



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105102958 A

(43) 申请公布日 2015. 11. 25

(21) 申请号 201480020218. 1

(22) 申请日 2014. 04. 04

(30) 优先权数据

61/809, 179 2013. 04. 05 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 10. 08

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/033032 2014. 04. 04

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/165796 EN 2014. 10. 09

(71) 申请人 罗氏血液诊断股份有限公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 D·拉彭 D·扎尼泽 M·利卡里

B·J·麦基恩 E·D·耶顿

D·普尔 S·E·康罗伊

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 史悦

(51) Int. Cl.

G01N 1/31(2006. 01)

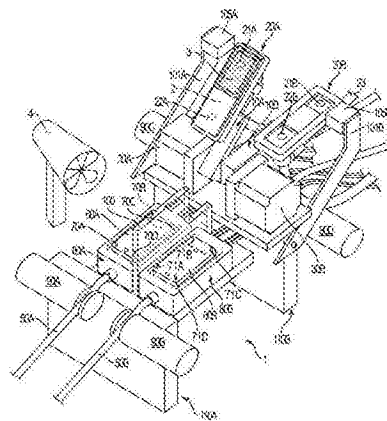
权利要求书4页 说明书29页 附图25页

### (54) 发明名称

制备用于检查的生物样本的自动化系统及方法

### (57) 摘要

本文公开的设备特征为基板臂和夹持器、平台,所述平台具有在所述基板臂处于样本处理位置时位于与所述基板相对的顶表面,且包括至少一个位于所述面向基板的平台表面的流体端口和至少一个位于面向所述基板的平台表面的真空端口,且在操作过程中所述设备配置成 (a) 从所述至少一个流体端口分配第一量的流体以填充基板和平台间的间隔, (b) 从所述至少一个流体端口分配额外的量的流体进入所述间隔以替换所述第一量的流体的部分,和 (c) 通过所述至少一个真空端口从所述间隔去除第一量的流体的部分。



1. 一种在基板上制备生物样本用于检查的设备,所述设备包括:  
基板臂,其包括基板夹持器;  
致动器,其连接至所述基板臂,且配置成使所述基板臂在打开位置与样本处理位置之间移动;  
平台,其具有在所述基板臂处于样本处理位置时位于与所述基板相对的顶表面,且包括至少一个位于所述面向基板的平台的表面上的流体端口和至少一个位于面向所述基板的平台的表面上的真空端口;和  
两个或更多的偏位件,其布置在所述平台的顶表面上,以使得当所述基板在基板处理位置接触所有的偏位件时,基板与平台的顶表面基本平行并且形成至少约 50 微米的间隔,  
其中操作过程中,通过以下配置所述设备以使流体在所述至少一个流体端口和至少一个真空端口之间循环:
  - (a) 从所述至少一个流体端口分配第一量的流体以填充基板和平台之间的间隔;
  - (b) 从所述至少一个流体端口分配额外的量的流体进入所述间隔以替换所述第一量的流体的部分;且
  - (c) 通过所述至少一个真空端口从所述间隔去除第一量的流体的部分。
2. 权利要求 1 的设备,其中在操作过程中,所述设备配置成:  
从所述至少一个流体端口分配多份额外的量的流体进入所述间隔以从所述间隔替换的流体的部分;且  
通过至少一个真空端口去除所述替换的流体的部分。
3. 权利要求 1 的设备,其中所述设备配置成持续分配额外的量的流体并去除所述第一量的流体的部分。
4. 权利要求 2 的设备,其中所述设备配置成交替地分配多份额外的量的流体和去除替换的流体的部分以生成在所述至少一个流体端口和至少一个真空端口之间的流体的脉动流。
5. 权利要求 2 的设备,其中所述多份额外的量的流体包含至少 2 份额外的量的流体。
6. 权利要求 2 的设备,其中所述多份额外的量的流体包含至少 4 份额外的量的流体。
7. 权利要求 1 的设备,其中所述设备配置成从所述至少一个流体端口以 20 微升每秒或更大的速率分配额外的量的流体。
8. 权利要求 1 的设备,其中所述设备配置成从所述至少一个流体端口以 250 微升每秒或更小的速率分配额外的量的流体。
9. 权利要求 1 的设备,其中将所述平台定向以使所述至少一个流体端口相对所述至少一个真空端口向上倾斜 3 度或更大。
10. 权利要求 1 的设备,其中将所述平台定向以使所述至少一个流体端口相对所述至少一个真空端口向上倾斜 20 度或更大。
11. 权利要求 1 的设备,其进一步包括位于基板夹持器上的抽吸端口,其中所述抽吸端口与抽吸源可连接,用于通过抽吸管向抽吸端口提供抽吸,从而将基板固定至所述基板夹持器。
12. 权利要求 1 的设备,其中所述至少一个流体端口包括第一染剂端口,且其中所述设备进一步包括第一染剂储液器和与第一染剂端口连接的第一染剂导管,以使在操作过程中

包含第一染剂的流体可从第一染剂储液器通过第一染剂端口分配进所述间隔。

13. 权利要求 12 的设备,其中所述至少一个流体端口包括在平台表面上与第一染剂端口间隔的第二染剂端口,且其中所述设备进一步包括第二染剂储液器和与第二染剂端口连接的第二染剂导管,以使在操作过程中包含第二染剂的流体可从第二染剂储液器通过第二染剂端口分配并进入所述间隔。

14. 权利要求 1 的设备,其中所述至少一个流体端口包括固定剂端口,且其中所述设备进一步包括固定剂储液器和与固定剂端口连接的固定剂导管,以使在操作过程中包含固定剂的流体可从固定剂储液器通过固定剂端口分配并进入所述间隔。

15. 权利要求 1 的设备,其中所述至少一个流体端口包括冲洗剂端口,且其中所述设备进一步包括冲洗剂储液器和与冲洗剂端口连接的冲洗剂导管,以使在操作过程中冲洗剂流体可从冲洗剂储液器通过冲洗剂端口分配并进入所述间隔。

16. 权利要求 1 的设备,其进一步包括废物导管和与所述至少一个真空端口连接的废物容器。

17. 权利要求 1 的设备,其中在操作过程中在所述至少一个流体端口和至少一个真空端口之间建立负压通路。

18. 权利要求 1 的设备,其中所述至少一个真空端口包括多个真空端口。

19. 权利要求 1 的设备,其中所述至少一个流体端口包括第一染剂端口、第二染剂端口、固定剂端口和冲洗剂端口,且其中在操作过程中所述设备配置成通过实施步骤 (a)、(b) 和 (c) 循环包含第一染剂的流体、包含第二染剂的流体、包含固定剂的流体和冲洗剂流体以分别从第一染剂端口、第二染剂端口、固定剂端口和冲洗剂端口分配流体。

20. 权利要求 1 的设备,其进一步包括具有凹槽的支持块,其中:

平台位于所述支持块的凹槽内;且

基板相对支持块的顶表面升高以使来自所述间隔的流体可在所述凹槽内收集。

21. 权利要求 1 的设备,其中所述基板臂是第一基板臂且所述基板夹持器是第一基板夹持器,所述设备进一步包括:

包括第二基板夹持器的第二基板臂;且

配置成在至少两处位置间平移设备的平移机构,其中在第一位置中,定位第一基板夹持器以从基板移动器取得基板,而在第二位置中,定位第二基板夹持器以从基板移动器取得基板。

22. 权利要求 21 的设备,其进一步包括与平移机构连接的控制系統,其中配置所述控制系統以使在所述设备的操作过程中,控制系統激活平移机构,以使:

当基板附接于所述第二基板夹持器且第二基板臂处于开放位置、处于样本处理位置或处于开放位置和样本处理位置之间的中间位置时,定位第一基板夹持器以从基板移动器取得基板;且

当基板附接于所述第一基板夹持器且第一基板臂处于开放位置、处于样本处理位置或处于开放位置和样本处理位置之间的中间位置时,定位第二基板夹持器以从基板移动器取得基板。

23. 一种在基板上制备生物样本用于检查的方法,所述方法包括:

(a) 相对于表面定位基板,以使生物样本面向所述表面,且使得所述基底和表面基本上

平行并形成至少约 50 微米的间隔；

(b) 随后以足以填充所述间隔的量分配第一量的 (i) 第一固定剂溶液、(ii) 第一染剂溶液、(iii) 第二染剂溶液和 (iv) 第一冲洗剂溶液进入所述基板和所述表面之间的间隔；且

(c) 在步骤 (b) 中分配第一量的每种 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 溶液后，且在步骤 (b) 中分配下一份 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 溶液前：

分配额外的量的溶液进入所述间隔以替换第一量的溶液的部分；且

通过真空端口去除第一量的溶液的部分。

24. 权利要求 23 的方法，其进一步包括：

分配多份额外的量的溶液进入间隔以从所述间隔替换溶液的部分；且

通过所述真空端口去除替换的溶液的部分。

25. 权利要求 23 的方法，其进一步包括持续分配额外的量的溶液并通过真空端口去除第一量的溶液的部分以在所述间隔中循环所述溶液。

26. 权利要求 24 的方法，其进一步包括交替地分配多份额外的量的溶液和去除替换的溶液的部分以在间隔内生成溶液的脉动流。

27. 权利要求 24 的方法，其中所述多份额外的量的溶液包括至少 2 份额外的量的溶液。

28. 权利要求 24 的方法，其中所述多份额外的量的溶液包括至少 4 份额外的量的溶液。

29. 权利要求 23 的方法，其进一步包括以 20 微升每秒或更大的速率分配额外的量的溶液进入所述间隔。

30. 权利要求 23 的方法，其进一步包括以 250 微升每秒或更小的速率分配额外的量的溶液进入所述间隔。

31. 权利要求 23 的方法，其中步骤 (a)、(b) 和 (c) 以少于 60 秒的总时间实施。

32. 一种在基板上制备生物样本用于检查的方法，所述方法包括：

(a) 相对于表面定位基板，以使生物样本面向表面，且使得所述基底和表面基本上平行并形成至少约 50 微米的间隔；

(b) 实施固定阶段，其包括：

以足以填充所述间隔的量分配第一量的固定剂溶液进入所述间隔；

分配额外的量的固定剂溶液进入所述间隔以替换第一量的固定剂溶液的部分；且

通过真空端口去除替换的第一量的固定剂溶液的部分；

(c) 实施第一染色阶段，包括：

以足以填充所述间隔的量分配第一量的第一染剂溶液进入所述间隔；

分配额外的量的第一染剂溶液进入所述间隔以替换第一量的第一染剂溶液的部分；且

通过所述真空端口去除替换的第一染剂溶液的部分；

(d) 实施第二染色阶段，包括：

以足以填充所述间隔的量分配第一量第二染剂溶液进入所述间隔；

分配额外的量的第二染剂溶液进入所述间隔以替换第一量的第二染剂溶液的部分；且

通过所述真空端口去除替换的第二染剂溶液的部分；且

(e) 实施冲洗阶段，包括：

以足以填充所述间隔的量分配第一量的冲洗剂溶液进入所述间隔；

分配额外的量的冲洗剂溶液进入所述间隔以替换第一量的冲洗剂溶液的部分 ;且通过所述真空端口去除替换的冲洗剂溶液的部分。

## 制备用于检查的生物样本的自动化系统及方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2013 年 4 月 5 日提交的美国临时申请号 61/809, 179 的优先权, 其全部内容通过提述并入本文。

### 背景技术

[0003] 多年以来, 实验室技师已使用用于制备生物样本的染料和染剂 (如在 Romanowsky 染色中所使用的那些) 以改善检查过程中样本的对比度。这种检查方法通常利用显微镜, 另一种捕获样本图像的装置, 或者在其它情况下, 肉眼的视觉检查。制备用于检查的样本的几种不同的系统和方法是已知的。例如, 美国专利号 6, 096, 271、7, 318, 913 以及 5, 419, 279 和公布的美国专利申请号 2008/0102006 和 2006/0073074 涉及用于样本处理过程中对基板进行染色的机器和方法。这些出版物提供了关于染色和制备样本用于检查的诸多细节。

[0004] 发明概述

[0005] 本公开涉及制备生物样本用于检查的自动化系统及方法。例如, 所述样本可包括施加至基板例如显微镜载片或盖玻片的含有红血细胞、白血细胞和血小板的血液样品。不同的实施方案可用于从生物样品包括骨髓、尿、阴道组织、上皮组织、肿瘤、精液、唾液及其它体液中制备其它的生物样本。本公开的其它方面包括用于固定、染色、冲洗以及搅拌样本的系统和方法。一般地, 本文公开的系统和方法通过使用最小的流体量提供快速、高效且高度均匀的样本处理。所述方法包括一个或多个的固定、染色以及冲洗阶段, 在一个或多个所述固定、染色以及冲洗阶段期间或之后包括一个或多个搅拌阶段。可将所述系统作为独立的装置或作为较大系统中的部件实施用于制备和检查生物样本。

[0006] 一般地, 在第一方面, 本公开特征为一种在基板上制备生物样本用于检查的设备, 所述设备包括: (a) 基板臂, 其包括基板夹持器; (b) 第一致动器, 其连接至所述基板臂, 且配置成使所述基板臂在打开位置 (open position) 与样本处理位置之间移动; (c) 第二致动器, 其布置且配置成搅拌由所述基板臂上的基板夹持器夹持的基板; (d) 平台, 其具有当所述基板臂处于样本处理位置时位于与所述基板相对的顶表面; 以及 (e) 两个以上的偏位件, 其布置在所述平台的顶表面上, 以使得当所述基板在基板处理位置接触所有的偏位件时, 基板与平台的顶表面基本平行并且形成至少约 50 微米的间隔。

[0007] 该设备的实施方案可单独地或组合地包括以下特征中的任何一个或多个。

[0008] 所述第一与第二致动器可为相同的致动器, 其配置成使所述基板臂移动且搅拌由基板臂上所述基板夹持器夹持的基板。所述平台顶表面的总表面积可小于所述基板的总表面积。可具有至少三个或更多布置在所述平台顶表面外边缘的偏位件, 其中所述偏位件的尖端 (tips) 限定了一个平面。

[0009] 抽吸端口可位于所述基板夹持器上; 所述抽吸端口可连接至抽吸源, 用于通过抽吸管向抽吸端口提供抽吸, 从而将基板保持于所述基板夹持器。所述设备可包括位于所述平台顶表面上的第一染剂端口、第一染剂储液器、以及连接至所述第一染剂端口的第一染剂导管, 用于为染剂提供流体通路, 以将其从所述第一染剂储液器泵送至所述第一染剂端

口并进入到所述间隔中。所述设备可包括位于所述平台顶表面上在不同于所述第一染剂端口位置的位置处的第二染剂端口、第二染剂储液器以及第二染剂导管,其中所述第一与第二染剂端口当基板处于所述样本处理位置时都布置在与基板上样本区域间隔开的顶表面上,并且其中所述第二染剂导管连接至所述第二染剂端口,用于为染剂提供流体通路,以将其从所述第二染剂储液器泵送至所述第二染剂端口并进入到所述间隔中。

[0010] 所述设备可包括位于所述平台顶表面上的第一固定剂端口、固定剂储液器、以及连接至所述第一固定剂端口的固定剂导管,用于为固定剂提供流体通路以将其从所述固定剂储液器泵送至所述第一固定剂端口并进入到所述间隔中。所述设备可包括位于所述平台顶表面上的第一冲洗剂端口、冲洗剂溶液储液器、以及连接至所述第一冲洗剂端口的冲洗导管,用于为冲洗流体提供流体通路,以将其从所述冲洗剂溶液储液器泵送至所述第一冲洗剂端口并进入到所述间隔中。

[0011] 所述设备可包括位于所述平台顶表面上的第一真空端口、第一废物容器、以及连接至所述第一真空端口的第一废物导管,用于提供负压的通路,以将流体从所述间隔或基板中排出 (evacuate) 并且将流体沉积到所述第一废物容器中。所述设备可包括位于所述平台顶表面上的第二真空端口和连接至所述第二真空端口的第二废物导管,用于提供负压的通路以将流体从所述间隔或基板中排出并且将流体沉积到所述第一废物容器中。所述第一与第二真空端口可位于所述平台顶表面的相对端上。

[0012] 所述平台可包括:固定剂端口;第一染剂端口;第二染剂端口;冲洗剂端口;第一真空端口;以及第二真空端口。所述设备可包括布置成支撑所述平台的块,其中所述块包括:固定剂端口;第一染剂端口;第二染剂端口;冲洗剂端口;第一真空端口;以及第二真空端口,其中块上的每个端口处于对应于位于所述平台中的端口的的位置。

[0013] 所述设备可包括:第一染剂储液器;第二染剂储液器;固定剂储液器;冲洗剂溶液储液器;废物容器;泵;多个流体导管,其连接至所述泵及连接至所述储液器,并且布置成用于从所述储液器的任何一个或多个中分配流体;以及真空源,用于从所述基板中排出流体进入到所述废物容器中。所述设备可包括干燥器,其定位成当所述基板位于所述打开位置时引导空气流穿过所述样本。

[0014] 所述设备的实施方案还可包括本文所公开的任何其它特征、以及特征的任何组合,视情况而定。

[0015] 在进一步的方面,本公开特征为在基板上制备生物样本用于检查的方法,所述方法包括:(a) 相对于表面定位所述基板,以使所述生物样本面对所述表面,且使得所述基板与表面基本平行并形成至少约 100 微米的间隔;(b) 以足以接触所述样本与表面的量连续分配 (i) 第一固定剂溶液、(ii) 第一染剂溶液、(iii) 第二染剂溶液、以及 (iv) 第一冲洗剂溶液到所述基板与表面之间的间隔中;以及 (c) 在分配步骤 (b) 中溶液 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 的每一种后,且在分配步骤 (b) 中溶液 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 的下一一种前,执行至少第一搅拌周期,其中所述第一搅拌周期包括在所分配的溶液接触所述样本的第一搅拌周期的持续时间改变所述基板与表面之间的距离,以及从所述间隔及从接触所述样本中去除所分配的溶液。

[0016] 所述方法的实施方案可包括下列特征中的任何一个或多个。

[0017] 每个连续分配的步骤可包括以至少 70 微升每秒的流速分配步骤 (b) 中溶液中的

一种进行不多于三秒。所述第一搅拌周期可包括将所述基板与表面之间的距离增加至少十微米,以及将所述基板与表面之间的距离减少至少五微米。去除所分配的溶液可包括向所述间隔施加小于一个大气压的至少一磅每平方英寸的压力进行至少两秒。

[0018] 所述方法的实施方案还可包括本文所公开的任何其它特征、以及特征的任何组合,视情况而定。

[0019] 在另一方面,本公开特征为在基板上制备生物样本用于检查的方法,其中所述方法包括:(a) 相对于表面定位所述基板,以使所述生物样本面对所述表面,并且使得所述基板与所述表面基本平行且形成至少约 50 微米的间隔;(b) 以足以接触所述样本与表面的量将第一染剂分配到所述基板与表面之间的间隔中;(c) 执行至少第一搅拌阶段,其中所述第一搅拌阶段包括当所述第一染剂接触所述样本进行第一搅拌阶段的持续时间时改变所述基板与表面之间的距离;以及(d) 从所述间隔与样本中去除所述第一染剂。

[0020] 所述方法的实施方案可包括下列特征中的任何一个或多个。

[0021] 所述分配步骤可包括以至少 70 微升每秒的流速分配染剂进行不多于三秒。所述搅拌阶段可包括将所述基板与表面之间的距离增加至少十微米,以及将所述基板与表面之间的距离减少至少五微米。去除染剂可包括向所述间隔中的第一染剂施加至少一磅每平方英寸的真空力进行至少两秒。

[0022] 所述方法可包括:以足以接触所述样本与表面的量将第二染剂分配到所述基板与表面之间的间隔中;执行至少第二搅拌阶段,其中所述第二搅拌阶段包括当所述第二染剂接触所述样本进行第二搅拌阶段的持续时间时改变所述基板与表面之间的距离;以及从所述间隔与样本中去除所述第二染剂。

[0023] 所述方法的实施方案还可包括本文所公开的任何其它特征和 / 或步骤、以及其任何组合,视情况而定。

[0024] 在进一步的方面,本公开特征为在基板上制备生物样本用于检查的方法,其中所述方法包括:(a) 相对于表面定位所述基板,以使所述样本面对所述表面,且使得所述基板定位以在所述表面与所述基板的至少一部分之间形成至少约 50 至 250 微米,例如 50、60、65、70、75、80、85、90、95、100、125、150、175、200、225 或 250 微米的间隔;(b) 执行固定阶段,其包括 (i) 以足以接触所述样本与表面的量将固定剂分配到所述基板与表面之间的间隔中, (ii) 执行至少第一搅拌阶段,其中所述第一搅拌阶段包括当所述固定剂接触所述样本进行第一搅拌阶段的持续时间时改变所述基板与表面之间的距离,以及 (iii) 从所述间隔与样本中去除所述固定剂;(c) 执行第一染色阶段,其包括 (i) 以足以接触所述样本与表面的量将第一染剂分配到所述基板与表面之间的间隔中, (ii) 执行至少第二搅拌阶段,其中所述第二搅拌阶段包括当所述第一染剂接触所述样本进行第二搅拌阶段的持续时间时改变所述基板与表面之间的距离,以及 (iii) 从所述间隔与样本中去除所述第一染剂;(d) 执行第二染色阶段,其包括 (i) 以足以接触所述样本与表面的量将第二染剂分配到所述基板与表面之间的间隔中, (ii) 执行至少第三搅拌阶段,其中所述第三搅拌阶段包括当所述第二染剂接触所述样本进行第三搅拌阶段的持续时间时改变所述基板与表面之间的距离,以及 (iii) 从所述间隔与样本中去除所述第二染剂;以及 (e) 执行第一冲洗阶段,其包括 (i) 以足以接触所述样本与表面的量将第一冲洗剂分配到所述基板与表面之间的间隔中, (ii) 执行至少第四搅拌阶段,其中所述第四搅拌阶段包括当所述第一冲洗剂接触所述样本进行

第四搅拌阶段的持续时间时改变所述基板与表面之间的距离,以及(iii)从所述间隔与样本中去除所述第一冲洗剂。

[0025] 所述方法的实施方案可包括下列特征中的任何一个或多个。

[0026] 所述方法可包括执行第二冲洗阶段,其中所述第二冲洗阶段包括:(i)以足以接触所述样本与表面的量将第二冲洗剂分配到所述基板与表面之间的间隔中;(ii)执行至少第五搅拌阶段,其中所述第五搅拌阶段包括当所述第二冲洗剂接触所述样本进行第五搅拌阶段的持续时间时改变所述基板与表面之间的距离;以及(iii)从所述间隔与样本中去除所述第二冲洗剂。所述方法还可以包括通过引导空气流穿过所述样本而执行干燥周期。

[0027] 例如可在少于70秒(例如少于60秒)的时间执行组合的方法步骤。在一些实施方案中,所述方法可消耗小于650微升的固定剂、第一染剂、第二染剂以及第一冲洗剂流体。在某些实施方案中,所述方法可消耗小于850微升的固定剂、第一染剂、第二染剂、第一冲洗剂及第二冲洗剂流体。

[0028] 所述方法的实施方案还可包括本文所公开的任何其它特征和/或步骤、以及其任何组合,视情况而定。

[0029] 在另一方面,本公开特征为自动化样本检查系统,所述系统包括:施用器站,其施加样品样本至基板,本文公开的任何一种生物样本制备设备;以及成像站,其在由所述样本制备设备进行制备之后对所述生物样本进行成像。

[0030] 所述自动化样本检查系统的实施方案可包括本文所公开的特征中的任何一个或多个,包括本文所公开的生物样本制备设备的特征中的任何一个或多个,视情况而定。

[0031] 进一方面,本公开特征为在基板上制备生物样本用于检查的设备,所述设备特征为:基板臂,其包括基板夹持器;致动器,其连接至所述基板臂且配置成使所述基板臂在打开位置与样本处理位置之间移动;平台,其具有在所述基板臂处于样本处理位置时位于与所述基板相对的顶表面,且包括至少一个位于所述面向基板的平台的表面上的流体端口和至少一个位于面向所述基板的平台的表面上的真空端口;和两个以上的偏位件,其布置在所述平台的顶表面上,以使当所述基板在基板处理位置接触所有的偏位件时,基板与平台的顶表面基本平行并且形成至少约50微米的间隔,其中操作过程中,通过如下配置所述设备以在所述至少一个流体端口和至少一个真空端口间循环流体:(a)从所述至少一个流体端口分配第一量的流体以填充基板和平台间的间隔;(b)从所述至少一个流体端口分配额外的量的流体进入所述间隔以替换所述第一量的流体的部分;且(c)通过所述至少一个真空端口从所述间隔去除第一量的流体的部分。

[0032] 所述设备的实施方案可包括任何下列特征的一个或多个。

[0033] 在操作过程中,所述设备可配置成从所述至少一个流体端口分配多份额外的量的流体进入所述间隔以从所述间隔替换流体的部分;且通过至少一个真空端口去除所述替换的流体的部分。所述设备可配置成持续分配额外的量的流体并去除所述第一量的流体的部分。所述设备可配置成交替地分配多份额外的量的流体和去除替换的流体的部分以在所述至少一个流体端口和至少一个真空端口间生成流体的脉动流。

[0034] 所述所述多份额外的量的流体包含至少2份额外的量的流体(例如至少4份额外的量的流体)。所述设备配置成从所述至少一个流体端口以20微升每秒或更大的速率分配额外的量的流体。所述设备配置成从所述至少一个流体端口以250微升每秒或更小的速率

分配额外的量的流体。可定向所述平台使得所述至少一个流体端口相对所述至少一个真空端口向上倾斜 3 度或更大（例如 20 度或更大）的角度。

[0035] 所述设备可包括位于基板夹持器的抽吸端口，所述抽吸端口与抽吸源可连接，用于通过抽吸管向抽吸端口提供抽吸以将基板固定于所述基板夹持器。所述至少一个流体端口包括第一染剂端口，且其中所述设备进一步包括第一染剂储液器和与第一染剂端口连接的第一染剂导管，以使在操作过程中，包含第一染剂的流体可从第一染剂储液器通过第一染剂端口分配进所述间隔。所述至少一个流体端口可包括在平台表面上与第一染剂端口间隔的第二染剂端口，且其中所述设备进一步包括第二染剂储液器和与第二染剂端口连接的第二染剂导管，以使在操作过程中，包含第二染剂的流体可从第二染剂储液器通过第二染剂端口分配并进入所述间隔。

[0036] 所述至少一个流体端口包括固定剂端口，且其中所述设备进一步包括固定剂储液器和与固定剂端口连接的固定剂导管，以使在操作过程中，包含固定剂的流体可从固定剂储液器通过固定剂端口分配并进入所述间隔。所述至少一个流体端口包括冲洗剂端口，且其中所述设备进一步包括冲洗剂储液器和与冲洗剂端口连接的冲洗剂导管，以使在操作过程中，冲洗剂流体可从冲洗剂储液器通过冲洗剂端口分配并进入所述间隔。

[0037] 所述设备可包括废物导管和与所述至少一个真空端口连接的废物容器。在操作过程中，可在所述至少一个流体端口和至少一个真空端口间建立负压通路。所述至少一个真空端口可包括多个真空端口。

[0038] 所述至少一个流体端口可包括第一染剂端口、第二染剂端口、固定剂端口和冲洗剂端口，且其中操作过程中，所述设备配置成通过实施步骤 (a)、(b) 和 (c) 来循环包含第一染剂的流体、包含第二染剂的流体、包含固定剂的流体和冲洗剂流体以分别从第一染剂端口、第二染剂端口、固定剂端口和冲洗剂端口分配流体。

[0039] 所述设备可包括具有凹槽的支持块，其中平台位于所述支持块的凹槽内，且基板相对支持块的顶表面升高使得来自所述间隔的流体可在所述凹槽内收集。

[0040] 所述基板臂可为第一基板臂且所述基板夹持器可为第一基板夹持器，所述设备可包括：特征为第二基板夹持器的第二基板臂，且配置成在至少两处位置间平移设备的平移机构，其中在第一位置中，定位第一基板夹持器以从基板移动器取得基板，而在第二位置中，定位第二基板夹持器以从基板移动器取得基板。所述设备可包括与平移机构连接的控制系統，其中配置所述控制系統使得在所述设备的操作过程中所述控制系統激活平移机构，以使：当基板附接于所述第二基板夹持器且第二基板臂处于开放位置、样本处理位置或在开放位置和样本处理位置之间的中间位置时，定位第一基板夹持器以从基板移动器取得基板，且当基板附接于第一基板夹持器且第一基板臂处于开放位置、样本处理位置或在开放位置和样本处理位置之间的中间位置时，定位第二基板夹持器以从基板移动器取得基板。

[0041] 所述设备的实施方案还可包括本文公开的任何其他特征或方面，包括与不同实施方案相关的公开的特征和方面的任何组合，视情况而定。

[0042] 另一方面，本公开的特征为一种在基板上制备生物样本用于检查的方法，所述方法包括：(a) 相对表面放置基板，以使生物样本面向所述表面，且使得所述基底和表面基本上平行并形成至少约 50 微米的间隔；(b) 随后以足以填充所述间隔的量分配第一量的 (i) 第一固定剂溶液、(ii) 第一染剂溶液、(iii) 第二染剂溶液和 (iv) 第一冲洗剂溶液进入所

述基板和所述表面之间的间隔；且 (c) 在步骤 (b) 中分配第一量的每种 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 溶液后，且在步骤 (b) 中分配下一份 (i)、(ii)、(iii) 和 (iv) 溶液前分配额外的量的溶液进入所述间隔以替换第一量的溶液的部分，且通过真空端口去除第一量的溶液的部分。

[0043] 所述方法的实施方案可包括一种或多种下列特征。

[0044] 所述方法可包括分配多份额外的量的溶液进入间隔以从所述间隔替换溶液的部分，且通过所述真空端口去除替换的溶液的部分。所述方法可包括持续分配额外的量的溶液并通过真空端口去除第一量的溶液的部分以在所述间隔中循环所述溶液。所述方法可包括交替地分配多份额外的量的溶液和去除溶液的替换的部分以在间隔内生成溶液的脉动流。

[0045] 所述多份额外的量的溶液包括至少 2 份额外的量的溶液（例如至少 4 份额外的量的溶液）。所述方法可包括以 20 微升每秒或更大的速率分配额外的量的溶液进入所述间隔。所述方法可包括以 250 微升每秒或更小的速率分配额外的量的溶液进入所述间隔。步骤 (a)、(b) 和 (c) 可在少于 60 秒的总时间实施。

[0046] 所述方法的实施方案还可包括本文公开的任何其他步骤或特征，包括公开的与不同实施方案相关的步骤和特征的组合，视情况而定。

[0047] 进一步的方面，本公开特征为在基板上制备生物样本用于检查的方法，所述方法包括：(a) 相对于表面放置基板，以使生物样本面向表面，且使得所述基底和表面基本上平行并形成至少约 50 微米的间隔；(b) 实施固定阶段，其包括：以足以填充所述间隔的量分配第一量的固定剂溶液进入所述间隔；分配额外的量的固定剂溶液进入所述间隔以替换第一量的固定剂溶液的部分；且通过真空端口去除替换的第一量的固定剂溶液的部分；(c) 实施第一染色阶段，包括：以足以填充所述间隔的量分配第一量的第一染剂溶液进入所述间隔；分配额外的量的第一染剂溶液进入间隔以替换第一量的第一染剂溶液的部分；且通过所述真空端口去除替换的第一染剂溶液的部分；(d) 实施第二染色阶段，包括：以足以填充所述间隔的量分配第一量的第二染剂溶液进入所述间隔；分配额外的量的第二染剂溶液进入所述间隔以替换第一量的第二染剂溶液的部分；且通过所述真空端口去除替换的第二染剂溶液的部分；且 (e) 实施冲洗阶段，包括：以足以填充所述间隔的量分配第一量的冲洗剂溶液进入所述间隔；分配额外的量的冲洗剂溶液进入所述间隔以替换第一量的冲洗剂溶液部分；且通过所述真空端口去除替换的冲洗剂溶液的部分。

[0048] 所述方法的实施方案可包括本文公开的任何步骤和特征，包括公开的与不同实施方案相关的步骤和特征的组合，视情况而定。

[0049] 除非另有定义，本公开的特征为出于阐述目的的多个实施方案。然而，应该注意的是与这些实施方案相关的特征、方面和步骤可与其他实施方案相关的特征、方面和步骤组合。本公开不限于公开的特征、方面和步骤与特定实施方案的特定组合的保护范围，但应该理解的是这些特征、方面和步骤可更广泛应用于全部公开，且根据预期可与额外的特定实施方案组合。

[0050] 下列每一个申请的全部内容都通过提述并入本文：2011 年 11 月 9 日提交的美国专利申请号 13/293,050；2011 年 7 月 21 日提交的美国临时专利申请号 61/510,180 和 2010 年 11 月 10 日提交的美国临时专利申请号 61/460,775。

[0051] 除非另有定义,本文所使用的所有技术和科学术语具有与本发明所属领域中的普通技术人员之一所通常理解的相同的含义。虽然可在本发明的实践或测试中使用与本文所公开的相类似或相同的方法和材料,但是下面说明合适的方法和材料。本文提及的所有出版物、专利申请、专利以及其它参考文献通过提述以其整体并入。在发生冲突的情况下,以包括定义本说明书为准。另外,所述的材料、方法以及实施方案仅为说明性的,并非意欲为限制性的。

[0052] 从下面的详细说明以及从权利要求中,本发明的其它特征和优点将是显而易见的。

[0053] 附图简述

[0054] 图 1 是制备生物样本用于检查的设备的实施方案的透视图,两个样品夹持器 20A 和 20B 处于打开位置。

[0055] 图 2 是图 1 设备的一部分的另一透视图(基板臂和样品夹持器未显示)。

[0056] 图 3A 是图 1 设备的另一透视图,样品夹持器 20A 处于打开位置,样品夹持器 20B 处于闭合(样本处理)位置。

[0057] 图 3B 是图 1 设备的分度机构(indexing mechanism)的透视图。

[0058] 图 4 是图 1 设备的透视图,展示了通过多个流体导管在设备与流体容器之间的连接。

[0059] 图 5 是包括如本文所述的自动化基板移动器和样本制备设备的实施方案的样本检查系统的透视图。

[0060] 图 6A 是图 1 设备的一部分的放大透视图,详细显示了样本夹持器 20B、平台 60B 以及块 80B。

[0061] 图 6B 是图 1 设备的球接头机构的透视图。

[0062] 图 6C 是图 6B 球接头机构的横截面图。

[0063] 图 7A 是显示用于将基板臂从打开位置移动至闭合(样本处理)位置的一系列步骤的流程图。

[0064] 图 7B 是如本文所述的样本制备设备的实施方案的示意图。

[0065] 图 8A 是显示用于将基板臂从打开位置移动至样本处理位置的替代系列步骤的流程图。

[0066] 图 8B 是制备生物样本用于检查的设备的示意图,其包括两个致动器。

[0067] 图 9 是显示将固定剂施加至样本的一系列步骤的流程图。

[0068] 图 10 是显示将染料施加至样本的一系列步骤的流程图。

[0069] 图 11A 是显示将多余流体从基板中除去的一系列步骤的流程图。

[0070] 图 11B 是显示将多余流体从基板中除去的替代系列步骤的流程图。

[0071] 图 12 是显示冲洗样本的一系列步骤的流程图。

[0072] 图 13 是显示搅拌样本的一系列步骤的流程图。

[0073] 图 14 是显示干燥样本的一系列步骤的流程图。

[0074] 图 15 是如在更大样本检查系统中所使用的样本制备设备的透视图。

[0075] 图 16 是显示处理安装在基板上的样本的一系列步骤的流程图。

[0076] 图 17 是显示所消耗的流体的体积作为图 16 流程图中时间的函数的图。

[0077] 图 18A 和 18B 是图 1 设备的透视图,其显示通过自动化基板移动器将基板置于基板臂上。

[0078] 各图中相同参考标号指示相同的部件。

[0079] 发明详述

[0080] 本文公开了用于自动化生物样本处理的方法及系统。本文所述的自动化样本处理方法及系统提供了优于手动及其它自动化处理方法的优点,包括增强的处理速度,同时使用最小的试剂量,并且同时生产高度均匀的样品制备,与通过手动或通过其它系统处理的样本相比,其显著降低与染剂、固定剂及其它试剂的应用相关联的变异性。

[0081] 常规的自动化处理方法通常具有相对高的处理量同时消耗大体积的处理流体,或者具有相对低的处理能力同时消耗减少体积的流体。然而,对于许多应用来说,高能力操作与低流体消耗这二者都是所希望的。通过保持高能力,可有效地处理样本进行后续检查。通过保持低的流体消耗,处理废物的量随着处理试剂所需的体积而减少,保持操作成本较低。本文所公开的系统及方法允许样本的快速自动化处理(例如,单个机器每小时大于 100 个样本),使用低体积的处理流体(例如,每个样本小于 1mL 流体),同时产生高度一致且可重复的结果。

[0082] 生物样本制备系统及方法

[0083] 检查样本之前,按一系列步骤制备样本以增强其中某些特征的视觉外观。图 1 展示了制备生物样本用于检查或者在基板 2 如显微镜载片、盖玻片或其它透明表面上成像的设备或机器 1 的实施方案。机器 1 可并入到用于制备和分析包括体液或包含有细胞的其它生物样品的样本的整体系统中,如图 15 所示的及下文所述的系统 2000。机器 1 通常可包括或形成系统的一部分,该系统特征为具有获取样本的第一站、将样本施加至基板的第二站、分别用于固定和染色样本的第三站和第四站、干燥样本的第五站、成像样本的第六站以及用于分析从样本中获取的图像与数据的第七站。机器 1 的某些实施方案与系统 2000 是相容的;机器 1 的一些实施方案可用在其它样本制备系统中,和/或作为独立的装置。

[0084] 机器 1 可包括或连接至控制系统 5,如图 4 所示,其提供机器 1 的另一透视图。控制系统 5 可包括一台或更多计算机,每个包含能执行存储在计算机可读介质如硬盘驱动器、光盘驱动器或存储器上的软件指令的中央处理单元。此外,控制系统 5 可包括用于执行软件指令的电子电路。控制系统 5 可包括用于接收用户命令的用户界面,以控制机器 1 的操作。存储在或提供给计算机的软件可包括在样本处理时控制机器 1 的部件如流体泵和真空装置的操作的程序。例如,该软件可包括用于指导机器 1 施加各种固定剂、染剂以及冲洗剂至样本,并且在样本处理过程中执行若干搅拌步骤的指令。

[0085] 此外,软件可包括默认设置,用户界面可包含自定义功能,用于向用户提供改变这些默认设置的能力。例如,用户界面可包含的自定义功能有允许用户自定义速度、频率,或固定、染色及漂洗阶段的顺序,以及搅拌参数(下面进一步描述)。控制系统 5 还可经由网络协议(如 Appletalk<sup>®</sup>、IPX 或 TCP/IP)进行通信。例如,网络协议可使用电缆(如双绞线电缆)和/或无线连接,如 WiFi。使用网络协议,该控制系统可连接至实验室信息系统。实验室信息系统可包含用于存储与在机器 1 上处理的样本有关的信息的服务器和/或数据库。例如,数据库可包含这样的表格,其提供关于样本的人或来源的信息(例如,姓名、出生日期(DOB)、地址、样本采样的时间、性别等)、与样本处理有关的信息(处理日期 ##/##/####、

样本号 # 等)、所获得的样本的任何图像的副本以及通过分析图像所获取的任何结果的副本。

[0086] 参照图 1, 机器 1 可包括支撑 110A 和 110B, 以将装置紧固至系统或实验室工作站内的位置。机器 1 还包括一个或多个的基板臂 10A 和 10B, 每个在其底部连接至致动器 30A 和 30B。基板臂 10A 和 10B 的相对端部包括基板夹持器 20A 和 20B, 用于在样本处理过程中接收和保持基板。每个基板夹持器 20A 和 20B 接收和保持基板 2, 同时机器 1 完成所有的样本处理步骤(如下所述)。所述基板可为或包括显微镜载片、盖玻片或适于在样本处理及样本处理后的微观检查过程中保持样本的其它透明材料。图 1 的实施方案展示了玻璃显微镜载片、基板 2, 其包括生物样本 3。通过使用抽吸端口, 基板夹持器 20A、20B 可在样本处理过程中保持基板 2 至基板臂 10A、10B。通过抽吸端口 21A 和 21B、以及 22A 和 22B, 抽吸管 23 提供抽吸至基板夹持器 20A 和 20B(要指出的是, 端口 21A 和 22A 位于图 1 中的载片 2 之后, 并且以虚线示出)。

[0087] 图 1-3 中所示的机器 1 实施方案是双基板机器, 能在基板臂 10A 和 10B 中的每个上保持且处理基板。其它实施方案用于处理单一基板或者依次或同时处理三个或更多的基板。此外, 虽然图 1-6 中所示的实施方案使用抽吸以将基板 2 附接于基板臂 10A 和 10B, 但是替代实施方案可使用各种类型的夹具、指状件或磁体(如果基板被磁化), 以在样本处理过程中将基板 2 附接于基板臂 10A。

[0088] 在图 5 和 18A-B 所示的实施方案中, 机器 1 接收携带来自自动化基板移动器 120 或手动地来自个人的样本 3 的基板 2。作为实施方案, 基板移动器 120 可以是在站之间(例如, 站 121 至站 122 至站 123、至站 124 以及至站 125) 传送基板的装置。图 5 展示了一系统, 其具有第一标签阅读器站 121、施用器站 122、包括机器 1 的染色站 123、摄像或成像站 124 以及第二标签阅读器站 125。第一标签阅读器站 121 配置成阅读来自基板 2 的信息, 如条形码和/或“指纹”信息, 用于识别特定的基板 2 及其上的样本 3。第二标签阅读器站 125 以相同的方式起作用, 其阅读的信息用于验证在站 124 成像的样本 3 与被处理的基板相同。

[0089] 基板移动器 120 可包括夹持器 127, 用于保持基板 2, 和配准电路(registration circuitry) 或软件, 以使得移动器 120 能够确定基板 2 是否安装在移动器 120 中。在一个实施方案中, 基板移动器 120 可包括液压缸, 用于使基板 2 从第一站 121 移动至第二站 122。在样本处理后, 基板移动器 120 可将处理过的基板从染色站 123 移出, 并将基板 2 传送至另一站用于基板检查, 如显微镜或站 124。另外, 个人可在样本处理后手动地从机器中移出样本。

[0090] 基板臂 10A 和 10B 可绕着轴旋转, 以使得基板能够从用于加载的打开位置移动至样本处理位置, 并且在样本处理后回到用于卸载的打开位置。图 7A 展示了流程图 500, 其包括一系列步骤, 用于使基板臂从打开位置移动至处理位置。参照图 7B, 流程图 500 在下面得到进一步说明, 图 7B 展示了机器 1 的示意图。

[0091] 需要注意的是图 1 中的机器 1 配置成接受和检查两个基板。在下面的讨论和附图中, 可指机器 1 中的仅一组部件(例如, 基板夹持器 20A、致动器 30A、基板臂 10A 等)。然而, 要明白的是, 所公开的与一组部件有关的相同步骤、特征以及属性也适用于机器 1 中的另一组部件(例如, 基板夹持器 20B、致动器 30B、基板臂 10B 等)。因此, 为了清楚和简洁

起见,尽管本文的讨论只集中在一组部件上,但是要明白的是,用于样本检查的机器如机器 1 可包括两组或多于两组的部件,每组具有本文所讨论的特征中的一些或全部。

[0092] 返回到图 7A 和 7B,在流程图 500 的第一步骤 502 中,基板移动器 120 将基板 2 置于与基板夹持器 20A 接触。在步骤 504 中,基板 2 定位在基板夹持器上于“样本向上”或“打开”位置。接着,在步骤 506 中,致动器 30A 使基板臂 10A 旋转约  $180^\circ$  (参照图 7B),以将基板 2 定位在“样本向下”或“样本处理”或“闭合”位置(步骤 508),直接在平台 60A 的上方,以使得在步骤 510 中基板 2 处于处理位置。

[0093] 然后,在步骤 512 中,通过引导合适的流体包括染剂、洗涤流体以及固定剂从储液器 210A、211A、212A 以及 213A 中泵送通过端口 42A、43A、44A 和 45A 与样本 3 接触,机器 1 染色定位在基板 2 上的样本 3。多余的流体由通过端口 40A 和 41A 的真空抽吸从样本 3 中去除,并且收集在废物收集器 230 和 231 中。

[0094] 在步骤 514 中,在样本 3 染色后,致动器 30A 使基板臂 10 旋转约  $180^\circ$  (与步骤 506 的旋转相反),以使基板返回至“样本向上”位置。最后,在步骤 516 中,基板移动器 120 将处理过的基板从基板夹持器 20A 中去除。还可以使用其它的打开或“样本向上”位置,条件是操作员或自动化基板移动器可从机器 1 中加载和卸载基板。例如,可使样本向上位置从样本处理位置旋转  $100^\circ$  或更多(例如, $120^\circ$  或更多、 $130^\circ$  或更多、 $140^\circ$  或更多)。在一些实施方案中,可使样本向上位置从样本处理位置旋转小于  $100^\circ$  (例如,小于  $90^\circ$ 、小于  $80^\circ$ 、小于  $70^\circ$ ),条件是操作员或基板移动器可从机器 1 中加载和卸载基板。

[0095] 致动器 30A 和 / 或 30B 可包括电动马达、气动元件、磁系统或其它硬件(例如蜗轮),以使臂 10A 和 / 或 10B 运动。当基板臂 10A 和 10B 处于如图 1 所示的打开位置时,夹持器 20A 和 20B 可各自接收基板 2。一旦被加载到基板夹持器 20A 或 20B 上,致动器 30A 和 / 或 30B 则使臂 10A 和 / 或 10B、以及因此基板 2 从打开(“样本向上”)位置旋转到处理位置(“样本向下”,如图 3A 中对于臂 10B 所示),用于施加固定剂、染剂以及冲洗剂溶液,包括搅拌步骤,并且在处理后回到打开位置用于卸载。

[0096] 参照图 3A,致动器 30B 已使基板臂 10B 从图 1 所示的打开位置旋转至“闭合”或处理位置。图 3A 展示了在基板臂 10B 上的基板 2 已翻转过来,并且已从其图 1 所示的加载位置旋转了约  $180^\circ$  至面朝下的位置,其中在基板 2 上的样本 3 基本上平行于平台 60B 的表面。如与上面图 7A 有关的论述,虽然基板 2 位于在所示的样本处理位置中平台 60B 的近端,但是机器 1 通过若干处理阶段施加各种固定剂、染剂以及冲洗剂至基板 2 上的样本 3,下面将进行更加详细地说明。为了将基板 2 从处理位置去除,致动器 30B 使基板臂 10B 旋转回到图 1(两个臂)和图 3A(仅臂 10A 处于打开位置)所示的打开位置。

[0097] 在某些实施方案中,利用一个或多个的传感器 105A 和 105B 来检测指示器臂 101A 和 101B(如图 1 和 3 所示),控制系统 5 可以检测臂的位置。传感器 105A 和 105B 可以是接近传感器,例如光电传感器,利用例如红外光或各种其它技术(激光器、运动检测器等)来检测臂的存在或不存在。例如,接近传感器 105A 或 105B 可具有检测域,并且所述传感器可确定基板臂(例如臂 10A 和 / 或 10B)或基板夹持器(例如夹持器 20A 和 / 或 20B)是否在检测域内。控制系统 5 可接收来自传感器的信息以确定基板臂 10 的位置。例如,当基板臂 10B(图 3A 中未示出)旋转到处理位置时,在指示器臂 101B 的近端上的接近传感器 105B 感测目标基板夹持器 20B,并且通知控制系统 5 基板臂 10B 旋转至样本处理位置。在该位置,

在指示器臂 101B 的远端上的接近传感器 105B 将不会发送信号至控制系统 5, 因为该传感器没有检测到任何目标 (例如基板臂或基板夹持器)。

[0098] 当基板臂 10B 旋转至打开位置 (如图 1 所示) 时, 在指示器臂 101B 的远端上的接近传感器 105B 感测目标基板夹持器 20B, 并且通知控制系统 5 基板臂 10B 旋转至打开位置。换句话说, 当基板臂 10B 已旋转远离传感器 105B 时, 传感器发送“不存在”信号至控制系统 5。当臂 10B 旋转进入到打开位置时, 臂 10B 更接近传感器 105B, 并且该传感器可发送“存在”信号至控制系统 5。在替代的配置中, 传感器可安装在基板 10B 上, 并且可检测指示器臂 101B 的存在。在一些实施方案中, 控制系统 5 可用于校准致动器 30A 和 30B 的位置至已知的打开和样本处理位置, 和 / 或基于控制信号和 / 或所接收的来自致动器 30A 和 30B 的反馈来主动地监测基板臂 10A 和 10B 的运动和位置。

[0099] 用于图 1 中基板臂 10A 和 10B 的旋转结构与轴线可在本发明的其它实施方案中发生变化。图 8A 展示了流程图 600, 其包括替代的系列步骤, 用于使基板臂从打开位置移动到处理位置。流程图 600 在下面参照图 8B 得到进一步说明, 其展示了机器 1 的示意图。

[0100] 在流程图 600 的步骤 602 中, 基板移动器 120 将基板 2 放置在基板夹持器 20A 上于“样本向上”方位。然后, 在步骤 604 中, 第一致动器 30A 使基板 2 在与图 8B 的平面相垂直的平面上旋转约  $180^\circ$ , 以使得基板 2 保持定向在“样本向上”位置于平台 60A 的上方。在步骤 606 中, 第二致动器 35A 接收定位在“样本向上”位置的基板 2。然后, 在步骤 608 中, 第二致动器 35A (例如位于基板臂 10A 与基板夹持器 20A 之间) 使基板 2 旋转进入到“样本向下”方位。第二致动器 35A 还可以使基板 2 向下朝着平台 60A 移动, 以使得基板 2 接触偏位件 70A 和 70B。

[0101] 接着, 在步骤 610 中, 由于基板 2 处于处理位置, 机器 1 通过施加染剂、固定剂以及冲洗剂溶液对基板 2 上的样本 3 进行染色, 如与流程图 500 有关的步骤 512 上面所述。染色完成后, 第二致动器 35A 使基板 2 从“样本向下”方位旋转至“样本向上”方位 (步骤 614), 然后第一致动器 30A 使基板 2 旋转约  $180^\circ$  (例如在与图 8B 的平面相垂直的平面上, 与在步骤 606 中所应用的旋转相反), 以使得基板保持定向在“样本向上”位置。最后, 在步骤 618 中, 基板移动器 120 将处理过的基板从基板夹持器 20A 中去除。

[0102] 一般地, 机器 1 可包括如图 1-3 所示的一个或更多 (例如, 两个、三个、四个、五个或更多于五个) 的平台 60A 和 60B 用于样本处理。如图 2 所示, 平台 60A 可包括用于支撑平台顶侧的横向侧面。如图 1 和 3 所示, 防护板 100 可位于平台 60A 与 60B 之间, 以防止流体在平台 60 之间飞溅。在一些实施方案中, 防护板 100 可由透明材料形成, 其阻止来自平台 60A 与 60B 中之一的流体污染另一平台。在某些实施方案中, 防护板 100 可由半透明或不透明的材料形成。在图 1 和 3 中, 防护板 100 示出为是由透明材料形成的, 以允许位于防护板 100 后的其它部件在同一幅图中显示出来。防护板 100 还可以示出为是由不透明材料形成的, 在这种情况下, 一些部件如平台 60A 和块 80A 的部分将被遮挡。

[0103] 图 3B 展示了分度机构 50A, 其可用来平移机器 1, 以提供来自基板夹持器 20A、20B 中的每个的基板 2 至用于样本处理的位置。分度机构 50A 可为多种形式, 如机电装置 (例如, 由电动马达驱动的齿条与小齿轮的齿轮组)、线性致动器 (例如, 气动致动器、液压致动器或电磁致动器)。虽然在图示的实施方案中, 分度机构 50A 在两个位置之间线性平移机器 1, 但是基于包括在机器 1 上的平台的数量、以及它们的配置和布局如圆形或半圆形 (例如

可在弧形路径中移动的分度台),其它的平移路径是可能的。如图所示,分度机构 50A 可包括附接于机器 1 的底座 50C 的齿轮齿条 50B 和附接于固定至底座 50C 的电动马达 50E 的小齿轮 50D。机器 1 可使用一个或多个的滑动装置 50F 附接于底座 50C,以使得机器 1 可在由分度机构 50A 平移时平滑地移动。在使用过程中,分度机构 50A 可使机器 1 移动,以使机器 1 的多个基板夹持器 20A 和 / 或 20B 接收来自基板移动器 120 的基板 2(在图 5 中示出),从而置于基板 2 上的样品可由机器 1 制备,而且,一旦制备,基板夹持器 20A 和 / 或 20B 可提供具有制备的样品的基板 2,其可被提供给基板移动器 120 用于样品处理。

[0104] 对于具有两个平台 60A 和 60B 的机器来说,如在图示的实施方案中,基板 2 通常以交替的方式提供给基板移动器 120 并由基板移动器 120 提供。在一些实施方案中,将来自于基板移动器 120 中的第一基板 2 提供给第一基板夹持器 20A 以在第一平台 60A 处理,而机器 1 处于第一位置。虽然第一基板 2 在第一平台 60A 处理,但是分度结构 50A 可将机器 1 平移至第二位置,以使得第二基板夹持器 20B 可以接收来自于基板移动器 120 的第二基板,以在第二平台 60B 处理。虽然第二基板在第二平台 60B 处理,但是分度机构 50A 可将机器 1 平移回第一位置,以使得基板移动器 120 可将第一基板 2 从第一基板夹持器 20A 中去除。一旦基板 2 从第一夹持器平台 20A 中去除,那么可将下一个基板提供给第一夹持器平台 20A。可实施用于将基板提供给替代夹持器平台的该方法用于两个或更多(例如,三个、四个、五个或多于五个)平台,从而增加制备样本的产量用于进一步评估。

[0105] 平台 60A 和 60B 通常由一种或更多种材料形成,这些材料相对于样本处理过程中所使用的流体是相对化学惰性的并且提供合适的表面张力。可用于形成平台 60A 和 60B 的示例性材料包括工程热塑性塑料如聚甲醛(例如,由 DuPont 制造的 **Delrin**<sup>®</sup>)、高分子量碳氟化合物如聚四氟乙烯 (PTFE)(例如,由 DuPont 制造的 **Teflon**<sup>®</sup>),以及金属如铝、钢和钛,条件是对他们制造和 / 或处理以提供合适的表面张力,表面张力起作用以协助均匀地分布和将处理的流体限制在基板 1 与所述平台之间的空间,并且还允许处理流体的合适排出。通过选择合适的材料,平台还可以在流体分布时有利地减少或最小化这些流体内气泡或空间的形成,并且同时维持足够的表面张力使得从平台与基板 2 之间间隔的流体泄漏得以减少或消除。

[0106] 一般而言,可根据需要为了基板处理与流体输送的目的选择平台 60A 和 60B 的面积。一些因素如平台 60A 和 60B 的面积还可以影响基板 2 的所选的面积。例如,在一些实施方案中,平台 60A 的面积(例如,面向基板 2 的平台 60A 的面积)略小于面向平台 60A 的基板 2 的面积。通过维持平台 60A 与基板 2 的面对着的表面面积之间的这样的关系,从表面之间区域的流体泄漏可以得到减少或消除。通常,例如,面向基板 2 的平台 60A 的面积比基板 2 的面积小 2% 或更多(例如,3% 或更多、5% 或更多、7% 或更多、10% 或更多、15% 或更多、20% 或更多、25% 或更多、30% 或更多)。

[0107] 平台 60A 和 60B 可分别附接于块 80A 和 80B。块 80A 包括支撑顶侧 85A 的横向侧面 81A-84A,如图 2 所示。块 80A 和 80B 可由与用于平台的那些材料相同或相似的材料制成,包括金属、陶瓷和 / 或塑料。因此,一些材料如 **Delrin**<sup>®</sup> 可用于形成块 80A 和 80B,特别是在实施样本的 Romanowsky 染色的实施方案中。可用在实施方案中的其它材料包括金属、以及 **Teflon**<sup>®</sup> 牌聚四氟乙烯涂覆的铝、钢或钛。

[0108] 在一些实施方案中,平台 60A 和 / 或 60B 可以抬高,如图 1-3 所示。或者,在某些实施方案中,平台 60A 和 / 或 60B 可以分别与块 80A 和 80B 的上表面齐平 (flush)。在这两种情况下,机器 1 的某些特征以及流体的表面张力和平台或块的表面能量阻止多余的液体流过平台 60A/60B 和 / 或块 80A/80B 的边缘。

[0109] 如图 1 和 2 所示,平台 60A 可包括偏位件 70A-70D 以提供平台 60A 的表面与基板 2 之间的分离,并且防止基板 2 接触平台 60A。平台 60B 可包括对应的一组偏位件 71A-71D。偏位件可包括支架、销、螺钉、杆、珠、壁或其它结构,其提供平台 60A 和 / 或 60B 的表面与基板 2 之间的分离。偏位件 70A-70D 和 71A-71D 确保平台 60A 和 60B 与基板 2 的表面在基板 2 当接触这些偏位件时保持基本平行。保持这两个表面平行的益处是,在这两个表面之间包围的体积因此得到限定并可精确控制。如果这两个表面不基本平行,并且在它们之间的角度发生变化,则在它们之间的体积也发生变化,并且不固定且不被精确控制。另外,如果这样的两个表面不基本平行的话,则流体不可以均匀地施加至样本。

[0110] 如本文所用的,短语“基本平行”是指两个表面精确地平行或接近平行,以使得基板 2 的表面平整度中的缺陷在基板 2 接触所述偏位件时得到减少或消除。例如,虽然在样本生产中给予了大量的关注,但是某些基板可具有缺陷,如扭曲和 / 或不共面的角落。在本文所公开的系统和方法中,偏位件的使用有助于通过改善基板 2 的表面平整度来校正这些缺陷,需要时,在处理中定位基板 2 处于相对于平台 60A 和 60B 是基本平行的关系。短语“基本平行”涵盖这两个表面不完全平坦的情形,但是所述偏位件全都是相同尺寸或高度的,以使得至少基板表面与偏位件的接触点在同一平面上。

[0111] 图 6A 展示了带有样本 3(样本未示出)的基板 2、基板夹持器 20B、块 80A 与 80B、平台 60A 与 60B、偏位件 70A-70D 与 71A-71D、以及基板 2 与平台 60B 之间的间隔 92。间隔 92 允许流体在包含端口 40B-45B 的平台 60B 的表面与包含样本 3 的基板 2 之间行进。所需的用于最佳的样本固定、染色以及冲洗的间隔距离将发生变化,取决于从端口 40B-45B(和 / 或端口 40A-45A)分配的流体的流速、端口直径、处理过程中所施加的流体的粘度、以及可用于将流体从基板、间隔和平台中去除的抽吸量。

[0112] 在一些实施方案中,例如,提供平台 60B 的表面与基板 2 之间约 100-200 微米的间隔 92 的偏位件使得用于包括在实施方案中血细胞的样本的固定、染色和冲洗能够以范围为 70 至 140 微升每秒(例如,90、115 或 125 微升每秒)的流速从具有直径范围为 500 至 1500 微米的直径的端口 40B-45B 分配流体。一般而言,间隔 92 的尺寸和高度对于某些实施方案来说可以变化约 50 微米至 1000 微米(例如,约 50 至 500 微米、约 75 至 250 微米、约 100 至 200 微米),条件是这样的实施方案能够克服来自于间隔中流体的表面张力,同时在样本处理过程中分配和去除流体。另外,在某些实施方案中,位于平台 60A 和 / 或 60B 上的端口的直径可以变化约 125 微米至 5000 微米。

[0113] 图 6B 和 6C 展示了球接头机构 25,其可用于对准基板夹持器 20A 平行于平台 60A。球接头机构 25 可包括刚性地固定至基板夹持器 20A 的球部件 25A、偏转元件 25B(例如弹簧)、刚性连接至基板臂 10A 的下部插座 25C、上部插座 25D、固定至下部插座 25C(例如使用紧固件)的盖 25E,以及紧固螺钉 25F。在一些实施方案中,在机器 1 与基板夹持器 20A 和 / 或 20B 的制造和 / 或装配过程中,可调整球接头机构 25 以补偿可能由于公差叠加或制造问题而存在的任何未对准。为了调整球接头机构 25,在一些实施方案中,紧固螺钉 25F 被松

开,并且使基板臂 10A 运动至闭合位置。由于松开了紧固螺钉 25F,所以同时夹持基板 2 的基板夹持器 20A 能处于基本平行于平台 60A,而基板 2 沿着接触偏位件 70 定位。或者,在一些实施方案中,在平台 60 上的偏位件的数量可以得到减少或完全消除,可在机器 1 结合球接头机构 25 的装配或校准过程中暂时使用带有对应于所需的间隔距离的厚度的垫片,以便以所需的距离设定间隔 92 用于样本处理。虽然松开了球接头机构 25,但偏转元件 25B 施加力以保持基板夹持器 20A 半固定至基板臂 10A,以使得其能够独立地移动,但是其并非那么松散且不能自由移动那么多以干扰机器 1 的其它部件或造成损坏。一旦基板 2 被按压牢固处于闭合位置以使得基板 2 基本平行于平台 60A,则紧固螺钉 25F 就可被拧紧以固定球接头机构 25。如图所示,当拧紧时,紧固螺钉 25F 施加向下的力于上部插座 25D 之上,且因此经由上部插座 25D 施加摩擦力至球部件 25A 的顶部。由于下部插座 25C 固定至盖 25E,所以由紧固螺钉 25F 产生的力也提升下部插座 25C,从而下部插座 25C 施加摩擦力至球部件 25A 的底侧,以限制球部件 25A 于上部与下部插座 25C、25D 之内。一旦限制至球部件 25A,基板夹持器 20A 就变成固定至基板臂 10A。

[0114] 通常,一旦基板夹持器 20A 由紧固螺钉 25F 而被定位和限制,则球接头机构 25 在正常使用过程中不必再次调整。然而,如果基板夹持器 20A 变得未对准且因此球接头机构 25 需要调整(例如由于损坏、机器维修、性能差或其它原因),则可以松开紧固螺钉 25F,基板夹持器 20A 可移动至变化位置以定位,以使得由基板夹持器 20A 夹持的基板基本平行于平台 60A,然后,可拧紧紧固螺钉 25F,以固定球接头机构 25。

[0115] 一般而言,致动器 30A 和 / 或 30B 可配置成调整基板臂 10A 和 / 或 10B 的位置,以改变平台 60A 和 / 或 60B 的表面与基板 2 之间的间隔的范围。改变该间隔提供在允许调整分配至每个端口的流体、流速、流体粘度、以及来自于平台 60A 和 / 或 60B 的排出力的实施方案中的更大的灵活性。例如,100 微米的间隔 92 在从平台 60A 所施加的流体以 70 微升每秒的流速从具有端口直径范围为 500 微米至 1500 微米的端口 40A-45A 分配时可提供足够的样本固定、染色和冲洗。或者,在平台 60A 的表面与基板 2 之间的间隔的距离约为 200 微米,对于从端口 40A-45A 分配的流体来说,可以使用更高的流速如 115-140 微升每秒用于样本处理。

[0116] 如上所述,机器 1 可包含一系列的端口和管,用于分配和去除在样本处理过程中所施加的流体。下面的论述说明各种端口、管、以及与平台 60A 相关的其它元件,而且类似的考虑也适用于平台 60B 及其相关部件。图 2 展示了图 1 所示设备的特写图,并且详细展示了在平台 60A 上的端口 40A-45A 和连接至块 80A 的管 50A-55A。管 52A-55A 分配包括一个或多个的固定剂、染剂和冲洗剂溶液的某些流体穿过平台,进入间隔,并且至基板上。

[0117] 参照图 2,平台 60A 的顶侧包括连接至管 50A-55A 的六个端口 40A-45A。流体由一个或多个泵驱动,通过管和端口至基板 2 上。一个或多个的流体储液器 210A-213A(如第一染剂储液器 211A、第二染剂储液器 212A、固定剂储液器 210A 和冲洗剂溶液储液器 213A),例如如图 4 所示,可引导流体至平台 60A 及基板 2 上。图 1-3 所示的端口 40A-45A 的直径范围为约 500 微米至 1500 微米,虽然直径在某些实施方案中也可能更小或更大。在一些实施方案中,真空端口 40A 和 41A 的直径是流体端口 42A-45A 的直径的两倍以上。

[0118] 端口 40A-45A 中的每个通常专用于一特定的流体或真空源。或者,一个或多个的端口可用于每种流体或真空源,或者来自于各种流体及真空源的多个管可连接至位于平台

60A 上的单一端口。例如, 在一些实施方案中, 在平台 60A 上的仅一个端口可用于废物清除, 但是当使用更多的粘性流体时, 该单一端口不可能提供足够的抽吸以排出来自于该平台的残余流体。因此, 在某些实施方案中, 希望的是在平台上的不同位置提供两个抽吸端口 (例如, 在平台的每个端部有一个抽吸端口), 用于去除过量的染剂、固定剂以及冲洗流体, 如图 2 中带有端口 40A 和 41A 所示。在某些实施方案中, 还突出了流体端口配置的变化, 在平台 60A 上的单一端口可专用于一特定的染剂, 而在其它实施方案中, 多个端口用于在样本处理过程中施加染剂。事实上, 有关端口的数量、端口位置以及分配至每个端口和流体管的流体的各种组合可用在本发明的不同实施方案中。

[0119] 端口 40A-45A 一般可根据需要定位在平台 60A 上, 以用于流体输送至基板 2, 以及流体从基板 2 去除。通常, 流体端口中的每个定位在平台 60A 上, 以使得端口的孔在样本进行处理时不直接定位成相邻于基板 2 上的样本 3 或其下方。由于样本与染剂的某些组合, 例如, 如果染剂从直接位于相邻样本 3 的一部分或在其下方的端口分配时, 则可向那部分中 (端口附近) 的细胞施加比在样本的其它部分中的细胞更多量的染剂。其结果是, 接收更多量染剂的细胞可能会在样本图像中表现更暗, 并且这种非均匀染色的样本细胞可使样本的手动及自动化评估复杂化, 且基于这些图像将误差引入到诊断测量和分析结果中。因此, 输送染剂至样本 3 的流体端口可与载片的含样本的面积间隔开一定的距离, 以改善染色结果。

[0120] 另外, 彼此相对布置的成对端口的使用, 例如多对端口, 也可改善染色的均匀性, 例如, 在一些实施方案中, 两个端口用于将染剂输送至样本 3。这两个端口可位于平台 60A 上, 在与样本 3 的边缘间隔开一定距离 (例如, 偏移) 的位置处, 并且在与平台 60A 的短边缘平行的方向上彼此相对布置。当染剂从这两个间隔开的端口分配时, 相对均一量的染剂沉积在样本 3 的不同区域中的细胞上, 并且改善的染色均匀性在样本图像中被观察到。

[0121] 类似地, 虽然端口 40A-45A 通常可根据需要定位, 以便通过使用一个或多个真空源从基板 2 的表面去除过量的流体, 但是在一些实施方案中, 用于去除流体的端口与在平台 60A 上直接位于基板 2 上的样本 3 内的细胞下方的位置间隔开一定的距离。以这种方式定位废物清除端口 (即, 不直接相对着样本 3 的一部分) 减少了这样的机会, 也就是当致动这种端口以从基板 2 排出流体时, 来自样本 3 的细胞无意中受到损坏或被抽入到流体清除端口中。在某些实施方案中, 由于平台 60A 的长短侧面的长度的不同, 废物清除端口与样本区的边缘间隔开, 并且沿着与平台 60A 的长边缘平行的方向彼此相对布置。

#### [0122] 固定阶段

[0123] 可对流体管 52A-55A 和 52B-55B 进行定位, 以在样本处理过程中将固定剂输送至平台 60A 和 60B、间隔 92、基板 2 以及样本 3。可使用的固定剂包括用于保护生物样品免于腐烂的化学品, 并且这样的固定剂可以阻碍生化反应发生在样本中且增加样本的机械强度和稳定性。可使用各种固定剂, 包括但不限于, 甲醇、乙醇、异丙醇、丙酮、甲醛、戊二醛、EDTA、表面活性剂、金属盐、金属离子、尿素以及氨基化合物。

[0124] 参照图 4, 一个或多个流体管 52A-55A 可连接至在平台 60A 内部的端口和各自的固定剂储液器 210A。这些流体管还可包括至泵 200A 和 / 或阀的连接, 所述阀能引导固定剂从该储液器穿过管和位于平台上的端口, 并且至基板与样本上。作为实例, 泵 200A 可引导固定剂从储液器 210A 穿过管 54A、穿过块 80A、从端口 44A 出来、至平台 60A 上、进入平台 60A

与基板 2 之间的间隔 92 以及至包含样本 3 的基板 2 上。在施加特定量的固定剂至基板 2 之后,真空或其它抽吸源 220A 和 / 或 221A 可将残留固定剂经由一个或多个端口 40A 和 / 或 41A 穿过废物管 50A 和 51A 从平台 60A、间隔 92 以及基板 2 排出进入到废物容器 230A 和 / 或 230A 中。

[0125] 图 9 展示了流程图 700,其包括用于施加固定剂至样本的一系列步骤。在步骤 702 中,泵(例如泵 200A)引导固定剂(例如甲醇)从储液器(例如储液器 210A)进入到固定剂管(例如管 54A)中。在步骤 704 中,引导固定剂进入到连接至块 80A 的端口 44A 中。然后,在步骤 706 中,引导固定剂从平台 60A 中的端口 44A 出来。在步骤 708 中,引导固定剂穿过端口 44A 并进入到基板 2 与平台 60A 之间的间隔 92 中。最后,在步骤 710 中,基板 2 上的样本 3 由固定剂溶液进行固定。

[0126] 在一些实施方案中,泵 200A 引导甲醇以 70 微升每秒的流速穿过管 54A 和端口 44A,至平台 60A 上并进入到间隔 92 中进行四秒的时间。然后,通过使用端口 40A 和 / 或 41A 以及废物管 50A 和 / 或 51A,真空或其它抽吸源 220A 和 / 或 221A 去除存在于间隔 92 中和 / 或平台 60 及基板 2 上的残留甲醇(下面将进一步说明)。接着,泵 200A 可再次引导甲醇以 70 微升每秒的流速穿过管 54A 和端口 44A,并且至平台 60A 上进行四秒的时间,随后是第二流体排出过程。使用相同或不同的固定剂,固定与排出的该过程可再次重复,取决于需要固定的生物样本的类型。此外,机器 1 能够为每个固定阶段改变频率和流速。还可使用其它的流速,其足以克服位于间隔 92 中的流体的任何表面张力且固定样本 3 用于进一步处理和评估。通过调整固定阶段的频率和 / 或流速,机器 1 可使用几种不同的固定剂为各种样本实现最佳的固定。用于不同类型样本的机器指令可以在控制单元 5 中硬连线(hardware)或预编程,并根据需要由系统操作员选择。

[0127] 一般而言,在固定阶段可给样本施加各种各样的固定剂。例如,85%的甲醇可用作固定剂。对于一些染剂来说,可以使用基于乙醇或甲醛固定剂。可用于制备样本的其他固定剂配方已公开于,例如美国临时专利申请号 61/505011 中,其全部内容通过提述并入本文。

#### [0128] 染色阶段

[0129] 机器 1 还包括在一个或多个染色阶段配置成施加一种或多种染料或染剂至固定到基板的样本的管和端口。当染色样本在其于显微镜或其它成像装置下被观察或成像时其增加样本的对比度。可使用 Romanowsky 染剂和 / 或其它染料或染剂,包括苏木精和曙红、荧光素、噻嗪染剂,通过使用抗体、核酸探针、和 / 或金属盐和离子。可用于制备样本的其他染剂配方公开于,例如美国临时专利申请号 61/505011 中。

[0130] 图 10 是流程图 800,其包括用于施加染剂至样本的一系列步骤。在步骤 802 中,泵(例如泵 201A)引导染料或染剂从储液器(例如储液器 211A)进入到染剂管(例如管 52A)中。在步骤 804 中,引导染剂进入到附接至块 80A 的端口(例如端口 42A)中。接着,在步骤 806 中,染剂流出平台 60A 中的端口 42A。在步骤 808 中,染剂流入到基板 2 与平台 60A 之间的间隔 92 中,此后在步骤 810 中对基板 2 上的样本 3 进行染色。

[0131] 在一些实施方案中,可使用多个管和端口给样本 3 施加染剂。例如,第二泵(例如泵 202A)可引导染剂(例如,与从储液器 211A 中所分配的相同染剂或不同染剂)从储液器 212A 穿过管 53A 和端口 43A 至平台 60A 上。在某些实施方案中,两个或多个流体管可连接至共享的染剂储液器或泵和 / 或阀,其用于引导染剂穿过端口至平台上。返回参照图 2,管

52A 可输送红色染剂如荧光染料至平台、基板 2(3) 和样本 3(2)。管 53A 可输送蓝色染剂, 如噻嗪染料。在图 1-6 中, 选择在平台 60A 上的端口的数目、位置和大小以优化染剂至固定到基板的样本的施加。如果选择其它的染剂, 则端口的不同数目、位置和大小可为优选的, 取决于染剂的粘度。

[0132] 端口 40A-45A (和 40B-45B) 中的每个可包括用于接收流体的输入通道和用于输出流体的输出通道。在一些实施方案中, 冲洗剂 45A、固定剂 44A 以及染色端口 42A-43A 的输出通道在平台 60A 的上部表面上, 并且真空端口 40A 和 41A 的输入通道可在平台 60A 的上部表面的相对端上。冲洗剂 45A、固定剂 44A 以及染色端口 42A-43A 的输入通道可位于块 80A 的同一横向侧面 (lateral side), 并且真空端口 40A 和 41A 的输出通道可位于块 80A 的相对的横向侧面。

[0133] 通过举例并参照图 2 和 10, 控制系统 5 在步骤 802 中指示泵 (例如泵 201A) 引导染剂 (例如包括荧光染料的染剂) 从染剂储液器进入到流体管 52A 中。在步骤 804 中, 染剂从流体管进入端口 42A。然后, 在步骤 806 中, 染剂以 140 微升每秒的流速以五秒的时间离开口 42A, 在步骤 808 中, 染剂沉积在平台 60A 与包含样本 3 的基板 2 之间的间隔 92 中。在步骤 810 中, 基板 2 上的样本 3 被染色。染色之后, 使用端口 40A-41A 和废物管 50A-51A, 真空或其它抽吸源 (例如泵 220 和 / 或 221) 然后可排出存在于间隔 92 中、平台 60A 上以及基板 2(3) 上的残留染剂。

[0134] 可对机器 1 进行编程以在延迟 (例如在 3 秒 -10 秒的延迟, 如 5 秒延迟) 之后紧跟着第一染色阶段重复这些染色及排出阶段。第二泵 202A 可由控制系统 5 指示以引导噻嗪染料以 140 微升每秒的流速以例如 3 秒的时间从染剂储液器穿过流体管 53A, 从端口 43A 出来, 至平台 60A 上。通过使用端口 40A-41A 和废物管 50A-51A, 真空或其它抽吸源 (例如泵 220A 和 / 或 221) 然后可排出存在于间隔 92 中和 / 或平台 60A 上和 / 或基板 2 上的残留噻嗪染料。正如固定阶段那样, 机器 1 能够为每个染色阶段改变频率、延迟时间和流速。流速可在例如 70 至 140 微升每秒的范围, 或者可小于或大于该范围的外部界限 (例如 10 至 500 微升每秒), 条件是流速足以克服位于间隔 92 中的流体中存在的任何表面张力并且为预定的评估合意地对样本进行染色。

[0135] 可施加给样本的示例性染剂包括但不限于: Wright-Giemsa 染剂、Giemsa 染剂以及 Romanowsky 染剂。还可以给样本施加其它的试剂如免疫细胞化学试剂或者特定细胞成分的其他标志物。

#### [0136] 废流体去除

[0137] 如上文所提到的, 真空或其它抽吸源 220 和 / 或 221 在固定和染色阶段过程中或在其之间可从基板 2、间隔 92 以及平台 60A 中排出残留的流体。参照图 1, 一个或多个废物管可连接至块 80A 的侧面 82A 和 84A。废物或真空管 50A 和 51A 用于从平台 60A、间隔 92 以及基板 2 中收回流体和小颗粒物进入到废物容器或与机器 1 分开的其它位置。参照图 2, 废物管 51A 和 51B 可连接至分开的真空源 220 和 221、以及在废物管远端的废物容器 230 和 231。或者, 两个或更多废物管可连接至单一的真空源、以及相同的废物容器, 如图 4 所示。废物管 50A 和 50B 可分别延伸穿过夹管阀 90A 和 90B。

[0138] 用于施加抽吸的真空或其它源 (例如真空泵 220 和 / 或 221) 可连接至废物管 50A、50B、51A 和 51B 中的一个或多个, 以从平台 60A 和 / 或 60B、间隔 92 以及基板 2 中吸取流体

进入到废物容器 230 和 231 中。在废物管内所施加的真空力可等于负一至负十磅每平方英寸 (“psi”), 以当基板 2 与平台之间的间隔处于 100 至 200 微米时提供足够的抽吸用于去除流体。一般而言, 如本文所用, “负”压力是指小于机器 1 内或机器 1 周围环境中的环境压力的压力。例如, 在一些实施方案中, 机器 1 周围环境具有的环境空气压力约为一个大气压。“负”压力是指小于该环境空气压力的压力 (例如, 施加给流体的负一 psi 的压力是比施加在流体上的环境空气压力小一 psi 的压力)。可使用范围为负 0.1psi 至负 14psi (例如负 6psi) 或更大的其它真空, 条件是这样的真空足以克服存在于间隔中的流体的任何表面张力并且去除在间隔中以及在基板和样本上的所有残留流体。另外, 紧接在施加真空以从间隔中排出流体之前, 致动器 30A 可将基板 2 的近边缘从样本处理位置提高 15-35 微米的距离。基板 2 与平台 60 之间的该增加的间隔在真空阶段期间可改善间隔 92 中任何残留流体的排出。

[0139] 在一些实施方案中, 控制系统 5 配置成在样本处理过程中改变应用于流体去除的频率和真空。图 11A 包括流程图 900, 其特征为用于从基板中去除多余流体的一系列步骤。在固定阶段之后, 例如, 控制系统 5 可在步骤 902 中打开夹管阀 90A 和 / 或 90C, 并且在废物管 (例如废物管 50A 和 51A) 中以五秒的时间施加负 5psi 的真空。在该时间段, 固定剂通过端口 40A 和 41A 从间隔、基板以及平台去除 (步骤 904)。流体在步骤 906 中行进穿过废物管, 并且在步骤 908 中沉积到一个或多个废物容器 (例如容器 230 和 / 或 231) 中。一旦排出期限届满, 控制系统 5 就可在步骤 910 中指示夹管阀 90A、90C 中的一个或多个关闭废物管 50A 和 / 或 51A, 从而防止由真空 220-221 的进一步排出。控制系统 5 可引导机器 1 在每个固定阶段后重复该流体去除步骤。

[0140] 图 11B 包括流程图 1000, 其展示了用于从基板中去除多余流体的替代系列步骤。在流程图 1000 中的方法没有使用夹管阀密封废物管。相反, 在流体施加阶段之后, 抽吸源 220 和 / 或 221 在步骤 1002 中初始化并且在步骤 1004 中进入活跃状态。抽吸源在废物管 50A 和 / 或 51A 中施加负 3psi 的真空达四秒的时间以在步骤 1006 中从间隔 92、基板 2 以及平台 60A 中去除流体穿过端口 40A 和 41A。排出的流体在步骤 1008 中行进穿过废物管 50A 和 / 或 51A, 并且在步骤 1010 中沉积在一个或多个废物容器 230、231 中。机器 1 可在每个流体施加阶段之后重复该流体清除步骤。通过改变在流体清除步骤中所施加的频率和压力, 机器 1 可实现生物样本的最佳固定、染色以及冲洗。

[0141] 夹管阀 90A、90B、90C 和 90D 关闭废物管 50A、50B、51A 和 51B, 如图 1 所示。夹管阀 90A-90D 可通过包含在阀内或外部的致动器机械地、电气地、液压地或气动地制动。夹管阀 90A-90D 操作以禁止流体流过废物管 50A、50B、51A 和 51B。例如, 当从机器 1 中改变或清空满满的废物容器 230 时, 可为合意的是关闭夹管阀 (90A-90D) 以防止废物管中存在的残留流体的泄漏。可随机器 1 的实施方案使用不同的阀类型或其它机构如夹具或止动件, 以关闭废物管 50A、50B、51A 和 51B。

#### [0142] 冲洗阶段

[0143] 冲洗剂溶液可在样本处理过程中随机器 1 在一个或多个冲洗阶段施加。例如, 可为合意的是, 在固定阶段之间、在染色阶段之间和 / 或在固定与染色阶段之间从基板 2 上的样本 3、间隔 92 以及平台 60A 和 / 或 60B 中去除残留的和 / 或多余的流体。与本系统及方法相容的冲洗剂溶液包括蒸馏水; 缓冲水溶液; 有机溶剂; 和带有或不带有缓冲的水性与

有机溶剂的混合物。可用于制备样本的冲洗剂溶液的其他配方公开于,例如美国临时专利申请号 61/505,011 中。

[0144] 图 12 包括流程图 1100,其特征为用于冲洗样本的一系列步骤。在步骤 1102 中,泵(例如泵 203A)引导冲洗剂溶液(例如包括蒸馏水)从储液器(例如储液器 213A)进入到冲洗管(例如冲洗管 55A)中。在步骤 1104 中,冲洗剂溶液进入连接至块 80A 的端口 45A。在步骤 1106 中,冲洗剂溶液流至平台 60A 上穿过端口 45A 的输出通道,并且在步骤 1108 中,冲洗剂溶液进入基板 2 与平台 60A 之间的间隔 92。在步骤 1110 中,进行样本 3 的冲洗。最后,在步骤 1112 中,真空源 220、221 施加抽吸给废物管 50A 和 51A 中的一个或多个,以将冲洗剂溶液从间隔 92 和基板 2 中去除;冲洗剂溶液被传送至废物容器 230 和 / 或 231。

[0145] 在一些实施方案中,控制系统 5 可引导泵 203A 以例如 70 微升每秒的流速以例如 5 秒的时间施加冲洗剂溶液。正如固定阶段那样,控制系统 5 可改变每个冲洗阶段的持续时间和流速以及冲洗阶段的数量。另外,控制系统 5 可在样本处理过程中调整一个或多个冲洗阶段的布置。例如,控制系统 5 可引导在完成所有固定阶段后冲洗阶段发生一次,并且在完成所有染色阶段后第二冲洗阶段发生一次。或者,冲洗阶段可穿插在两个或更多固定阶段之间或两个或更多染色阶段之间。

#### [0146] 搅拌阶段

[0147] 在某些实施方案中的样本处理可包括一个或多个搅拌阶段,以在固定、染色和 / 或冲洗阶段期间在间隔 92、包含样本 3 的基板 2 以及平台 60A 和 / 或 60B 上分散固定剂、染料和 / 或冲洗剂流体。图 13 包括流程图 1200,其展示了用于搅拌样本的一系列步骤。如图 3A 所示,致动器 30A 和 / 或 30B 可提供微动调整用于改变基板 2 相对于平台 60A 和 / 或 60B 的位置。

[0148] 控制系统 5 可包括软件和 / 或硬件,用于指示致动器 30A 和 / 或 30B 启动搅拌阶段。致动器 30A 和 / 或 30B 可配置成基于来自控制系统的搅拌启动命令使基板臂 20A 和 / 或 20B 上下移动。搅拌阶段可重复预定数目的搅拌周期。如本文所用的术语“搅拌周期”指从起始位置以向上方向运动,然后以与向上方向相反的向下方向移动。在一些实施方案中,一个或多个搅拌周期使基板 2 在每个周期结束或至少在一些周期结束时返回到起始位置。在某些实施方案中,基板 2 在一些或所有搅拌周期的结束时不返回到起始位置,但是每个周期仍包括向上运动,然后是向下运动。致动器 30A 和 / 或 30B 通常继续使基板 2 在一个或多个的搅拌周期中移动,直到停止命令从控制系统 5 发送至致动器。搅拌阶段可暂时增加基板 2 与平台 60A 和 / 或 60B 的表面之间的间隔尺寸(间隔距离),然后使基板返回到样本处理位置。另外,搅拌阶段可包括一系列运动,其使基板 2 在相对于平台 60A 和 / 或 60B 的表面的角位置(angular position)与样本处理位置之间转移。分配到平台与基板 2 之间的间隔中的流体的表面张力当基板于搅拌阶段期间从样本处理位置移动时会导致基板上流体分子的重新分布,并且可有利地改善整个样本的流体分布。

[0149] 其它的方法还可用来使基板 2 在搅拌阶段期间相对于平台移动。例如,在一些实施方案中,偏位件 70A-D 和 / 或 71A-D 中的一个或多个的位置(例如,偏位件在平台 60A 和 / 或 60B 的表面上方延伸的量)可迅速得到调整以搅拌样本 3。在某些实施方案中,可调整平台 60A 和 / 或 60B 的位置以促使样本 3 的搅拌。例如,平台 60A 和 / 或 60B 可交替地上下移动(例如,对应于上述的基板 2 的移动方向)以引起样本 3 的搅拌。

[0150] 在一些实施方案中,样本 3 的搅拌可通过改变致动器 30A 和 / 或 30B 当基板臂由弯曲的材料制成时驱动基板 2 朝向偏位件 70A-D 和 / 或 71A-D 的程度而被影响,如下文所述。应变计 (strain gauge) 可通过检测基板臂中作为时间函数的应变的变化而用来测量和调整施加给基板 2 的搅拌的频率。

[0151] 参照图 13,在第一步骤 1202 中,搅拌阶段开始。在步骤 1204 中,控制系统 5 指示致动器 30A 开始搅拌周期。响应于该指令,致动器 30A 在步骤 1206 中使基板 2 向上旋转,增加基板 2 与平台 60A 之间的距离。然后,在步骤 1208 中,致动器 30A 使基板 2 朝着平台 60A 向下旋转,减少基板与平台 60A 之间的距离。在判断步骤 1210 中,如果搅拌阶段继续,则控制返回到步骤 1204,并且由致动器 30A 的基板 2 的旋转再次出现在另一搅拌周期中。如果搅拌阶段终止,则控制经过步骤 1210 至步骤 1212,其中基板 2 随着搅拌完成返回到其初始位置。

[0152] 搅拌阶段可包括通过致动器 30A 和 / 或 30B 所施加的一个或多个搅拌周期。此外,搅拌阶段可在固定、染色和 / 或冲洗阶段的每个期间且在固定、染色和 / 或冲洗阶段的每个之间以变化的频率发生一次或多次。例如,参照图 3A,致动器 30A 和 / 或 30B 可从样本处理位置垂直提高基板 2 的近边缘 35 微米的距离,并随后使基板 2 三次返回到样本处理位置,在每个固定、染色和冲洗阶段后一次。致动器 30A 和 / 或 30B 可在两秒内完成每个搅拌周期 (例如,一秒用于从样本处理位置垂直提高基板 2 的近边缘 35 微米的距离,一秒用于使基板返回到样本处理位置)。机器 1 能够执行指令以为每个搅拌周期和 / 或阶段改变搅拌频率和距离。例如,搅拌阶段可包括致动器 30A 和 / 或 30B,其从样本处理位置垂直提高基板 2 的近边缘 5 微米的距离,然后使基板返回到样本处理位置,每秒 10 到 20 次。

[0153] 还可使用搅拌距离与频率的替代组合。例如,在一些实施方案中,搅拌距离是 5 微米或更大 (例如,15 微米或更大、25 微米或更大、50 微米或更大、100 微米或更大、150 微米或更大、200 微米或更大、250 微米或更大、300 微米或更大、500 微米或更大、700 微米或更大、1 毫米或更大)。例如,在某些实施方案中,搅拌距离为 35 微米 -350 微米。

[0154] 在一些实施方案中,搅拌周期频率是每秒一个周期或更大 (例如,每秒两个周期或更大、每秒三个周期或更大、每秒四个周期或更大、每秒五个周期或更大、每秒七个周期或更大、每秒十个周期或更大)。

[0155] 还可使用其他搅拌技术。例如,在一些实施方案中,基板夹持器 20A 和 / 或 20B 可包括致动器,其使基板绕着与图 1 和 3 中所示的致动器 30A 和 / 或 30B 的旋转轴线相垂直的轴线旋转。

[0156] 或者,平台 60A 和 / 或 60B 可配备有偏位件调节器,用于在固定、染色和冲洗阶段期间升高或降低一个或多个的偏位件 70A-D 和 / 或 71A-D。为了实施所述偏位件调节器,平台 60A 和 / 或 60B 可包括附接于平台中内部板的偏位件。可使用内部致动器来改变该板的高度,因此改变偏位件的高度。或者,可通过指示该致动器使平台 60A 和 / 或 60B 或者块 80A 和 / 或 80B 运动来改变相对于基板 2 的偏位件 70A-D 与 71A-D 的位置,从而在搅拌阶段期间改变间隔距离。在样本制备过程中使用与常规的染色和制备技术相比显著较少的流体体积,控制系统 5 可调节流体循环的频率、流速、偏位件高度、间隔距离、以及搅拌参数与频率,以更有效地处理样本。

[0157] 在一些实施方案中,基板臂可由弯曲的材料制成,以使得如果处于样本处理位置

的基板仅靠着从平台延伸的两个偏位件,则致动器或其它动力元件可使载片进一步朝向平台表面旋转,直到载片抵靠所有四个偏位件。改变在这两个位置之间的基板的位置可在样本处理过程中实现充分搅拌。基板臂可包括应变计以监控基板臂中的应变,并且可用于将相对于平台偏位件的基板的位置通知控制系统5。另外,该控制系统可包括对应于基板厚度缺陷的信息,当基板置于样本处理位置时或在搅拌阶段期该控制系统可负责。

[0158] 在一些实施方案中,本文公开的搅拌步骤的一些或全部可相对平台 60A/60B 和/或偏位件 70A-D/71A-D 不移动基板 2。也就是说,可搅拌和更新已引进基板 2 上的样本和平台间的流体而不移动基板或平台,例如,当所述平台和基板保持彼此间平行时或几乎平行时。在一些实施方案中,为确保新鲜的流体与基板上尽可能多的样本细胞接触,可通过使用本文公开的泵搅拌或更新所述流体(例如泵 200A/B 和/或 201A/B 和/或 202A/B 和/或 203A/B)以在闭合位置将流体引进基板 2 和平台 60A/60B 间的间隙,然后一旦所述间隙被填充,为将额外小体积的流体例如与最初引进的体积相同或更小的体积从一个或多个流体入口或平台 60A/B 一端处的递送端口引入所述间隙,使得一些或全部最初的流体被推出间隙且新的流体占据其在间隙中的位置。该过程可重复多次(例如 2 次、3 次、4 次、5 次或多于 5 次)。

[0159] 在一些实施方案中,可用流体的持续或脉动流穿过所述样本(例如在基板 2 上)和所述平台,和/或用贯穿样本和平台移动的流体的重复的流循环制备样品,而不是搅拌已分配进入所述间隙或所述基板和平台的间隔中的流体。例如,流体可通过一个或多个流体入口或位于所述平台末端的递送端口分配进入所述间隙和间隔。同时或短一段时间后,可将真空应用至一个或多个真空端口(例如端口 220 和/或 221)或至位于相反末端(相比入口端口)和/或在平台 60A/B 的侧面处的真空槽。同时的分配和真空作用可产生穿过基板的样本区域和平台的流体的持续或脉动(有节奏或无节奏)流。以流体分配流动速率和从真空源流体撤出速率适当平衡,可控制或变化流体流以实现合意的样本固定、染色和/或冲洗。

[0160] 对于多种实施方案的分配流速可为约 20 至约 250 微升每秒,且所述真空可为约 1psi 至约 10psi 的负压。作为持续流制备的替换,所述流体分配和流体撤出步骤可交错进行以产生连续的流动循环(例如 2 循环、3 循环、4 循环、5 循环或多于 5 循环),每一循环包括流体分配和撤出步骤以对样本固定、染色或冲洗。在本文的任何实施方案中,包括前文的实施方案,平台 60A/B 可具有从流体分配入口末端稍微向下倾斜至位于平台反面末端的真空端口,使得重力辅助流体流过平台。所述倾斜可为约 2、3、4 或 5 度或更多至约 45 度或更多,例如约 10、15、20、25、30、35、40 或 45 度的角度。

#### [0161] 干燥阶段

[0162] 在某些实施方案中,控制系统 5 可使用附接于机器 1 的干燥器 4 来干燥样本。图 14 包括流程图 1300,其特征为用于干燥样本的一系列步骤。在初始步骤 1302 中,验证染色及其它阶段(例如,一个或多个冲洗阶段)的完成,在该步骤后,在步骤 1304 中,干燥器 4 引导空气流穿过样本。在步骤 1306 中,干燥过程继续,直到从控制单元中接收到信号以停止干燥。当信号被接收时,干燥器停止空气流穿过样本,并且干燥阶段在步骤 1308 终止。

[0163] 一般而言,可以控制机器 1,以改变空气的温度、流速、所施加的空气流的持续时间、以及样本处理过程中用于干燥样本 3 的阶段(数)。例如,在完成染色阶段后,干燥器 4

可引导空气流在约 120° F 以 10 升每分钟的速度以 7 秒的时间穿过样本。还可使用其它的空气温度（例如，环境温度多至 120° F）、空气流速（例如，一升每分钟至 100 升每分钟）、以及空气流动时间（例如，从几秒钟到几分钟）。

#### [0164] 样本检查系统

[0165] 本文所公开的自动化样本制备机器和设备，包括机器 1，通常可与较大的样本检查系统一起使用和 / 或并入其中，如在美国专利申请公开第 2009/0269799 号中所描述的那些，其全部内容通过提述并入本文。例如，图 15 展示了示意图，其展示了样本检查系统 2000 的一个可能的实施方案。系统 2000 包括平台 2100、光接受装置 2200、计算机 2300、施用器 2400、气体循环装置 2500、光源 2600、分配器 2800、放电装置 2900、载片贴标机 3000 以及载片标签阅读器 3100。推进器 2110 可配置成接收一个或多个载片或其它基板 2700。推进器 2110 可附接于平台的表面，如顶表面 2101。推进器 2110 可采取带的形式，并且该系统可使用机械臂、重力、磁力、液压系统、齿轮或其它运动技术，以使安装在基板上的样本沿着平台的表面 2101 移动。

[0166] 平台 2100 还可包括进给器 2102 和收集器 2106，分别用于从堆栈或架进给基板 2700（例如载片）或者将其收集至堆栈或架。进给器 2102 可配备有进给器推进机构 2103（如涂胶轮），用于将样本推至推进器 2110 上。或者，可使用机械臂来抓住基板 2700 并直接将基板放置在推进器上。可使用替代的机构将基板推出进给器 2102，如磁体或液压系统。该进给器可包括传感器，用于确定存在多少载片。该传感器可测量基板 2700 的重量，例如以确定存在多少基板。收集器 2106 还可包括传感器，用于确定存在多少基板。该传感器可配置成当已分析预设数量的样本时通知计算机 2300，和 / 或在持续的基础上通知计算机安装在基板上的样本的接收。

[0167] 光接收装置 2200 可为显微镜（如明视场显微镜）、摄影机、照相机或接收光的其它光学装置。包括标准明视场显微镜的实施方案还可包括自动化镜台（例如基板移动器 2201）和自动化对焦。在一些实施方案中，显微镜可附接于电动镜台和聚焦电机附件。显微镜可具有电动换镜器，用于在计算机 2300 的控制下允许选择不同的放大倍率透镜。可采用过滤器轮，以使得计算机 2300 能够在光路中自动地选择窄带滤色器。可采用 LED 照明代替过滤器，并且与过滤器轮旋转所需的时间相比，LED 的使用可减少图像采集时间。例如，1600X1200 像素的 FireWire®（IEEE1394 High Performance Serial Bus）摄像头可用来获取窄带图像。

[0168] 在一些实施方案中，光接收装置 2200 接收从基板 2700 反射的光并存储由反射光形成的一个或多个图像。或者，或另外，在一些实施方案中，来自基板上样本的荧光发射可由光接收装置 2200 检测。

[0169] 在某些实施方案中，光接收装置 2200 配置成获取基板上样本的透射图像。例如，光发射源 2600 可定位在平台的下方，并且可以引导光，以使其通过平台 2100 和基板 2700 进入到光接收装置 2200 中。

[0170] 光接收装置 2200 和图 15 中所示的任何其它部件可以通过连接 (link) (2011-2014) 与计算机 2300 连接，所述连接可提供能量给部件、提供来自计算机 2300 的指令给部件和 / 或允许部件发送信息到计算机 2300。连接 2011-2014 可以是有线连接或无线连接。

[0171] 光接收装置 2200 可为能 X、Y 和 Z 轴向移动（在其它实施方案中，电动镜台或基板移动器 2201 可提供 X、Y 和 Z 移动）。光接收装置 2200 可包括摇摄、倾斜和 / 或运动致动器，以使计算机 2300 能够使光接收装置 2200 定位在适当的位置。光接收装置 2200 可包括聚焦入射光的透镜 2210。

[0172] 可选择光接收装置 2200 以捕捉黑色和白色和 / 或彩色图像。在一些实施方案中，两个或更多的光接收装置可用来划分与捕捉图像相关联的处理时间。例如，低倍率成像站后可以为高倍率成像站。类似地，在一些实施方案中，系统 2000、平台 2100、计算机 2300 和 / 或光接收装置 2200 可引导基板移动器 2201 使基板 2700 移动，以确保捕捉和存储所有或大多数细胞的一个或多个图像于基板上或基板的特定部分上。

[0173] 计算机 2300 可为笔记本电脑、服务器、工作站或任何其它类型的计算装置。该计算机可包括处理器、显示器 2320、接口 2310、以及内部存储器和 / 或磁盘驱动器。计算机 2300 还可包括存储在存储器中或计算机可读有形介质如光盘驱动器上的软件。该软件可包括指令，用于引起计算机操作光接收装置 2200、施用器 2400、气体循环装置 2500、平台 2100、推进器 2110、光源 2600、分配器 2450 和 / 或 2800、样本制备机器 1、或者在这些部件之一内或与之连接的任何部件。类似地，计算机被布置成接收来自任何这些部件的信息。

[0174] 例如，该软件可控制从进给器 2102 的基板的分散率，并且进给器 2102 可通知计算机关于存在的基板的数量。另外，计算机 2300 还可负责执行由光接收装置 2200 捕捉的图像的分析。通过该分析过程，计算机可布置且控制成计算特定体积的血液中特定类型细胞的数目，例如对于血液来说，红细胞、白细胞以及血小板计数，并且可以计算全血计数的其它测量的和衍生的组分如：血红蛋白含量、红血细胞形态或白血细胞分类计数。图像分析软件可分析每个个体视野并合计总的红细胞和白细胞计数。为了计算患者血液样品中每微升的总计数，在载片上计数的数目可乘以子样品的体积和稀释比。来自载片的红血细胞与白血细胞的计数、形态测量以及图像的结果可显示在显示器 2320 上。

[0175] 在一些实施方案中，使用在监视器上显示的血细胞的图像，计算机 2300 配置成显示数字数据、细胞种群直方图、散点图以及细胞形态的直接评估。显示细胞形态的能力向系统 2000 的用户提供快速建立细胞形态中可确保制备额外的载片用于由有经验的技师或其它专业人员人工检查异常存在或不存在的的功能。软件还可向计算机提供指令以显示从所述光接收装置接收的图像 2331，或可引起显示器 2330 显示图像的分析的结果 2332（例如，可能是图表或图形）。类似地，可控制计算机 2300 以计数特定血液体积中特定类型细胞的数目，或者计数特定血液体积中受损细胞、癌细胞或裂解细胞的数目。该软件使计算机能够执行分析过程。计算机在分析过程中可使用一个或多个放大倍数 (magnification)。

[0176] 虽然示为一个部件，但是计算机 2300 可包括多台计算机；第一计算机可用于控制系统 2000 的部件，第二计算机可用于处理来自光接收装置 2200 的图像。多个计算机可连接在一起以允许计算机分享信息。计算机 2300 还可连接至网络或实验室信息系统，以允许计算机发送和接收信息至其它计算机。

[0177] 在某些实施方案中，施用器 2400 可包括注射器、手动或马达驱动的移液器、或通过管附接于移液尖的马达控制的泵。施用器 2400 以控制的方式向基板 2700 施加样本。使用施用器 2400 的示例性特征、属性以及方法公开于，例如美国专利申请公开号 US2009/0269799 中。样本可包括一个或多个血液组分、细胞、组织或其它生物组分。

[0178] 一旦样本施加到基板 2700 上,所施加的样本通过使用机器 1 进行处理。如本文所述,机器 1 的功能表现为施加一种或多种染剂、固定剂和 / 或其它溶液至基板上的样本。

[0179] 在一些实施方案中,通过从施用器 2400 的前端放下非接触行的细胞,系统 2000 可配置成实现沉积在基板 2700 上的细胞之间的最小重叠。增加稀释流体的粘度或者稀释剂的类型或量可影响来自施用器的样本流的最终固定位置的宽度。通过选择行之间的距离以允许血液样品中的典型变化,所有细胞可在所有样品中计数。

[0180] 气体运动装置 2500 可为分离的装置,如图 15 所示,或者如前文所述,可以并入机器 1 中,该装置可包括风扇和 / 或可包括其它气体运动装置,例如如压缩机或风箱。气体运动装置 2500 可直接连接至计算机 2300,或者可通过另一部件连接,如平台 2100 或施用器 2400。气体运动装置推动气体(在一些情况下是大气中的空气)穿过基板,以控制基板上物质干燥的速度。使太多的空气太快(即,过高的风扇转速)地运动穿过基板可引起样本中的细胞由于快速干燥而爆裂,而使太少的空气太慢(即,过低的风扇转速)地运动穿过样本可引起细胞干燥得太慢且出现收缩。

[0181] 基于气体运动装置距离基板的距离、分析的流体的类型、流动的宽度、气体(例如空气)的温度以及流的平均厚度,计算机 2300 可选择和控制在一段时间内运动穿过基板的空气量(即,立方英尺或立方厘米的空气每秒)。可定位气体运动装置 2500 以使该装置引导气体,从而气体以  $30^{\circ}$  -  $60^{\circ}$  (例如  $45^{\circ}$ ) 的角度撞击基板约 15 至 20 秒的时间。在一些实施方案中,计算机 2300 可控制系统附近的湿度和温度设定,以允许干燥过程发生,而不使用气体运动装置 2500。

[0182] 光发射装置 2600 以及其中的各种部件通过举例描述于美国专利申请公开号 US2009/0269799 中。多种波长的光可由光发射装置 2600 产生并且由光接收装置 2200 检测。例如,波长如 415nm 对于获取用于评估 RBC 形态和血红蛋白含量的仅血红蛋白图像是有用的。以 600nm 发射的光可用于提供血小板和核的高对比度图像。可选择其它波长以最佳辨别嗜碱白细胞、单核细胞、淋巴细胞(所有蓝色阴影)、嗜曙红细胞(红色)以及嗜中性细胞(中性色)的颜色。

## 实施例

[0183] 通过以下实施例进一步描述本公开,所述实施例并非意欲限制权利要求中所记载的发明的范围。

### [0184] 实施例 1

[0185] 图 16 是流程图 1400,其展示了用于处理安装在基板上的样本的一系列例示性步骤。可使用流程图 1400 中的步骤来制备生物样本用于检查。虽然该过程的说明有时指具有特定范围的特定步骤,和 / 或公开以特定顺序发生的步骤,但是该说明仅意欲作为非限制性的实例。参照图 16,机器 1 连接至控制系统 5,用于在处理步骤过程中指挥多种机器部件的操作。在样本初始步骤中,将包括来自血液的等分试样中的红血细胞、白血细胞、以及血小板的生物样本 3 施加至由玻璃显微镜载片组成的基板 2。这可通过使用不同的站执行,如在共同未决的美国专利申请公开号 2008/0102006 中所述的一个或多个站。在定位步骤 1402 中,将包含样本 3 的基板 2 加载到如图 1 所示的基板臂 10A 的基板夹持器 20A 上。控制系统 5 指示抽吸源 222(步骤 1404)排来自基板夹持器 20A 的空气。通过抽吸端口 21

和 22 所施加的抽吸（步骤 1406）在样本处理过程中将基板 2 附着至基板夹持器 20A。控制系统 5 指示（步骤 1408）致动器 30A 使基板 2 从图 1 所示的打开位置旋转至图 3A 所示的样本处理位置。在所述样本处理位置，样本 3 面对着平台 60A 的表面，而基板 2 依靠着图 2 所示的偏位件 70A-D。所述偏位件防止基板 2 与平台 60A 的表面接触。在该实施例过程中，基板 2 的包含样本的表面与平台 60A 的表面之间的间隔 92 约为 100 微米。

[0186] 在固定阶段（步骤 1412，也参照图 10）期间，泵在步骤 1414 中施加固定剂至样本 3。连接至图 2 所示的流体管 54A 的泵 200A 推动包括甲醇的固定剂从固定剂储液器 210 穿过管 54A、从端口 44A 出来、至平台 60A 上、至包含样本 3 的基板 2 上、以及进入到平台 60A 与基板 2 之间的间隔 92 中。泵 200A 以 70 微升每秒的流速从端口 44A 推动甲醇两秒的时间 T1，从而引导总共 140 微升的甲醇 V1 至包含样本 3 的基板 2 上。

[0187] 接着，在第一搅拌步骤 1416 中，控制系统 5 通过引导致动器 30A（步骤 1418）从样本处理位置垂直地升高基板 2 的近边缘 35 微米的距离并且使基板返回到其样本处理位置来搅拌基板。机器 1 将该搅拌步骤再重复四次。机器 1 在如图 17 所示的约十秒的时间 T2 完成五个搅拌运动。在搅拌之后，控制系统启动真空或排出步骤 1420。施加负五 psi 的真空力一秒半 T3，经由端口 40A 和 41A 以及废物管 50A 和 51A 排出存在于间隔中、平台上或基板上的任何残余甲醇（步骤 1422）。将排出的甲醇收集在废物容器 230 和 / 或 231 中。

[0188] 固定阶段后，控制系统 5 启动（步骤 1424）第一染色阶段。在此情况下，控制系统 5 引导机器 1 对样本进行染色（步骤 1426）。参照图 2 以及图 11 的流程图，连接至流体管 52A 的泵 201 推动荧光素染料从染剂储液器 211A、出端口 42、至平台 60A 上、至包含样本 3 的基板 2 上以及进入到平台 60A 与基板 2 之间的间隔 92 中。泵 201 以 70 微升每秒的流速以两秒的时间 T4 分配荧光素染料通过端口 42A，从而引导 140 微升的染料 V2 至基板上。

[0189] 在施加荧光素染料至样本 3 后，机器 1 通过引导致动器 30A 在步骤 1430 中从样本处理位置垂直地升高基板 2 的近边缘 35 微米的距离且然后使基板返回到其样本处理位置来执行第二搅拌步骤 1428。控制系统 5 引起机器 1 将该搅拌步骤再重复两次且在如图 17 所示约六秒的时间 T5 完成三个搅拌。

[0190] 接着，在步骤 1432 中启动第二真空或排出阶段。在步骤 1434 中，施加负五 psi 的真空三秒 T6，以经由端口 40A 和 / 或 41A 以及废物管 50A 和 51A 排出存在于间隔 92 中或平台和基板上的任何残余荧光素染料。被排出的荧光素染料收集在废物容器 230A 和 / 或 231A 中。

[0191] 在用荧光素染料对样本进行染色之后，机器 1 使用噻嗪染料在步骤 1436 中启动第二染色阶段。连接至流体管 53A 的泵 202 推动噻嗪染料从染剂储液器通过端口 43A、至平台 60A 上、至基板 2 上以及进入到平台 60A 与基板 2 之间的间隔 92 中（步骤 1438）。机器 1 以 70 微升每秒的流速以两秒的时间 T7，分配噻嗪染料通过端口 43A，从而引导总共 140 微升的噻嗪染料 V3 至基板上。

[0192] 在施加染料至样本 3 后，机器 1 通过引导致动器 30A 从样本处理位置升高基板 2 的近边缘（步骤 1442）35 微米的距离且然后使包含样本 3 的基板返回到其样本处理位置在步骤 1440 中启动第三搅拌阶段。机器 1 将该搅拌步骤再重复三次。机器在约八秒的时间 T8 完成四个搅拌运动。

[0193] 然后启动第三真空或排出步骤 1444。施加负五 psi 的真空两秒 T9 以在步骤 1446

中在搅拌之后经由端口 40A 和 / 或 41A 以及废物管 50A 和 / 或 51A 排出存在于间隔中或平台 60A 和基板 2 上的残余噻嗪染料。将排出的噻嗪染料收集在废物容器 230A 和 / 或 231A 中。

[0194] 机器 1 然后执行两个冲洗 - 搅拌 - 真空阶段顺序。当控制系统 5 指示机器 1 启动第一冲洗阶段时, 第一顺序阶段在步骤 1448 中启动。包含蒸馏水的冲洗剂溶液的储液器 213A 连接至泵 203 和流体管 55A。泵 203 引导蒸馏水通过进料入端口 45A 的清洗管 55A, 进入到间隔 92 中, 以及至平台 60A 和基板 2 上, 以在步骤 1450 中冲洗样本 3。或者, 在一些实施例中, 引导清洗流体穿过两个或更多的流体端口 42A 至 45A。泵 203 以 70 微升每秒的流速以两秒 T10 引导蒸馏水出端口 45A, 从而引导总共 140 微升 V4 的水至包含样本的基板上。

[0195] 接着, 控制系统 5 在步骤 1452 中启动第四搅拌阶段, 引导致动器 30A (步骤 1454) 从样本处理位置垂直地升高基板 2 的近边缘 35 微米的距离并且使基板返回到其样本处理位置。控制系统 5 可引导机器 1 重复该搅拌步骤, 并且以约四秒 T11 完成两个搅拌。

[0196] 然后, 在步骤 1456 中启动真空或排出阶段。在步骤 1458 中施加的五 psi 的真空五秒半 T12 在搅拌之后经由端口 40A 和 / 或 41A 以及废物管 50A 和 / 或 51A 排出存在于间隔 92 中或平台 60A 和基板 2 上的残余蒸馏水。

[0197] 此后, 在步骤 1460 中, 控制系统 5 引导机器 1 通过启动第二冲洗阶段开始第二冲洗 - 搅拌 - 真空阶段顺序。第二冲洗阶段 (步骤 1460、1462)、第五搅拌阶段 (步骤 1464、1466) 以及第五真空阶段 (步骤 1468、1470) 以与上文所披露的用于第一冲洗 - 搅拌 - 真空阶段相同的方式执行。在第二冲洗 - 搅拌 - 真空阶段期间, 清洗流体的量 V5 和处理时间 T13、T14 以及 T15 通常与在第一冲洗 - 搅拌 - 真空阶段顺序中是相同的。

[0198] 在样本已固定、利用荧光素与噻嗪染料进行染色、以及冲洗之后, 机器 1 在步骤 1472 中启动干燥阶段。干燥器 4 引导约 120° 的空气流以 10 升每分钟的流速 (步骤 1474) 以八秒的时间 T16 穿过样本。

[0199] 在这些步骤完成之后, 基板 2 在步骤 1476 中返回到其初始位置。在该步骤, 致动器 30A 使基板 2 从样本处理位置旋转至如图 1 所示的打开位置。基板 2 然后可由基板移动器去除, 并且可加载新基板用于处理新样本。

#### [0200] 实施例 2

[0201] 可在本发明如下的其它实施例中调整上述用于实施例 1 的处理步骤。另外, 美国临时专利申请号 61/505, 011 中所公开的固定剂、染剂、以及冲洗剂溶液配方可用于下面实施例的处理步骤中。

[0202] 在第一固定阶段 (步骤 1412, 同样参照图 10) 期间, 泵在步骤 1414 中施加固定剂溶液至样本 3。连接至图 2 所示的流体管 54A 的泵 200A 推动包括甲醇的固定剂溶液从固定剂储液器 210 穿过管 54A、出端口 44A、至平台 60A 上、至基板 2 上、以及进入到平台 60A 与基板 2 之间的间隔 92 中。泵 200A 以 115 微升每秒的流速以两秒时间 T1 从端口 44A 推动固定剂溶液, 从而引导总共 230 微升的固定剂溶液 V1 至基板 2 上。

[0203] 接着, 在第一搅拌步骤 1416 中, 控制系统 5 通过引导致动器 30A (步骤 1418) 从样本处理位置竖直地升高基板 2 的近边缘 35 微米的距离并且使基板返回到其样本处理位置来搅拌基板。机器 1 将该搅拌步骤再重复五次。机器 1 在约 12 秒内完成六个搅拌运动。在

搅拌之后,控制系统启动真空步骤 1420。施加负六 psi 的真空力一秒半 T3,经由端口 40A 和 41A 以及废物管 50A 和 51A 排出存在于间隔中、平台上或基板上的任何残余固定剂溶液(步骤 1422)。排出的固定剂溶液收集在废物容器 230 和 / 或 231 中。

[0204] 此后,在包括第二搅拌步骤的第二固定阶段,重复第一固定阶段的前述步骤与第一搅拌步骤。

[0205] 固定阶段后,控制系统 5 启动(步骤 1424)第一染色阶段。在此情况下,控制系统 5 引导机器 1 对样本进行染色(步骤 1426)。参照图 2 以及图 11 的流程图,连接至流体管 52A 的泵 201 推动包括曙红 Y 的第一染剂溶液从染剂储液器 211A、出端口 42、至平台 60A 上、至包括样本 3 的基板 2 上以及进入到平台 60A 与基板 2 之间的间隔 92 中。泵 201 以 115 微升每秒的流速以两秒的时间 T4 分配第一染剂溶液通过端口 42A,从而引导 230 微升的第一染剂溶液 V2 至基板上。

[0206] 在施加第一染剂溶液至样本 3 后,机器 1 通过引导致动器 30A 在步骤 1430 中从样本处理位置竖直地升高基板 2 的近边缘 35 微米的距离且然后使基板返回到其样本处理位置来执行第二搅拌步骤 1428。控制系统 5 引起机器 1 将该搅拌步骤再重复两次且在约六秒 T5 的时间完成三个搅拌,如图 17 所示。

[0207] 接着,在步骤 1432 中启动第二真空阶段。在步骤 1434 中,施加负五 psi 的真空三秒 T6 以经由端口 40A 和 / 或 41A 以及废物管 50A 和 51A 排出存在于间隔 92 中或平台和基板上的任何残余第一染剂溶液。排出的第一染剂溶液收集在废物容器 230A 和 / 或 231A 中。

[0208] 在用包括曙红 Y 的第一染剂溶液对样本进行染色之后,机器 1 使用包括天青 B 和亚甲基蓝的第二染剂溶液在步骤 1436 中启动第二染色阶段。连接至流体管 53A 的泵 202 推动第二染剂溶液从染剂储液器通过端口 43A、至平台 60A 上、至基板 2 上以及进入到平台 60A 与基板 2 之间的间隔 92 中(步骤 1438)。机器 1 以 115 微升每秒的流速以两秒的时间 T7 分配第二染剂溶液通过端口 43A,从而引导总共 230 微升的第二染剂溶液 V3 至基板上。

[0209] 在施加染剂至样本 3 后,机器 1 通过引导致动器 30A 从样本处理位置升高基板 2 的近边缘(步骤 1442)35 微米的距离并且然后使样本 3 返回到其样本处理位置在步骤 1440 中启动第三搅拌阶段。机器 1 将该搅拌步骤再重复两次。机器以约 6 秒的时间 T8 完成三个搅拌运动。

[0210] 然后启动第三真空步骤 1444。施加负六 psi 的真空两秒 T9 以在步骤 1446 中搅拌之后经由端口 40A 和 / 或 41A 以及废物管 50A 和 / 或 51A 排出存在于间隔中或平台 60A 上和基板 2 上的残余第二染剂溶液。排出的第二染剂溶液收集在废物容器 230A 和 / 或 231A 中。

[0211] 机器 1 然后执行两个冲洗 - 搅拌 - 真空阶段顺序。当控制系统 5 指示机器 1 启动第一冲洗阶段时,第一顺序阶段在步骤 1448 中启动。包含冲洗剂溶液的储液器 213A 连接至泵 203 和流体管 55A。泵 203 引导冲洗剂溶液通过进料入端口 45A 的清洗管 55A 进入到间隔 92 中以及至平台 60A 和基板 2 上以在步骤 1450 中冲洗样本 3。或者,在一些实施例中,引导冲洗剂溶液穿过两个或更多的流体端口 42A 至 45A。泵 203 以 115 微升每秒的流速以两秒 T10 引导冲洗剂溶液出端口 45A,从而引导总共 230 微升 V4 的水至基板上。

[0212] 接着,控制系统 5 在步骤 1452 中启动第四搅拌阶段,引导致动器 30A(步骤 1454)从样本处理位置竖直地升高基板 2 的近边缘 35 微米的距离并且使基板返回到其样本处理

位置。控制系统 5 然后引导机器 1 将该搅拌步骤再重复三次,并且以约八秒 T11 完成四个搅拌。

[0213] 然后,在步骤 1456 中启动真空阶段。在步骤 1458 中,施加五 psi 的真空五秒半 T12,在搅拌之后经由端口 40A 和 / 或 41A 以及废物管 50A 和 / 或 51A 排出存在于间隔 92 中或平台 60A 和基板 2 上的残余冲洗剂溶液。

[0214] 此后,在步骤 1460 中,控制系统 5 引导机器 1 通过启动第二冲洗阶段开始第二冲洗-搅拌-真空阶段顺序。第二冲洗阶段(步骤 1460、1462)、包括在约 12 秒内完成的六个搅拌的第五搅拌阶段、以及第五真空阶段(步骤 1468、1470) 以与上文所披露的用于第一冲洗-搅拌-真空阶段相同的方式执行。在第二冲洗-搅拌-真空阶段期间,冲洗剂溶液的量 V5 和处理时间 T13、T14 以及 T15 通常与在第一冲洗-搅拌-真空阶段顺序中是相同的。另外,紧接真空阶段之前,致动器 30A 将基板 2 的近边缘从样本处理位置提高 15-35 微米的距离。基板 2 与平台 60 之间的该增加的间隔在最终真空阶段期间改善间隔 92 中任何残留流体的排出。

[0215] 在样本已固定、用包含曙红 Y 的第一染剂溶液与包含天青 B 和亚甲基蓝的第二染剂溶液进行染色、以及冲洗之后,机器 1 在步骤 1472 中启动干燥阶段。干燥器 4 引导约 120° 的空气流以 10 升每分钟的流速(步骤 1474) 以八秒的时间 T16 穿过样本。

[0216] 在这些步骤完成之后,基板 2 在步骤 1476 中返回到其初始位置。在该步骤,致动器 30A 使基板 2 从样本处理位置旋转至如图 7 所示的打开位置。基板 2 然后可由基板移动器去除,并且可加载新基板用于处理新样本。

[0217] 如上述的实施例样本处理过程步骤中所示,通过与包括自动与手动样本制备技术的常规样本处理方法相比消耗更少的试剂,本文公开的系统和方法提供更有效的样本处理。参照实施例 2,机器 1 在例示性处理步骤过程中消耗少于 1.5 毫升的试剂用于固定、染色以及冲洗样本(例如,460 微升的固定剂溶液+230 微升的第一染剂溶液+230 微升的第二染剂溶液+460 微升的冲洗剂溶液= 1380 微升的试剂)。在一些实施方案中,可在样本处理过程中使用多于或少于 1380 微升的流体。例如,在样本处理过程中使用的流体量可为约 1150 微升(例如,通过消除冲洗阶段中的一个)或少于 1000 微升(例如,通过进一步消除固定阶段中的一个)。

[0218] 相对于图 17,对于实施例 1 来说,机器 1 在例示性处理步骤过程中消耗少于一毫升的试剂用于固定、染色以及冲洗样本(例如,140 微升的甲醇固定剂+140 微升的荧光素染料+140 微升的噻嗪染料+280 微升的冲洗剂溶液= 700 微升的试剂)。在一些实施例中,在样本处理过程中可使用多于或少于 700 微升的流体。例如,在样本处理过程中使用的流体量可为约 560 微升(例如,通过消除冲洗阶段中的一个)。

[0219] 一般而言,消耗的流体总容积可为 500 微升或更多(例如,520 微升或更多、540 微升或更多、560 微升或更多、580 微升或更多、600 微升或更多、650 微升或更多、700 微升或更多、750 微升或更多)和 / 或 2mL 或更少(例如,1.5mL 或更少、1.4mL 或更少、1.3mL 或更少、1.2mL 或更少、1.1mL 或更少、1.0mL 或更少、900 微升或更少)。

[0220] 参照图 17 和实施例 1,样本制备过程在略多于一分钟内完成(例如,固定阶段经过 13.5 秒+荧光素染料阶段经过 11 秒+噻嗪染料阶段经过 12 秒+冲洗阶段经过 23 秒+干燥阶段经过 8 秒= 67.5 秒的总经过时间)。在某些实施方案中,样本制备可在多于或少于

67.5 秒内完成,如在实施例 2 中。例如,样本处理可在 180 秒或更短(例如,150 秒或更短、120 秒或更短、90 秒或更短、80 秒或更短、70 秒或更短、60 秒或更短、50 秒或更短或者 40 秒或更短)完成。

[0221] 此外,虽然前述示例性处理描述了对于单一样本的处理时间,但是用于处理多个基板的系统和方法(例如,图 1 中配置成处理两个基板的机器 1,和 / 或配置成处理三个或更多基板的系统)每小时能处理超过 100 个样本(例如每小时 60 个样本-120 个样本)。本文所公开的系统与方法在实验室设定中的使用可导致在每个样本基础上更快的产量,而与常规的自动化系统及手动样本制备技术相比流体(例如,固定剂、染剂和冲洗剂流体)的消耗得以减少。

[0222] 其它实施方案

[0223] 应当理解的是,虽然已结合详细的说明对本发明进行了描述,但是上面的描述旨在说明而非限制本公开的范围,所述范围由所附的权利要求书的范围限定。其它的方面、优点以及修改都在所附权利要求的范围之内。

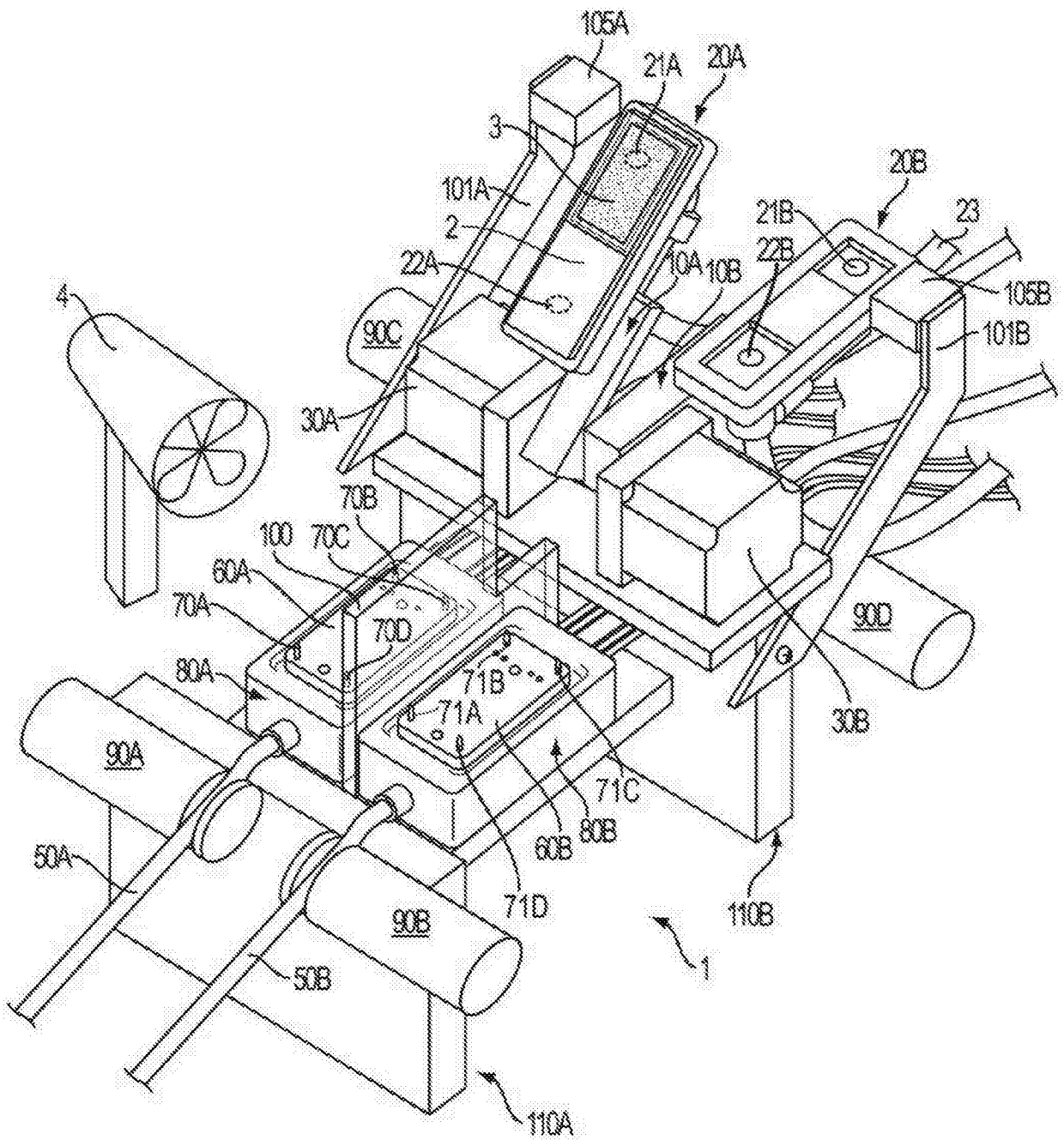


图 1

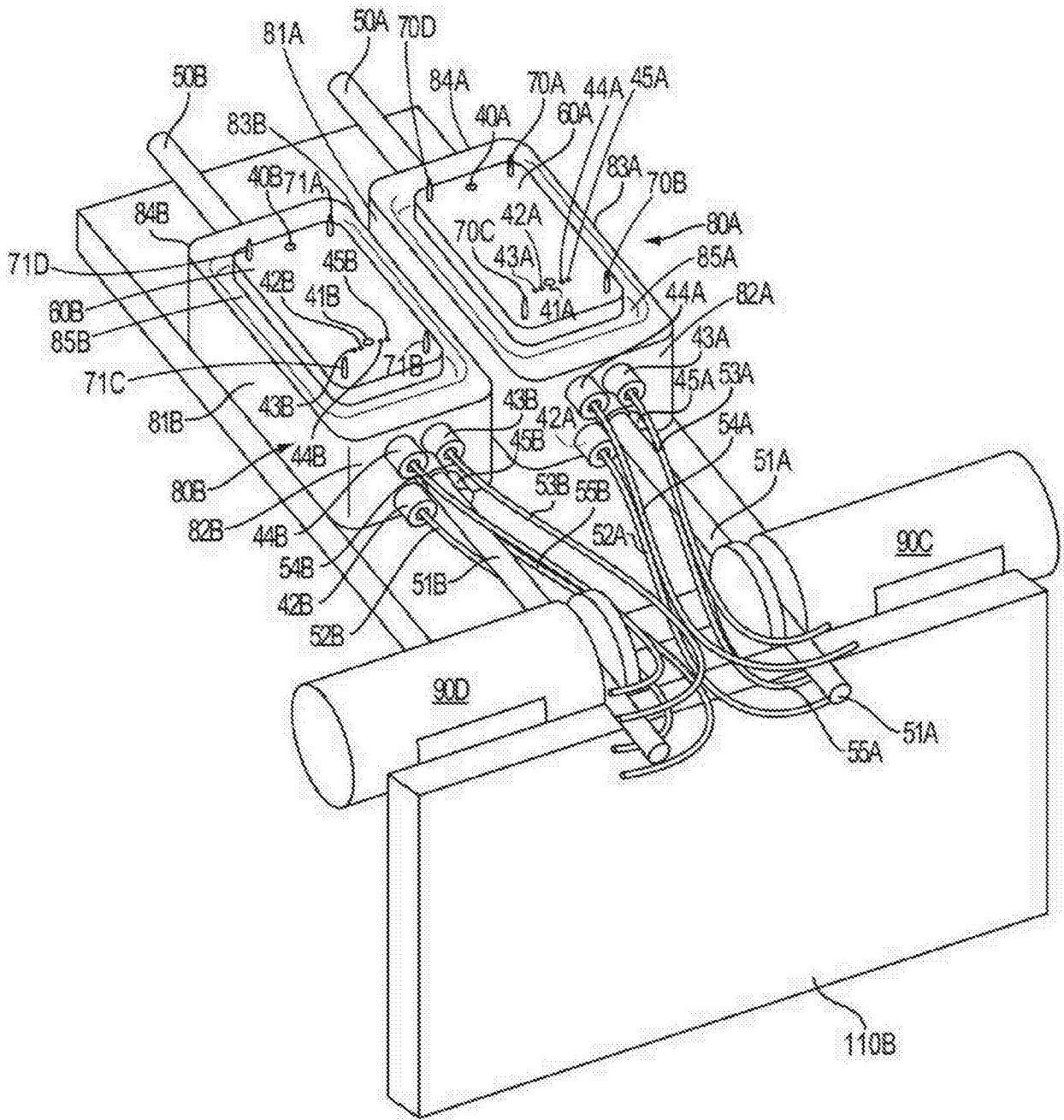


图 2

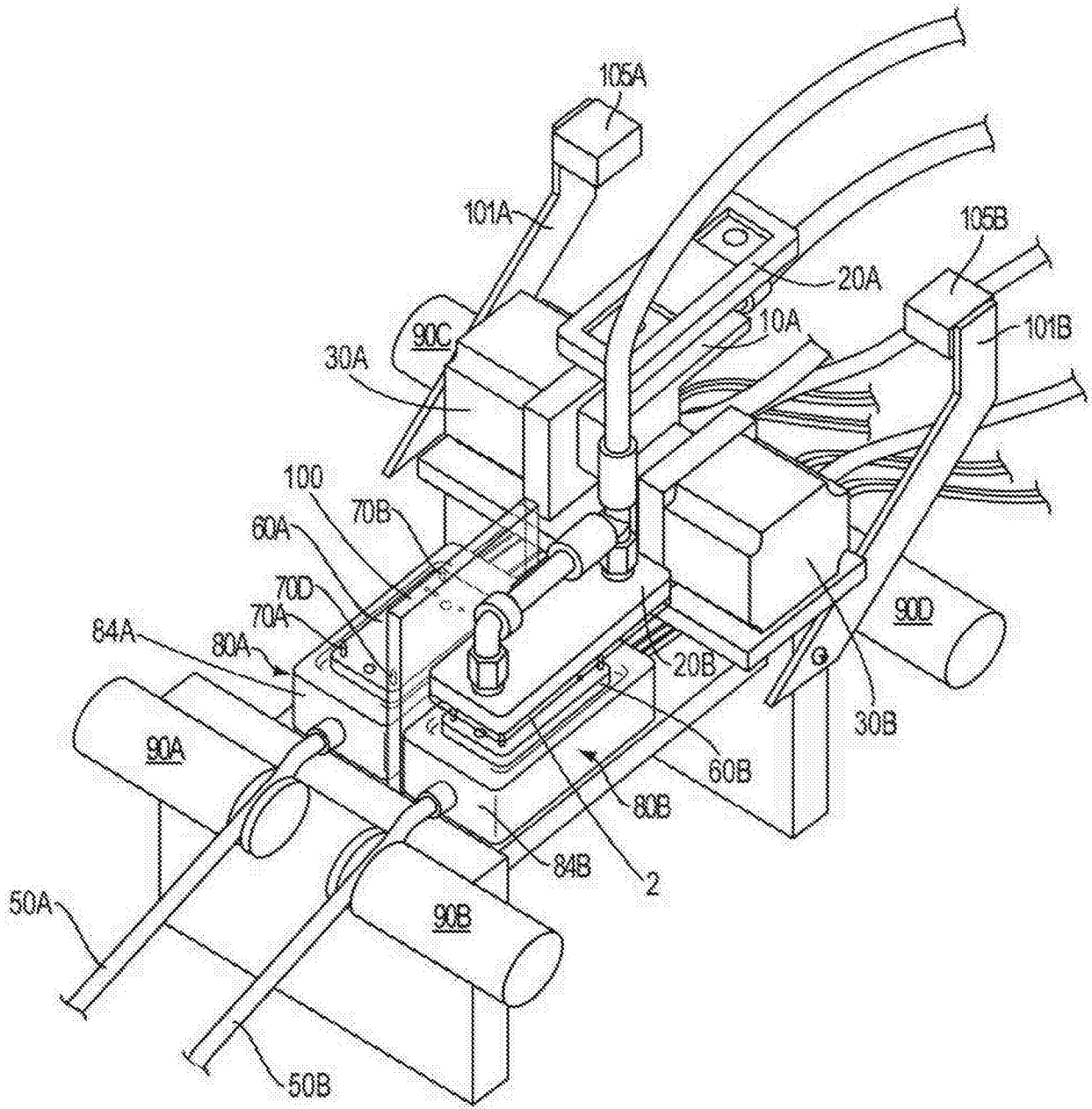


图 3A

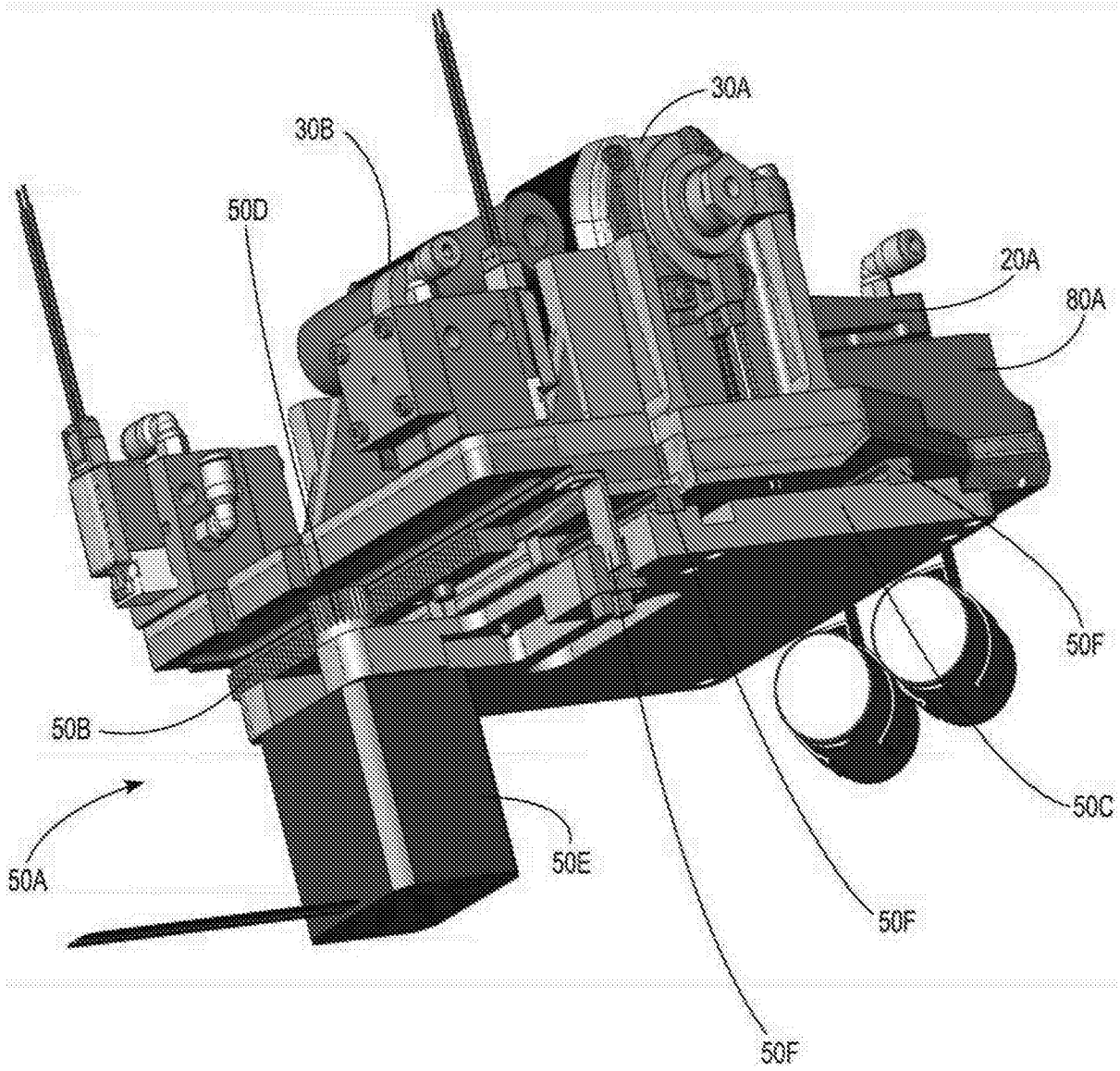


图 3B



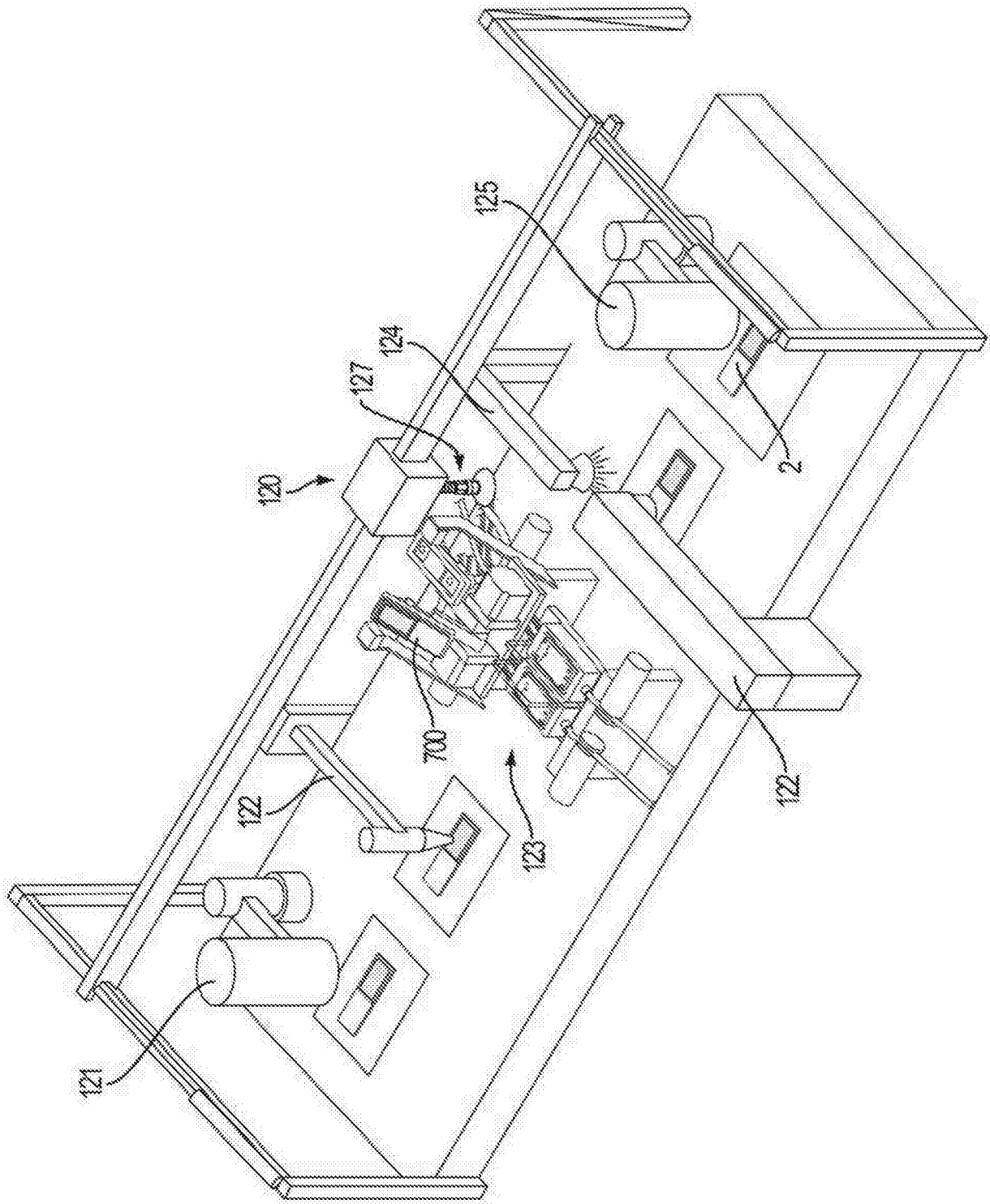


图 5

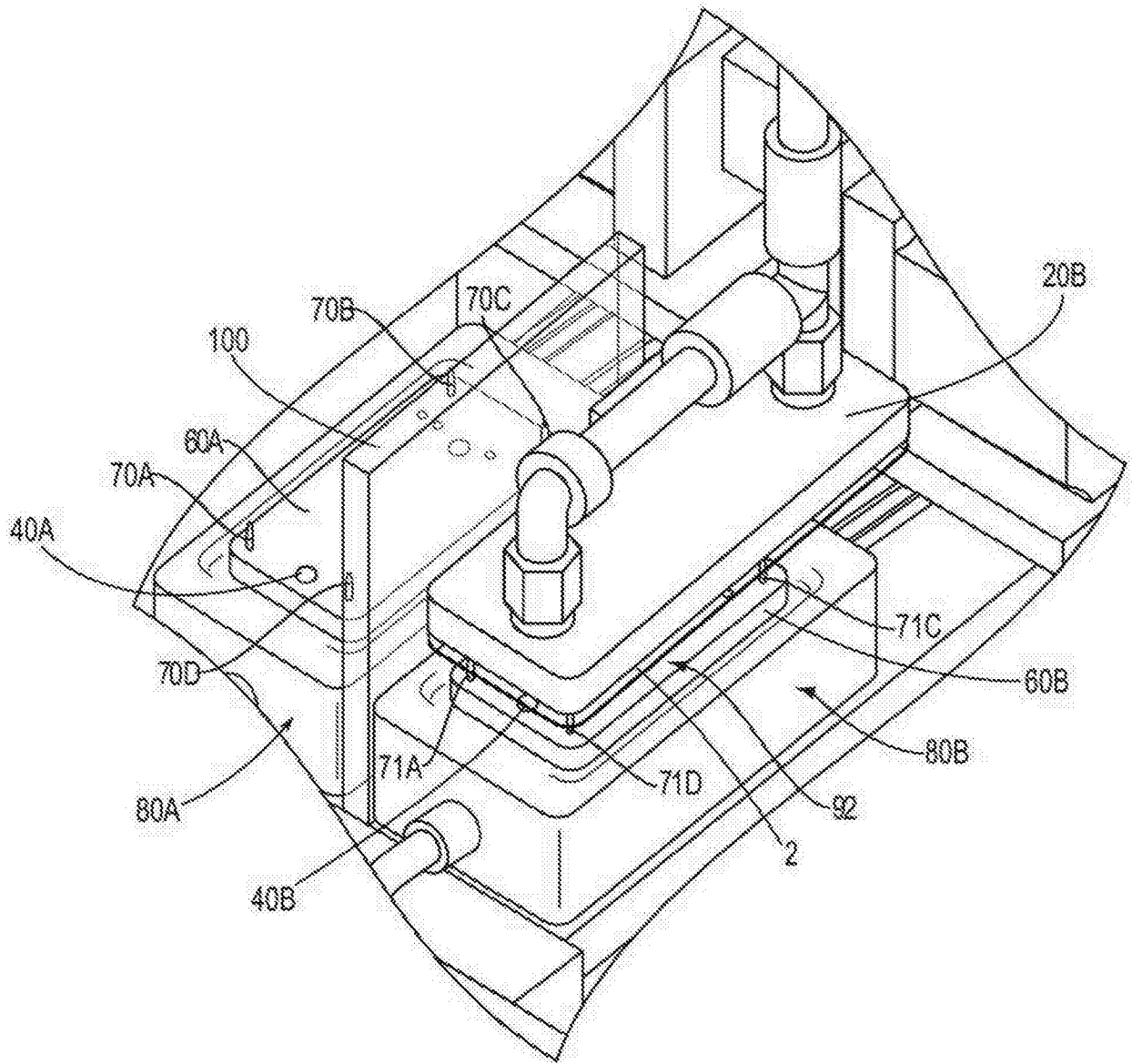


图 6A

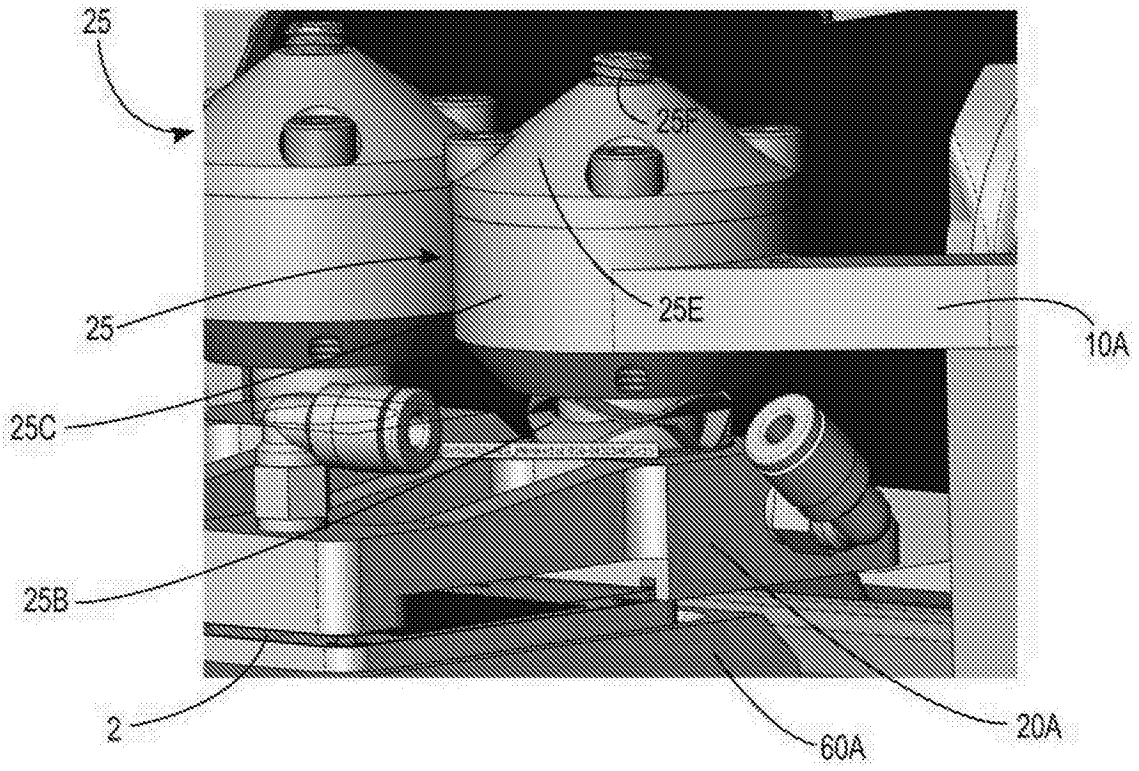


图 6B

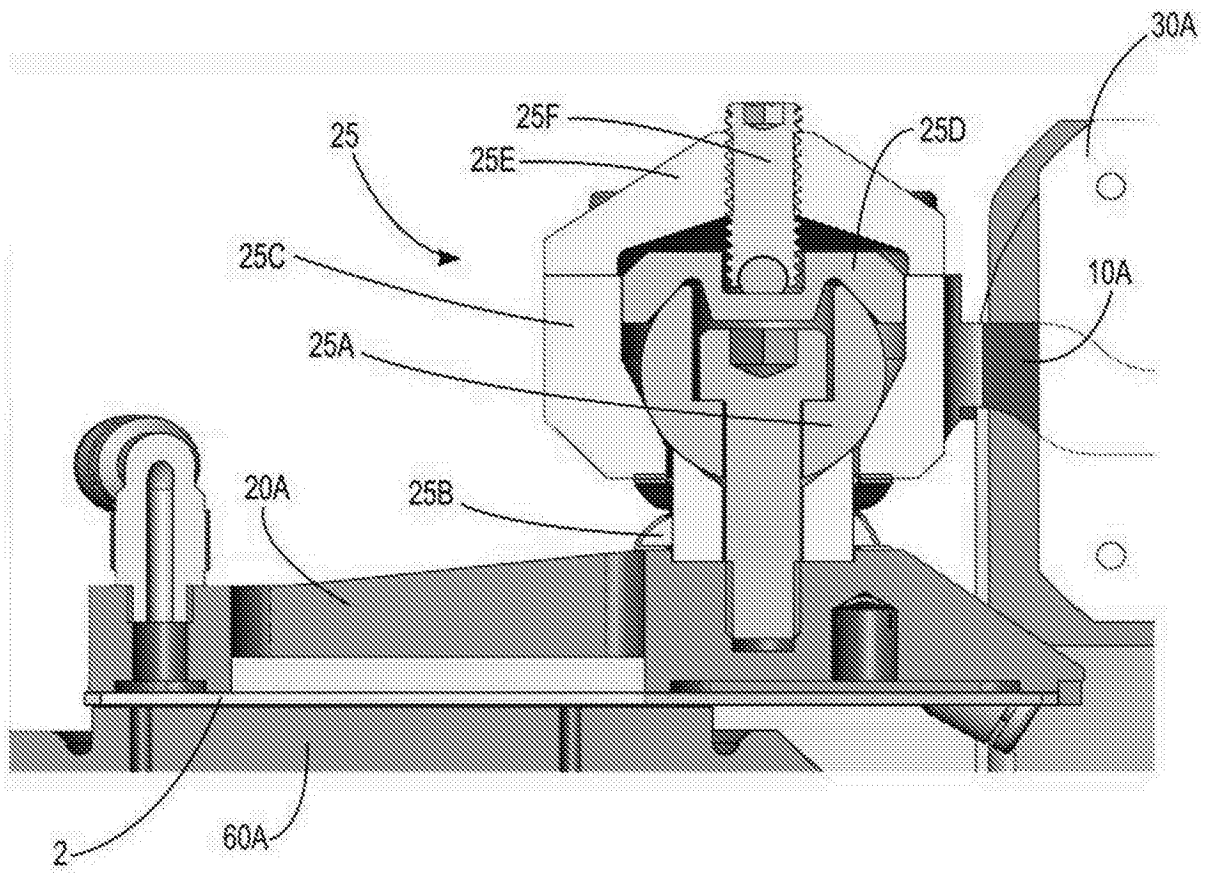


图 6C

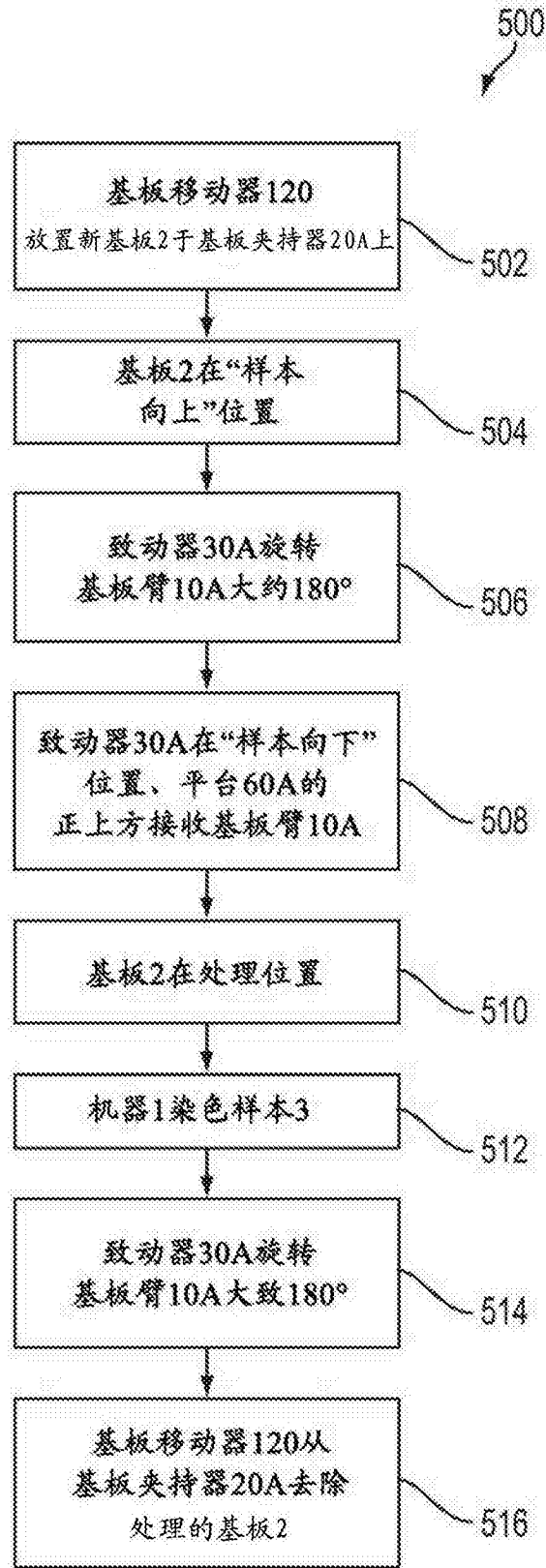


图 7A



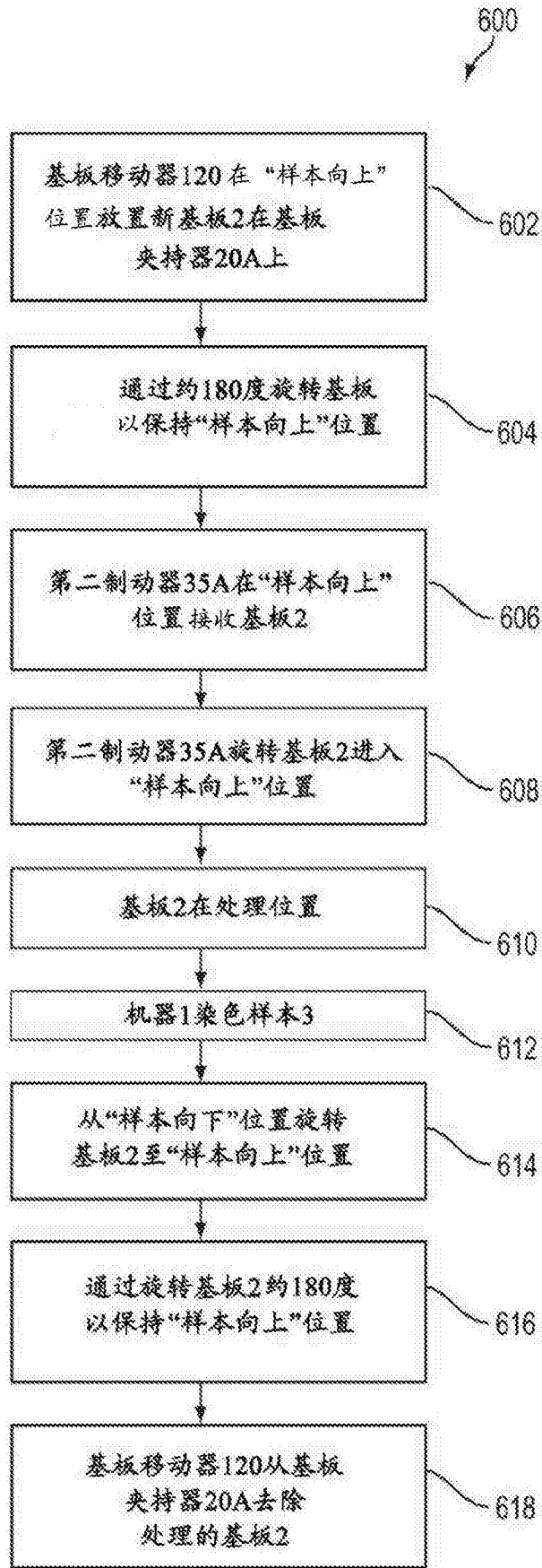


图 8A

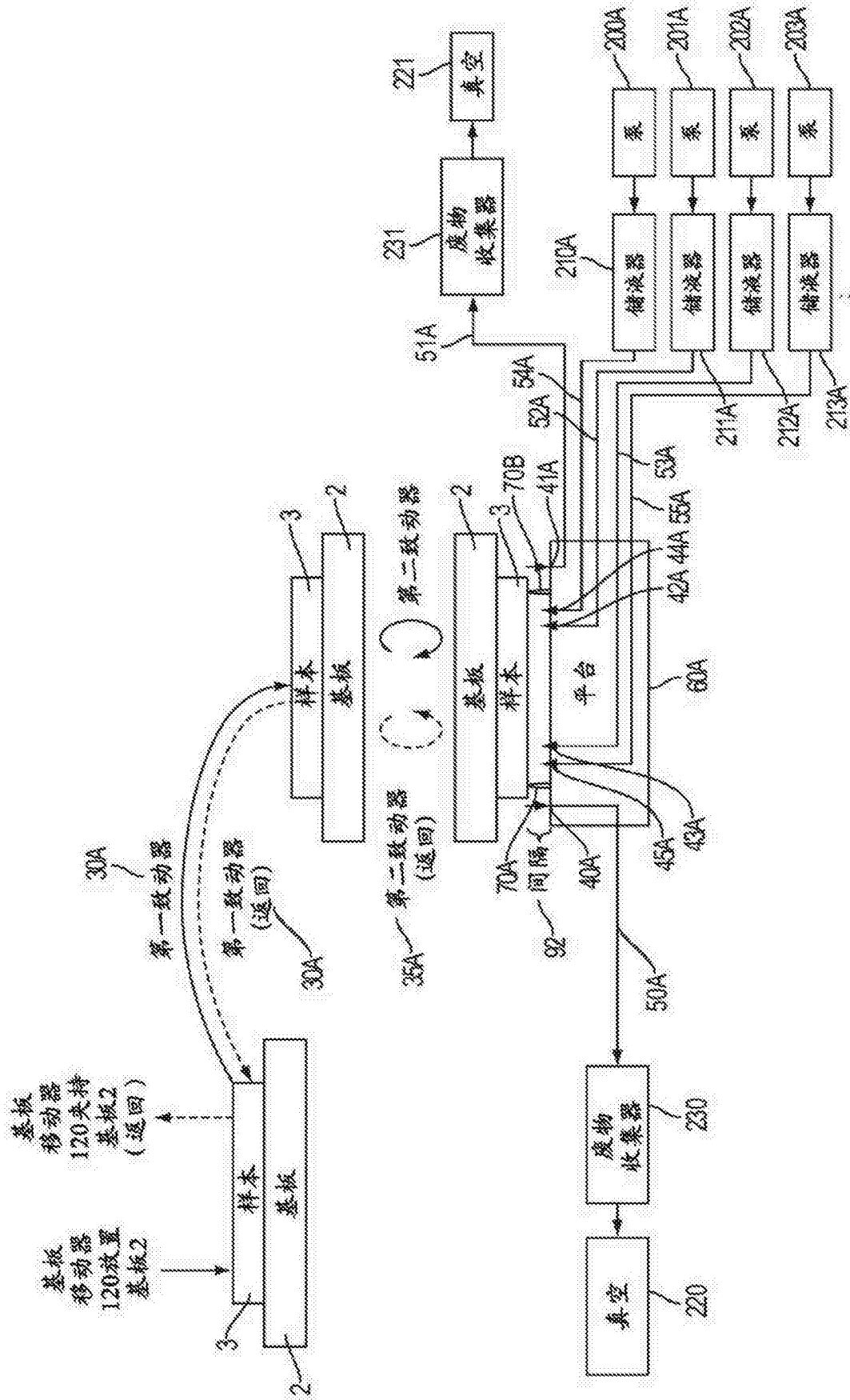


图 8B

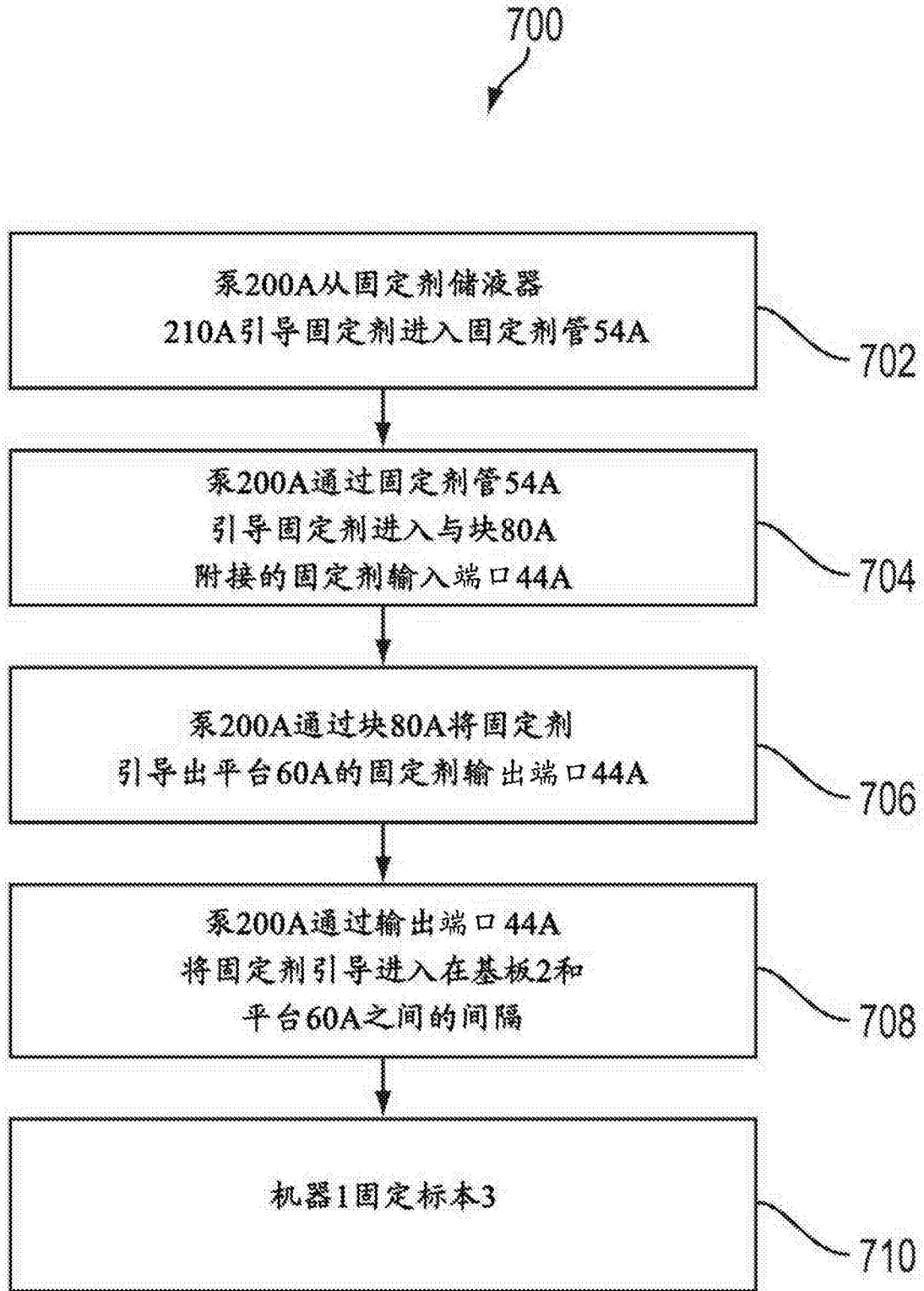


图9

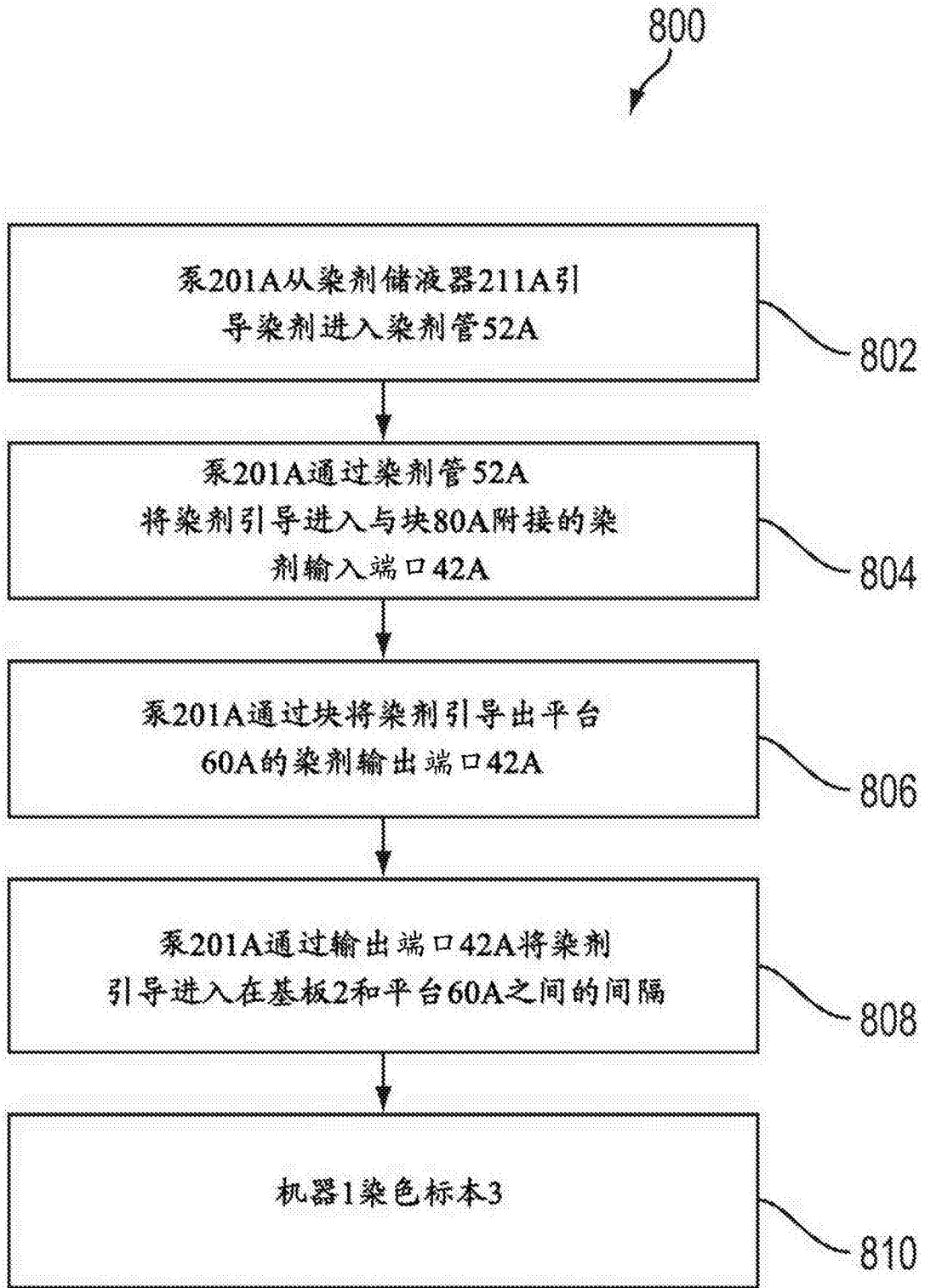


图 10

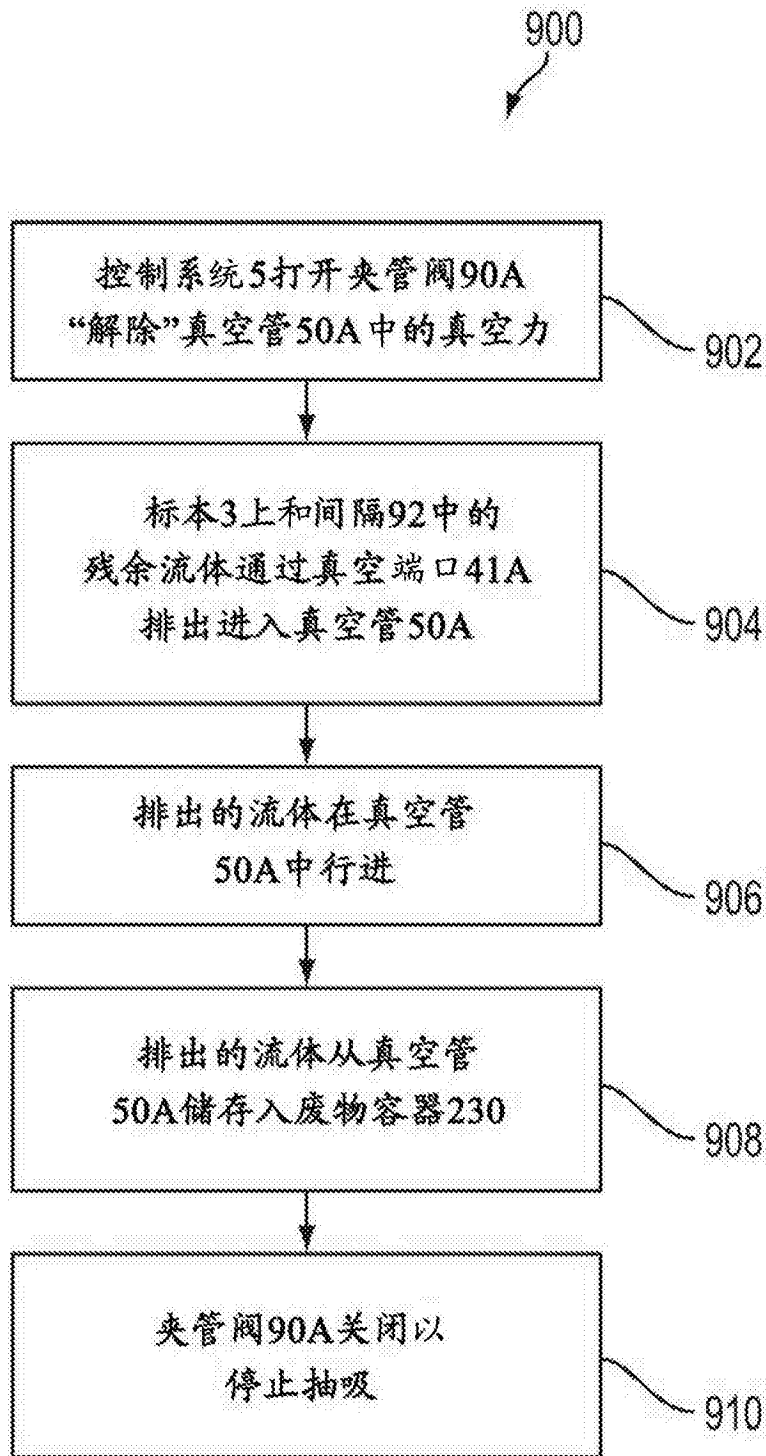


图 11A

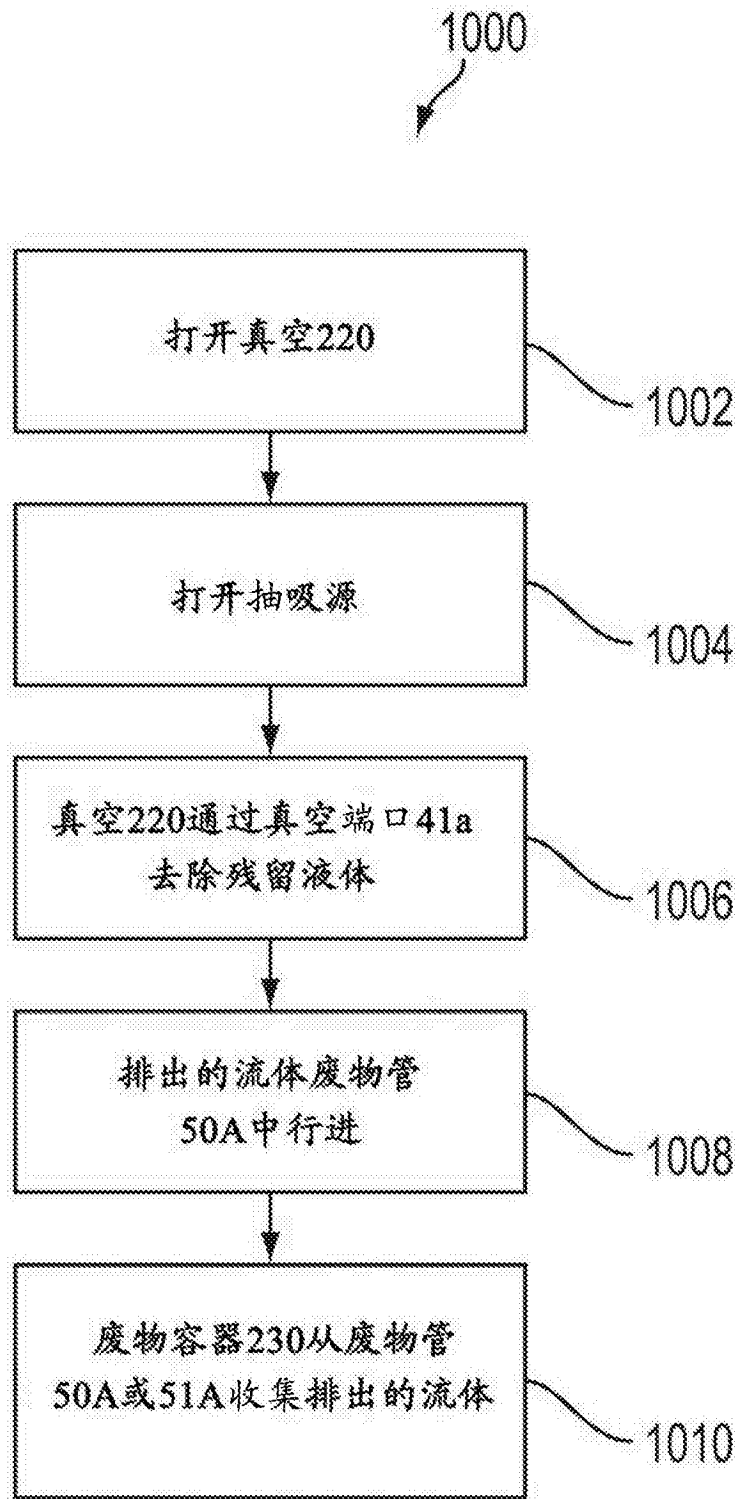


图 11B

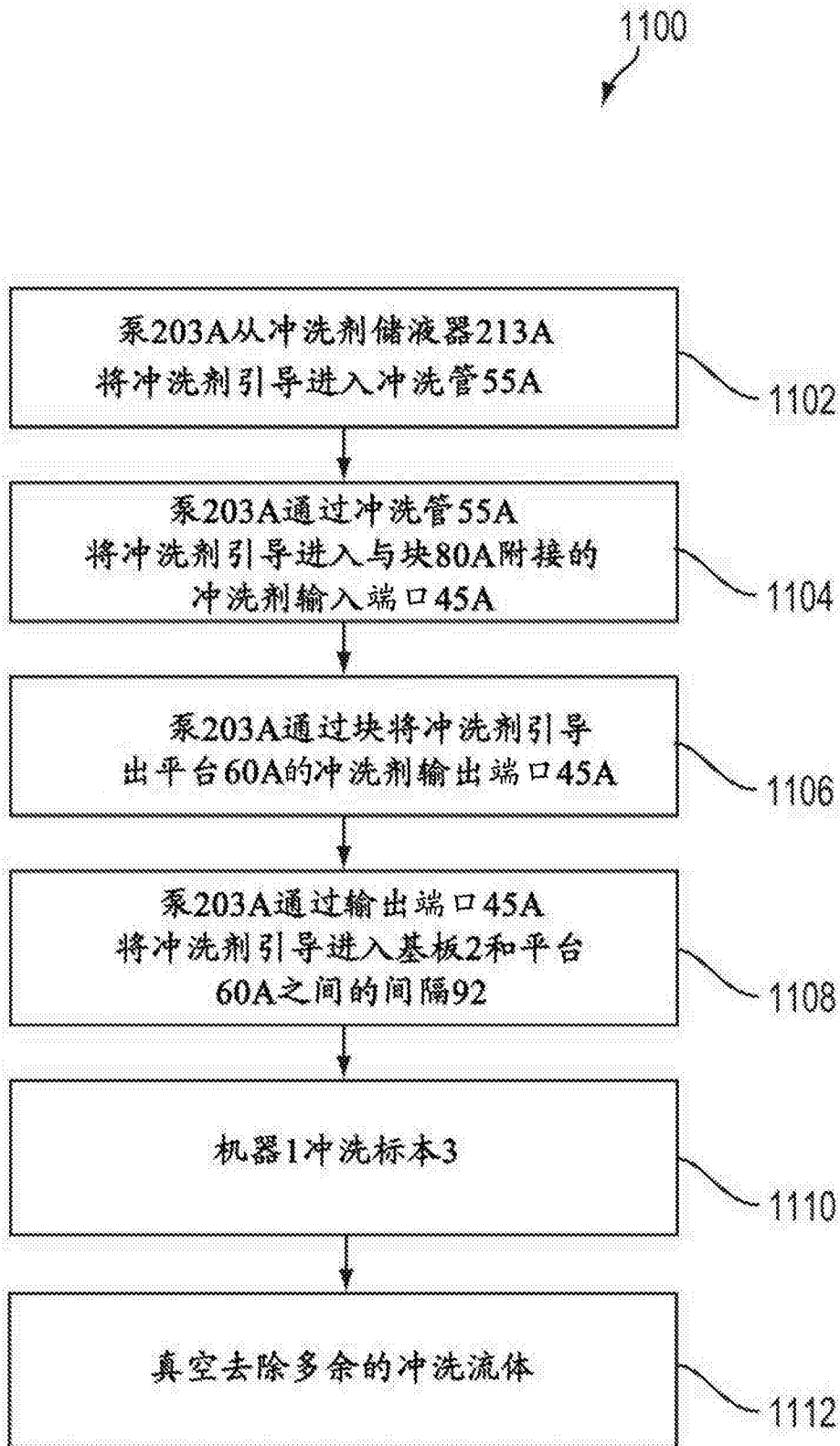


图 12

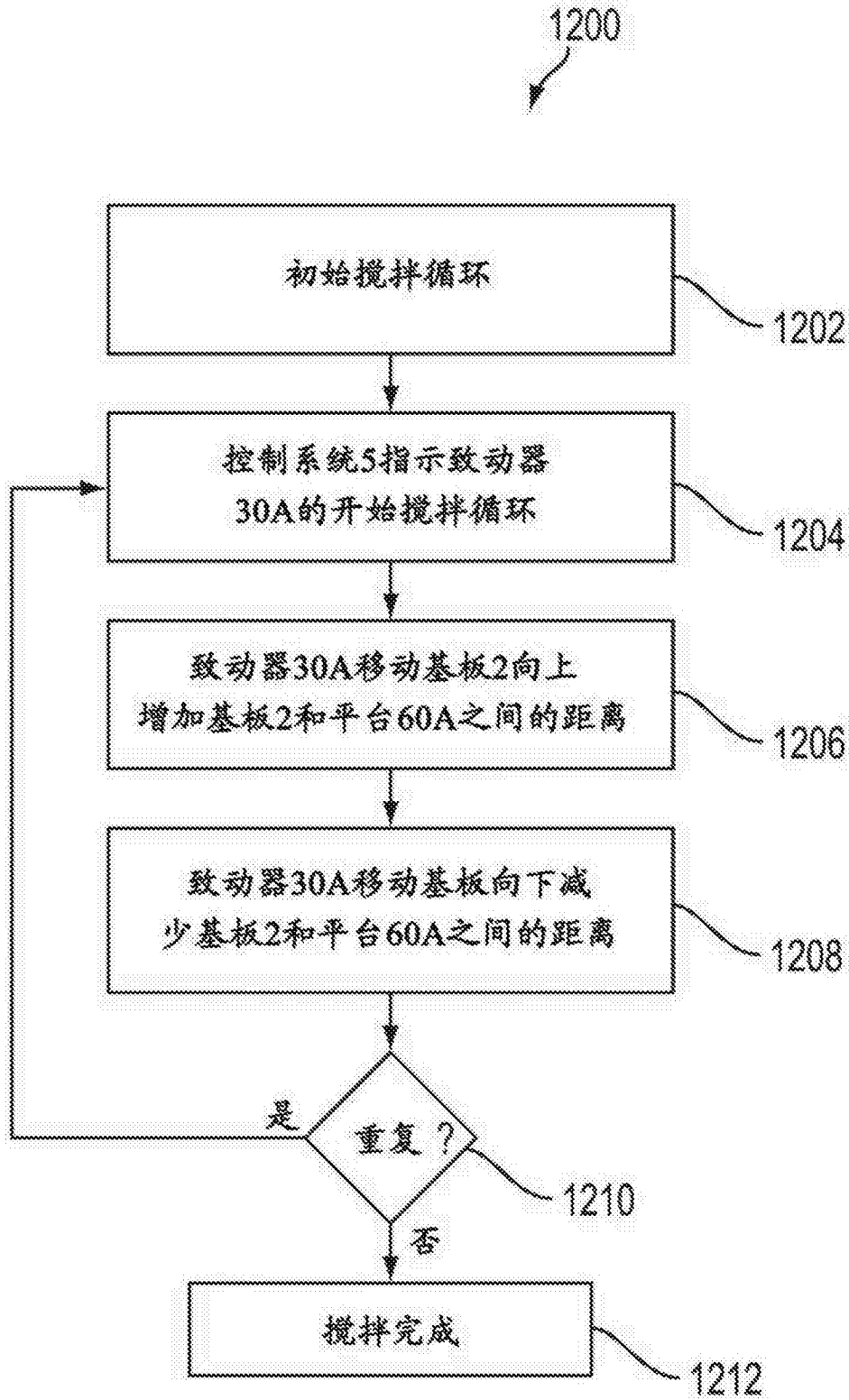


图 13

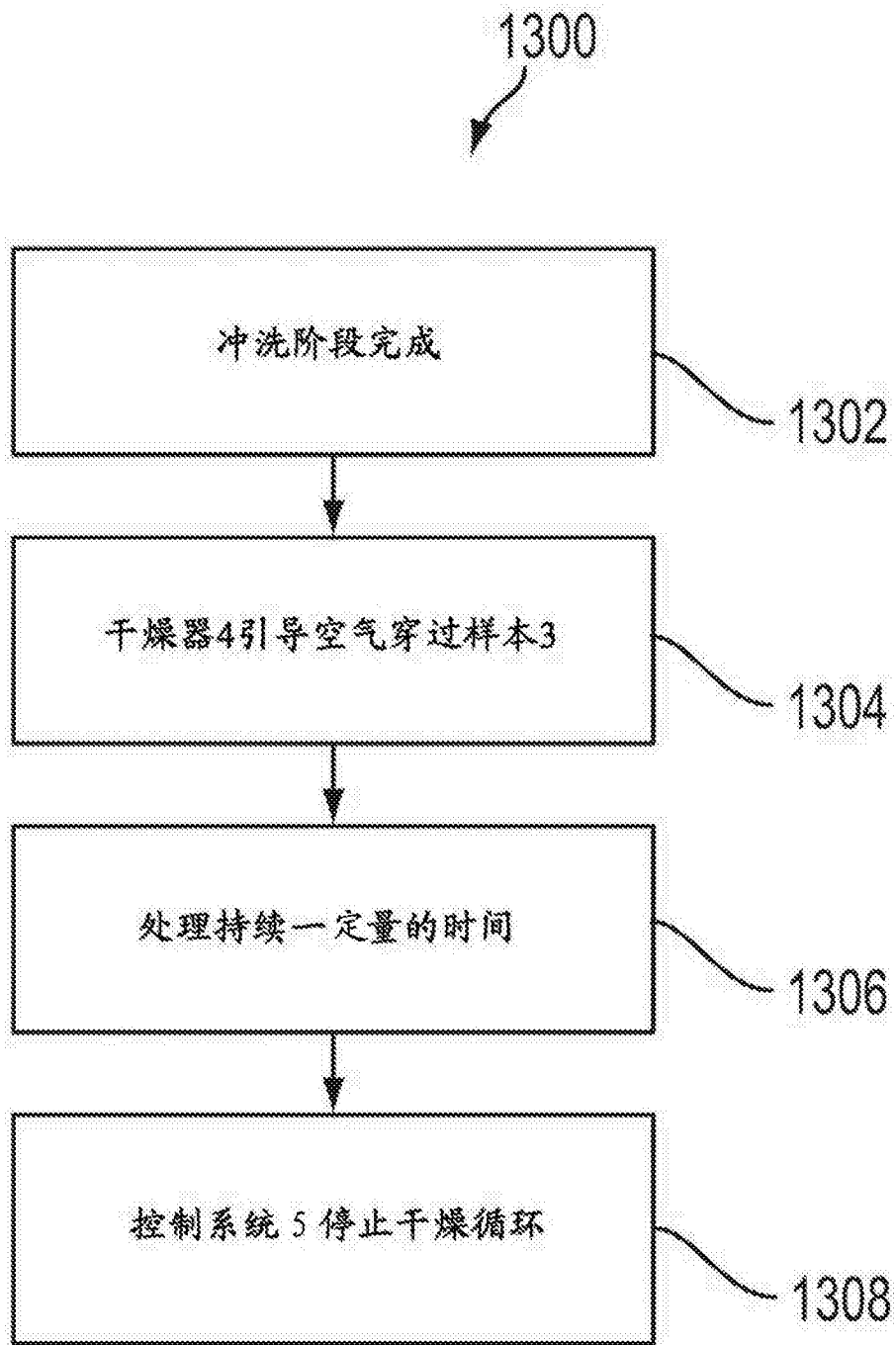


图 14

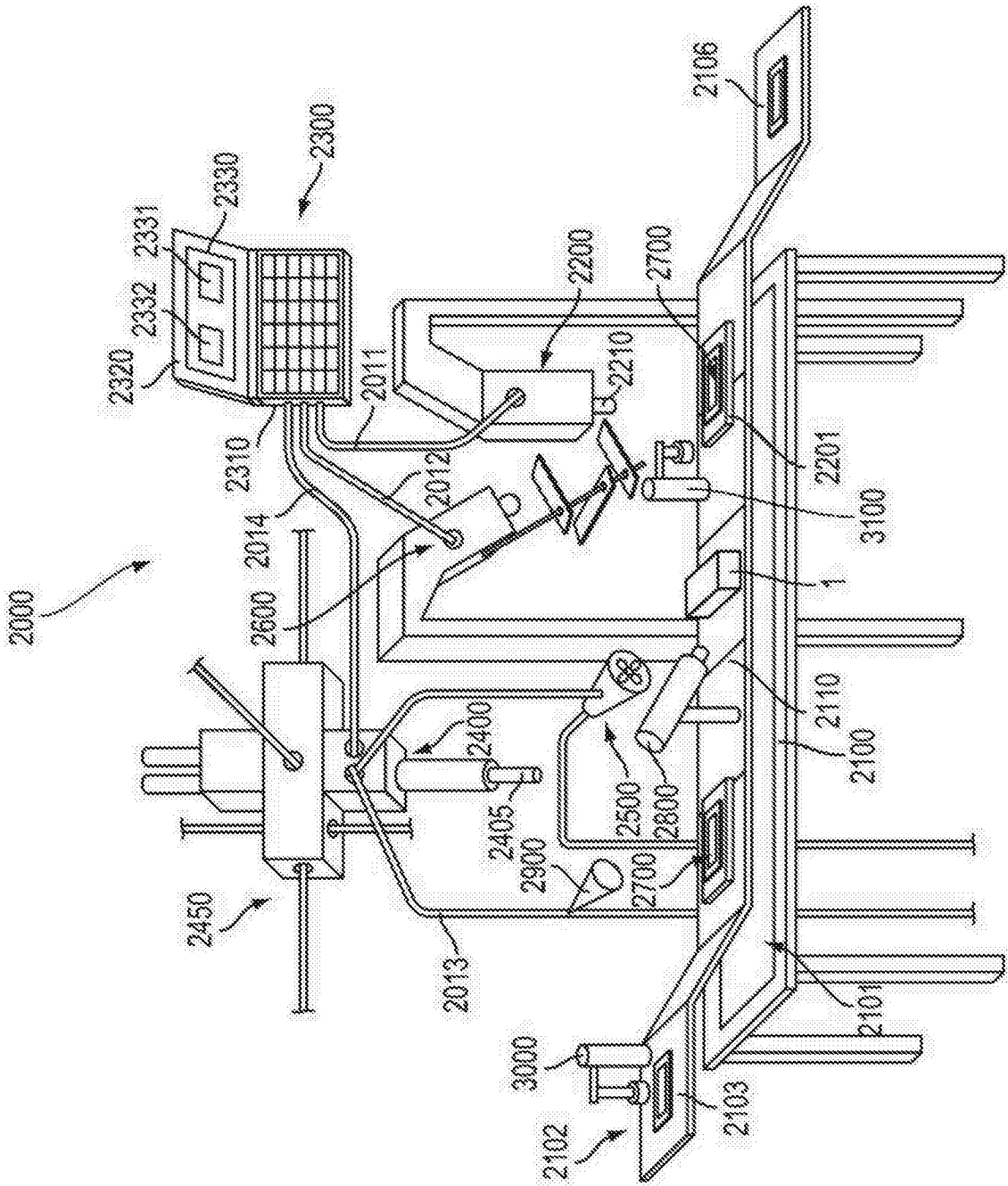


图 15

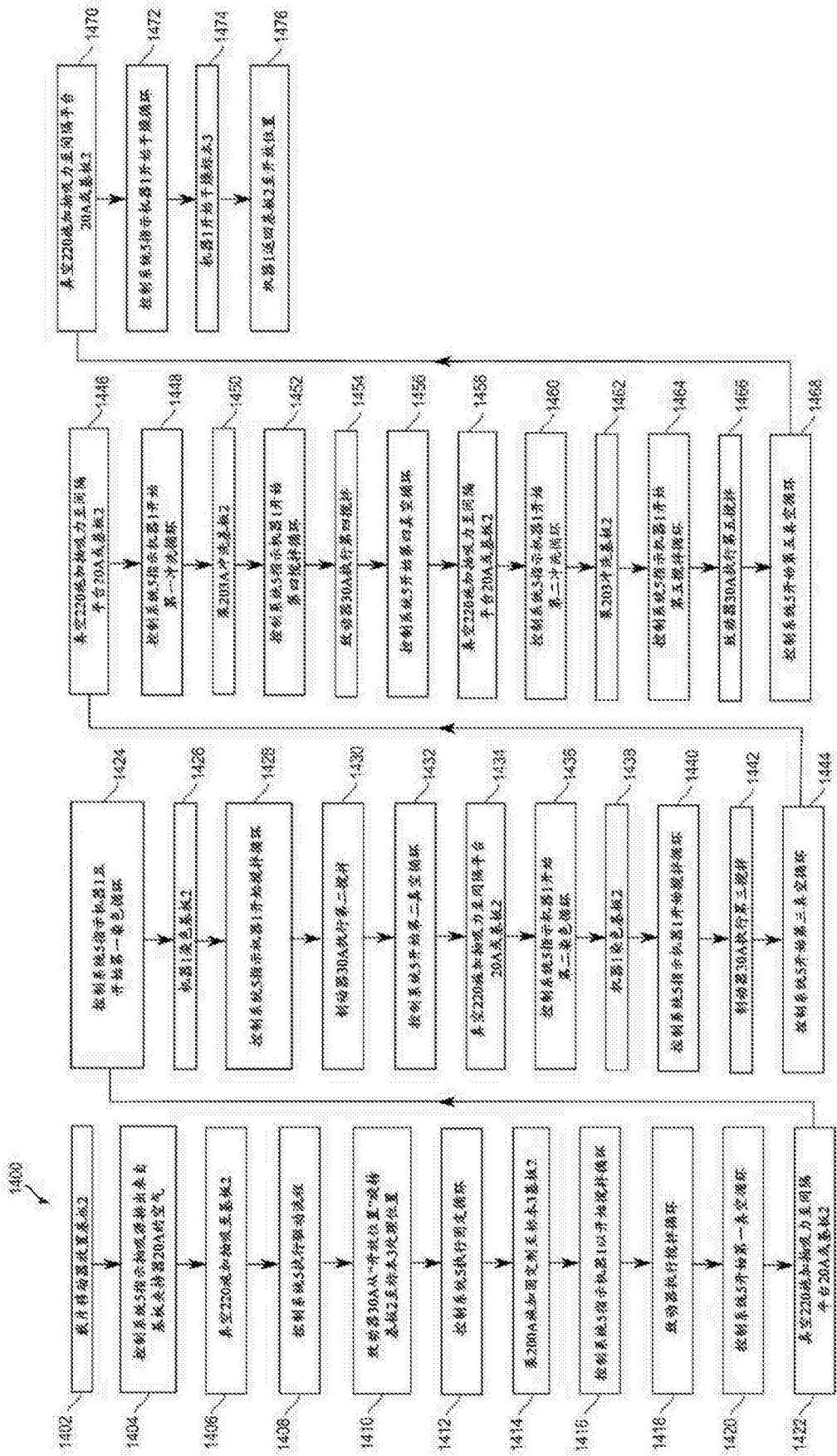


图 16

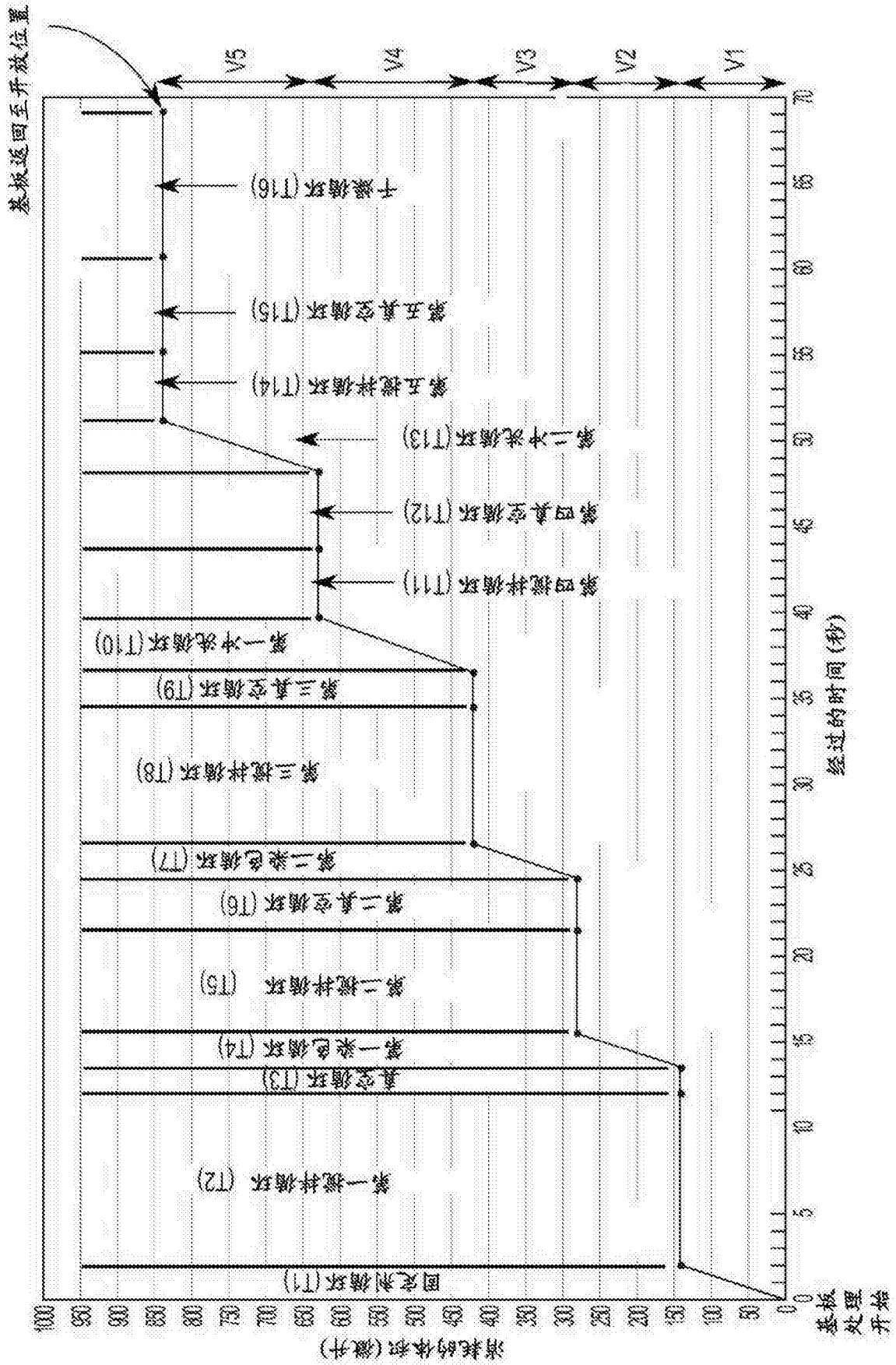


图 17

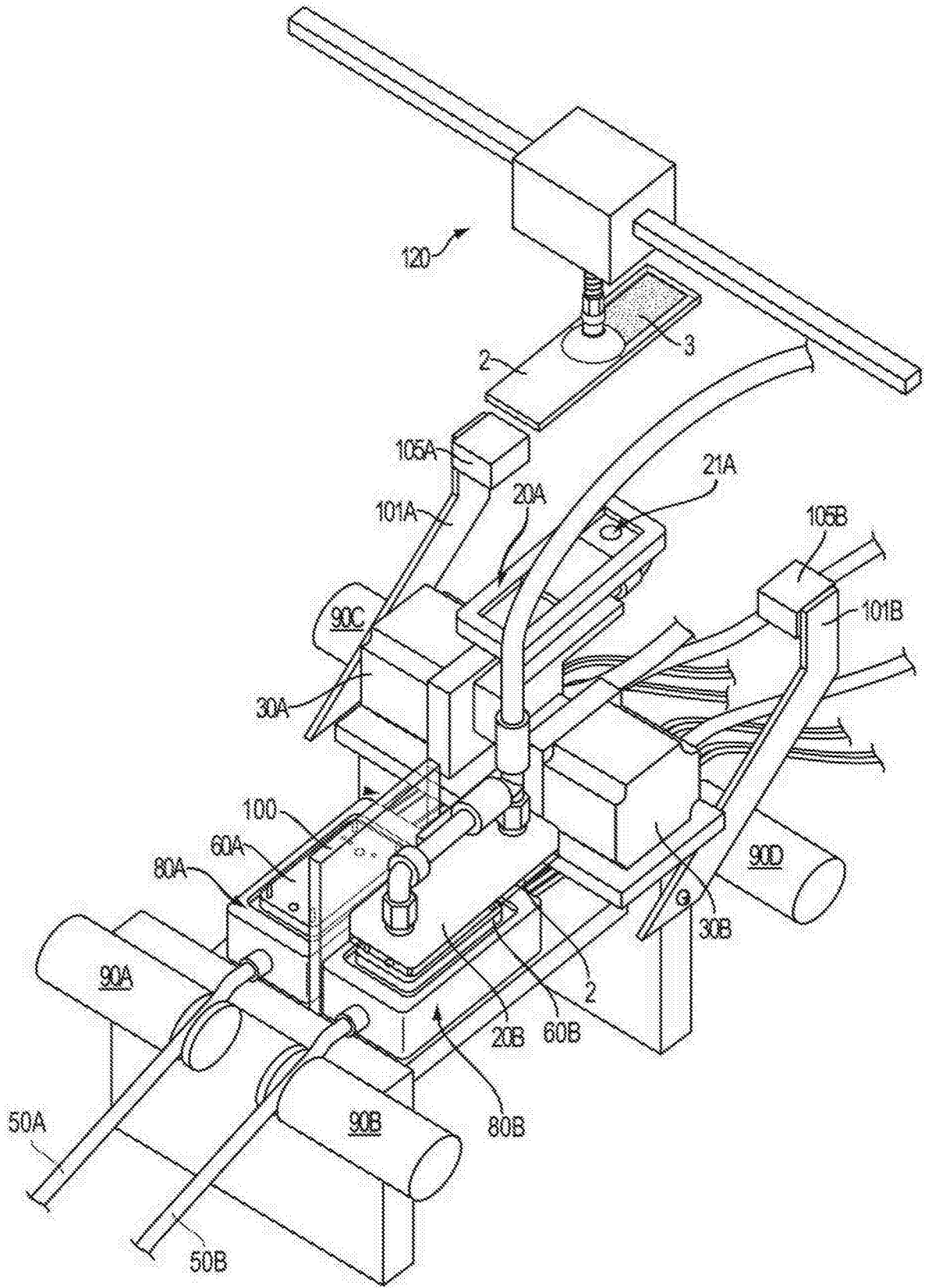


图 18A

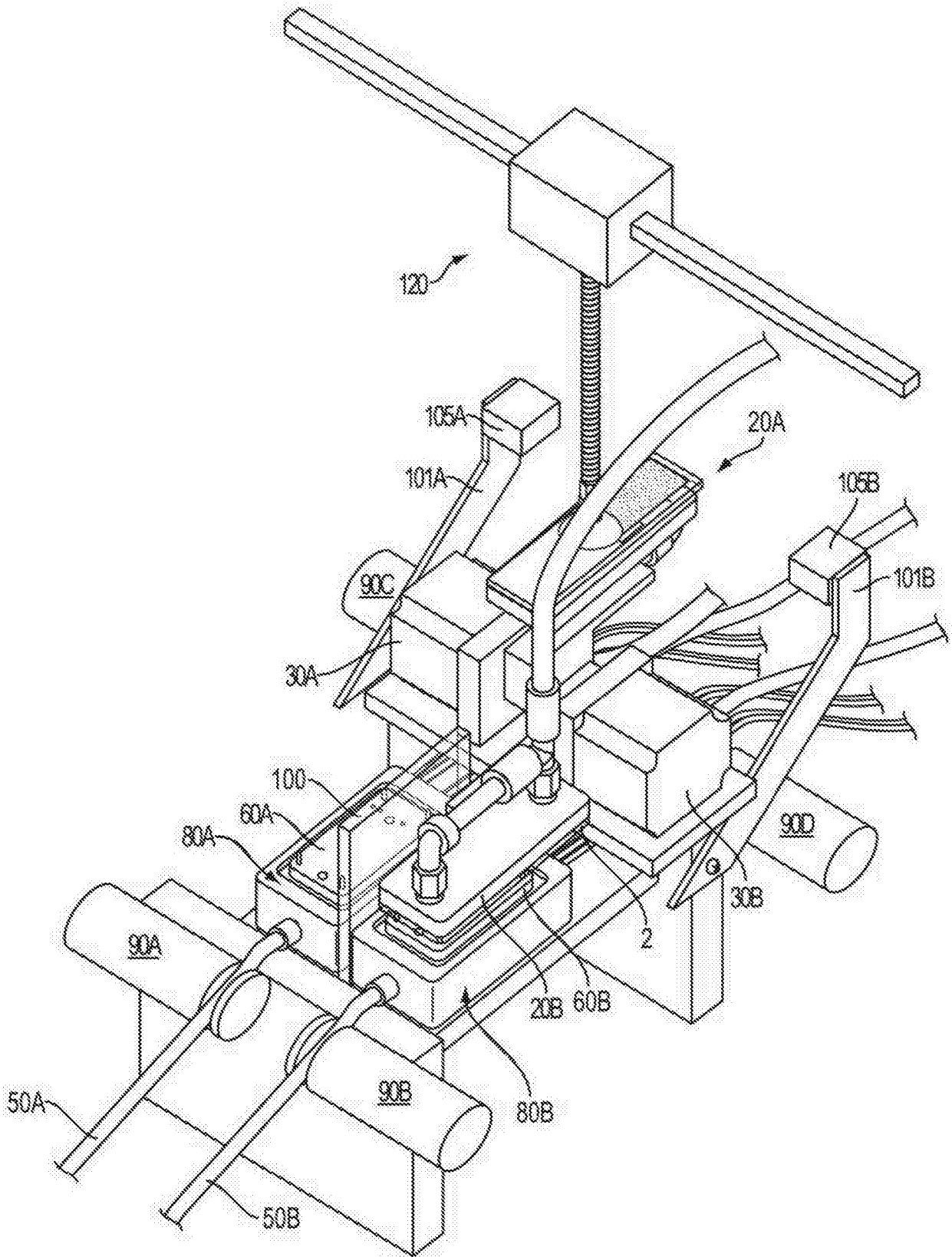


图 18B