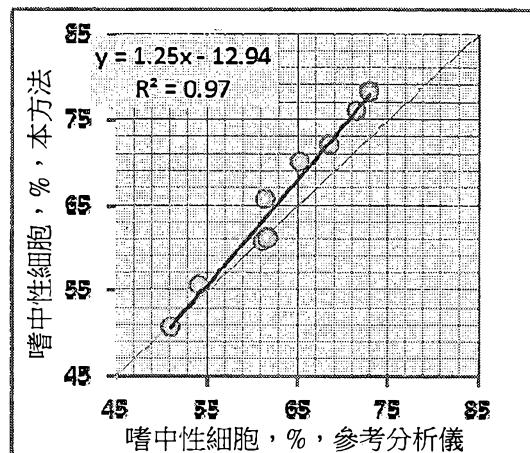


圖 12D

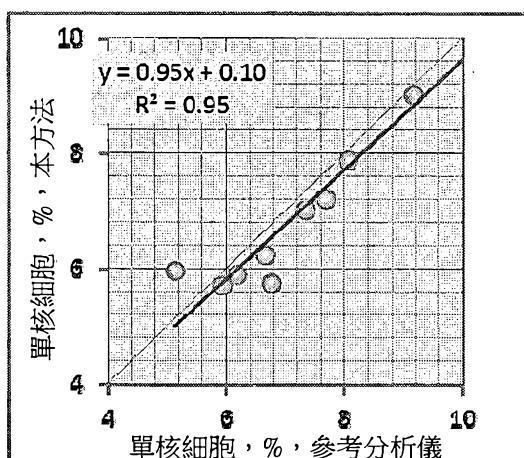


圖 12E

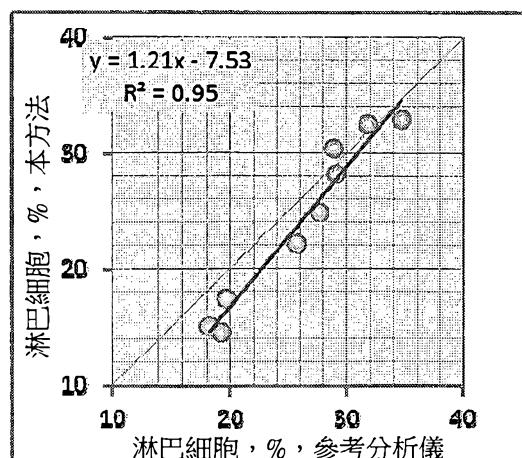


圖 12F