

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl.
G01N 15/14 (2006.01)



[12] 发明专利申请公布说明书

[21] 申请号 200480023013.5

[43] 公开日 2009年6月17日

[11] 公开号 CN 101460827A

[22] 申请日 2004.8.13

[21] 申请号 200480023013.5

[30] 优先权

[32] 2003.8.13 [33] US [31] 60/494,824

[32] 2004.8.12 [33] US [31] 10/918,647

[86] 国际申请 PCT/US2004/026225 2004.8.13

[87] 国际公布 WO2005/017499 英 2005.2.24

[85] 进入国家阶段日期 2006.2.13

[71] 申请人 卢米尼克斯股份有限公司

地址 美国得克萨斯州

[72] 发明人 W·D·罗斯 D·E·穆尔

[74] 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司
代理人 李玲

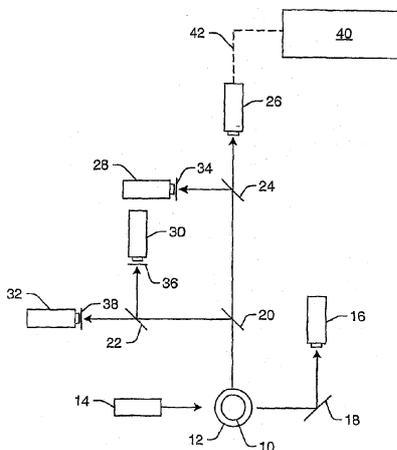
权利要求书7页 说明书25页 附图4页

[54] 发明名称

控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法

[57] 摘要

提供用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的各种方法。一个实施例包括在对样本微球体进行测量时监测测量系统的参数。该方法还包括基于所述的监测实时地改变所述参数。另一种方法包括对最接近于测量系统的温度进行监测。一个这样的方法包括利用经验数据响应于所述温度而改变雪崩光电二极管的偏置电压。一种不同的此类方法包括利用特征曲线响应于所述温度而改变光电倍增管的输出。某些方法包括对将流经流式细胞计型测量系统的液体的温度进行监测，其中样本微球体被置于所述液体中。该方法还包括根据所述温度下液体的粘度来确定样本微球体的速度。



1. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
在测量系统对样本微球体进行测量时，对所述流式细胞计型测量系统的一个或多个参数进行监测；以及
基于所述的监测实时地改变所述一个或多个参数。
2. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述监测包括使用校准微球体的测量来监测所述一个或多个参数，其中所述的校准微球体的直径不同于样本微球体的直径。
3. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的一个或多个参数包括由测量系统的探测器所产生的输出信号，其中所述输出信号响应于被样本微球体所散射的光。
4. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述的监测包括使用校准微球体的测量来监测所述一个或多个参数，其中所述的校准微球体具有不同于样本微球体的直径的直径，并且至少部分校准微球体的光谱地址不同。
5. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述一个或多个参数包括测量系统的动态范围。
6. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述改变包括扩展测量系统的指示器通道的线性动态范围。
7. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述一个或多个参数包括测量系统健康状态。
8. 如权利要求 7 所述的方法，其特征在于，所述测量系统健康状态包括分类通道的健康状态、指示器通道的健康状态、或者二者兼而有之。

9. 如权利要求 4 所述的方法，其特征在于，所述的一个或多个参数包括样本微球体的测量中的线性性。

10. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述的测量包括分类通道的测量、指示器通道的测量、或者二者兼而有之。

11. 如权利要求 9 所述的方法，其特征在于，所述改变包括大致地校正测量中的任何非线性性。

12. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述一个或多个参数包括测量系统的雪崩光电二极管的参数。

13. 如权利要求 12 所述的方法，其特征在于，还包括使用经验数据来确定在所述改变中所要使用的校正因子。

14. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述一个或多个参数包括测量系统的光电倍增管的参数。

15. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，所述一个或多个参数包括样本微球体的速度，且其中所述的监测包括监测样本微球体被置于其中的液体的温度，并根据该温度来确定样本微球体的速度。

16. 如权利要求 1 所述的方法，其特征在于，还包括在对样本微球体测量之前对所述一个或多个参数进行校准。

17. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
对最接近于所述流式细胞计型测量系统的温度进行监测；以及
使用经验数据响应于所述温度而改变测量系统的雪崩光电二极管的偏置电压，从而大致上对由于温度所致的雪崩光电二极管的增益变化进行校正。

18. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，还包括通过在一个或多个温度下将大致恒定的光级别施加到雪崩光电二极管上，并将所述光电倍增二极管在所述一个或多个温度下的多个偏置电压记录下来，从而产生经验数据。

19. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述的改变在测量系统进行样本测量之前进行，其中所述偏置电压在整个样本测量过程中大致恒定。

20. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，所述的监测和改变是实时进行的。

21. 如权利要求 17 所述的方法，其特征在于，还包括在发射出已知强度的光的校准微球体被测量系统测量的同时，改变偏置电压，直至从雪崩光电二极管获得了预定信号级别为止。

22. 如权利要求 21 所述的方法，其特征在于，还包括根据雪崩光电二极管的反向偏置电压确定雪崩光电二极管的相应的相对电流、在预定信号级别下的偏置电压、以及温度。

23. 如权利要求 22 所述的方法，其特征在于，还包括使用所述的相应的相对电流、温度、反向偏置电压、以及经验数据来确定偏置电压。

24. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
对最接近于所述流式细胞计型测量系统的温度进行监测；以及
使用光电倍增管的特征曲线响应于所述温度而改变测量系统的光电倍增管的输出信号，从而大致上对由于温度所致的光电倍增管的输出信号增益的变化进行校正。

25. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述的光电倍增管的增益响应于所述温度作近似线性变化。

26. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述光电倍增管是测量系统的

指示器通道的一部分。

27. 如权利要求 24 所述的方法，其特征在于，所述光电倍增管的特征曲线随探测波长以及光电倍增管的阴极结构而变化。

28. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
将测量系统的光电倍增管的电压设置为第一值和第二值；
在所述第一值和第二值下测量光电倍增管的输出电流；
根据第一值和第二值的对数与在第一值和第二值下的输出电流的对数的相对关系来确定光电倍增管的校准电压；
将该校准电压施加到所述光电倍增管；以及
测试所述光电倍增管以确定光电倍增管的一个或多个参数是否在预定的容差内。

29. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
使用逐次逼近来确定测量系统的探测器的校准电压；以及
将校准电压施加给探测器。

30. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，所述探测器包括雪崩光电二极管。

31. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，所述探测器包括光电倍增管。

32. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，还包括将校准电压和探测器的击穿电压相比较，并且如果校准电压超过击穿电压，则重复所述确定。

33. 如权利要求 29 所述的方法，其特征在于，还包括收集和处理探测器采样以确定探测器信号级别。

34. 如权利要求 33 所述的方法，其特征在于，还包括将探测器信号级别和校准目标信号级别相比较，如果探测器信号级别高于校准目标信号级别，则降低探测

器的偏置电压，并重复所述确定。

35. 如权利要求 33 所述的方法，包括将探测器信号级别和校准目标信号级别相比较，如果探测器信号不在校准目标信号级别的预定范围内，则重复所述确定，直至已经尝试了所有期望的探测器电压级别为止。

36. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
对将要流经流式细胞计型测量系统的液体的温度进行监测，其中样本微球体被置于所述液体中；以及
根据在所述温度下的液体的粘度来确定测量系统中的样本微球体的速度。

37. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，还包括基于速度确定样本微球体之一将存在于测量系统的探测窗口内的时间长度。

38. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，还包括基于速度确定样本微球体之一从测量系统的一个探测窗口移动到测量系统的另一个探测窗口的时间长度。

39. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，还包括基于速度确定微球体之一何时将出现在测量系统的探测窗口中。

40. 如权利要求 39 所述的方法，其特征在于，还包括控制测量系统的一个或多个探测窗口的采样间隔从而对速度进行补偿。

41. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述的监测和确定是在测量系统进行样本微球体的测量之前进行的。

42. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，还包括根据速度确定测量系统的输出信号的一个或多个特性。

43. 如权利要求 42 所述的方法，其特征在于，还包括使用校正因子对输出信号由于速度所致的误差进行校正，其中所述的校正因子采用经验测量值来确定。

44. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述测量系统被配置为在样本微球体的测量过程中维持大致恒定的液体压力。

45. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述确定包括从表来确定速度，其中该方法还包括基于该速度在样本微球体的测量过程中控制液体的压力。

46. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述确定包括从泊肃叶等式来确定速度，其中该方法还包括基于该速度在样本微球体测量过程中控制液体的压力。

47. 如权利要求 36 所述的方法，其特征在于，所述确定包括根据速度的预定值与温度的相对关系来确定速度，其中该方法还包括基于该速度在样本微球体测量过程中控制液体的压力。

48. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
对微球体从流式细胞计型测量系统的第一探测窗口移动到该测量系统的第二探测窗口的时间进行测量；以及
改变测量系统的施加压力从而使得所述时间基本恒定。

49. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述时间包括平均时间。

50. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述微球体包括样本微球体或者校准微球体。

51. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述测量包括测量在第一和第二探测窗口内被微球体所散射的光。

52. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述测量包括用一个探测器测量在第一和第二探测窗口内被微球体所散射的光。

53. 如权利要求 52 所述的方法，其特征在于，在第一和第二探测窗口内被微球体所散射的光被分光器引导给所述一个探测器。

54. 如权利要求 48 所述的方法，其特征在于，所述方法是实时进行的。

55. 一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法，包括：
对微球体从流式细胞计型测量系统的第一探测窗口移动到该测量系统的第二探测窗口的平均时间进行测量；

将所述平均时间和参考时间相比较，所述参考时间是参考微球体从所述第一探测窗口移动到所述第二探测窗口的时间；以及

如果平均时间和参考时间之间的差大于预定值，则改变测量系统的施加压力。

56. 如权利要求 55 所述的方法，其特征在于，所述改变包括：如果平均时间大于参考时间，则提高施加压力。

57. 如权利要求 55 所述的方法，其特征在于，所述改变包括：如果平均时间小于参考时间，则降低施加压力。

58. 如权利要求 55 所述的方法，其特征在于，所述预定值被选择为补偿测量系统的已知的时间变化机理。

59. 如权利要求 55 所述的方法，其特征在于，所述微球体包括样本微球体、校准微球体、或者二者兼而有之。

60. 如权利要求 55 所述的方法，其特征在于，该方法是实时进行的。

控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法

技术领域

本发明大致涉及用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法。某些实施例涉及包括基于参数监视而实时地改变流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法。

背景技术

以下的说明和范例并不因其包含于该部分之内而被认为是现有技术。

通常，流式细胞计在激光激发的聚苯乙烯小珠或者细胞线性地通过流动室的时候提供对其荧光强度的测量。不过，流式细胞计同样可以被用于提供对其它粒子的一个或多个特性的测量。某些系统被配置为用于测量由粒子所散射的与激发源成 90° 或者 180° 的光的级别，两个或更多个荧光测量被用于确定分类，也就是粒子的“身份”，被称为“指示器”（reporter）的另外的荧光测量往往被用于量化所关注的化学反应。各荧光测量是在不同的波长下作出的。

由于流式细胞计型测量仪器的测量能力已有所改进，流式细胞计可以提供有用的测量的应用领域大大地增加了。例如，对于诸如生物化验（例如，置换或竞争化验、非竞争化验、酶化验）、核酸分析、以及组合化学等应用，流式细胞计已经变得越来越有助于提供数据。特别是，由于进行化验的速度（特别是与其他化验方法（例如常规的酶联免疫吸附分析“ELISA”形式）相比较）的原因，流式细胞计越来越普及。

在通常环境下，为了确保精确可靠的化验结果，作为准备仪器以用于适当的用途和测量的一个或多个初始步骤，进行流式细胞计的校准。此外，除非每个流式细胞计的荧光通道都被校准为进行相同的读取，否则对于样本间的变化源，就没有保证。如果没有采用完整而稳固的校准方法的话，很有可能同一个仪器在不同的几天里对同一个样本给出不同的读取结果。类似地，如果任意两个仪器即使在被正确地设置的前提下仍然不能保证给出相同的结果，尽管流式细胞计可能对样本中的细胞进行识别和区分的测量效果要好一些，但其作为医疗仪器的用途可能是不大的。

因此，已经开发了许多不同的用于校准流式细胞计的方法。起先，进行了有效的研究，开发出降低在校准时操作者的涉及程度的方法，从而提高了校准的精度。这一成果很大程度上使得流式细胞计的校准中的很多步骤实现了自动化。此外，进行了有效的研究以在其它方面提高校准的精度。例如，该成果已导致校准中的进步，诸如使用具有统一而恒定的特性的校准标准。特别是，由于生物样本的特性会随时间而变化，用于流式细胞计的生物校准标准基本上被具有更加稳定的特性的综合校准标准（例如，聚合微球体或粒子）所取代。此外，通常情况下，校准微球体具有与测试微球体的特性基本相似（即，尽可能地相近）的特性（例如，尺度、体积、表面特性、粒度特性、折射率、荧光性等）。人们确信，通过对与在测试中预期的值尽可能接近的值进行校准，此类校准微球体提高了流式细胞计的精度。

改进流式细胞计的校准的努力同时也导致了与校准有关的流式细胞计的参数的数量的增加。例如，流式细胞计测量系统的激光激发、探测器、以及电子会随时间变化，从而影响最终测量结果。因此，流式细胞计的这些参数，以及在某些场合下的其它参数，往往与校准方法有关。

其它的一些更加难以控制的参数同样影响流式细胞计的测量。样本速度就是一个这样的参数。Ortyn 等人的编号为 6,532,061 美国专利就描述了一个用于测量样本速度的方法的例子，该专利通过被引用而结合于此，如同在这里完整提出那样。在该方法中，对象夹带在流过感应或者测量空间的液体流中。在这些实施例的每一个中，具有大致统一的节距的光栅被用于调制从移动的对象接收到的光。该调制光被转换为电信号，电信号被数字化，然后进行快速傅利叶变换（FFT）以确定对象的速度。然而，Ortyn 等人的用于测量样本速度的方法和系统有一些缺陷。例如，这些方法需要相当复杂的光栅和软件。此外，由于光栅所要求的精密度以及其制造的复杂性，光栅可能相当昂贵。而且，由于诸如移动的对象造成所检测的光的光学畸变，可能会导致样本速度测量不那么精确。

然而，流式细胞计测量的最大误差通常是由温度变化造成的。此外，已经发现，现有的可行的校准方法不能够充分地说明温度变化对流式细胞计进行的测量的影响。例如，Ortyn 等人所描述的方法和系统尽管其试图校准一些参数，但并未考虑温度变化，以及这些变化将如何影响流式细胞计的测量。因此，尽管已经有很多不同的可行的校准方法，但还是可以通过更加精确地考虑在不同的流式细胞计测量中或是在单个的流式细胞计测量中的温度变化来对这些方法作出进一步的改进。

因此，发展用于对流式细胞计测量系统的至少主要的误差因素进行控制的方

法应该是有益的，这些方法可以被整合从而产生实时的校准方案。

发明内容

如前所细述的那样，通常最流式细胞计的最显著的误差因素是温度变化。由于温度可以是一个可测量的量，而且其效应背后的物理机理是已知的，因此有可能降低甚至是完全消除这些误差源中最关键的一环。

已经识别了一些测量误差的原因和对于这些测量误差原因的实时校正技术。此外，已经创建了一种使用校准微球体进行实时微调节的方法，其中校准微球体因直径与可能包含于微球体样本混合物中的待测物略有不同而可被识别。微调节过程的额外特征包括系统健康状态的实时识别、一个或多个通道中的非线性性的校正、和/或流式细胞计测量系统的有用的指示器动态范围的显著扩展。所描述的实施例可用于补偿主要由温度导致的系统变化，从而扩展了操作的校准范围。

此外，需要指出的是，此处描述了用于控制流式细胞计测量系统的一个或多个参数的方法的若干不同的实施例。要理解，每个方法都可单独被使用和执行。另外，两个或更多的方法可以被结合使用，这取决于例如测量系统的各种组件的可变性和/或测量系统的期望精度。

本发明的一个实施例涉及一种控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法。该方法包括在测量系统进行样本微球体的测量时，监测流式细胞计型测量系统的一个或多个参数。该方法还包括基于监测实时地改变所述一个或多个参数。

在一个实施例中，监测一个或多个参数可包括使用校准微球体的测量来监测一个或多个参数。校准微球体的直径与样本微球体的直径不同（例如，稍小）。在某些实施例中，该一个或多个参数可包括由测量系统的探测器所产生的输出信号。输出信号响应于由样本微球体所散射的光。

在另一个实施例中，监测一个或多个参数可包括使用校准微球体的测量来监测一个或多个参数。校准微球体的直径与样本微球体的直径不同（例如，稍小），并且至少部分校准微球体具有不同的光谱地址（spectral address）。在一个此类实施例中，所述一个或多个参数包括测量系统的动态范围。在另一个实施例中，对参数的改变可包括扩展测量系统的一个或多个通道的动态范围。在又一个实施例中，所述一个或多个参数可包括对系统健康状态的测量。系统健康状态的测量可包括分类通道的健康状态、指示器通道的健康状态、或者其结合。在某些实施例中，所述一个或多个参数可包括样本微球体的测量中的线性性。在这样一个实施例中，测量

可包括对分类通道的测量、对指示器通道的测量、或其组合。在另一个此类实施例中，对参数的改变包括在测量中大致地对任何非线性性进行校正。

在某些实施例中，参数可包括测量系统的雪崩光电二极管的参数。在一个此类实施例中，其方法还可包括使用经验获得数据来确定在改变参数时所要使用的校正因子。在另一个实施例中，参数可包括测量系统的光电倍增管的参数。

在还有一个实施例中，参数可包括样本微球体的速度。在一个此类实施例中，对参数的监测可包括监测样本微球体被置于其中的液体的温度，并根据该温度来确定样本微球体的速度。在某些实施例中，该方法还可包括在对样本微球体进行测量之前对一个或多个参数进行校准。前述方法的每一个实施例都可包括此处所述的任何其它步骤。

另一个实施例涉及控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的一种不同的方法。该方法包括监测最接近于流式细胞计型测量系统的温度。该方法还包括使用经验数据来响应于温度而改变测量系统的雪崩光电二极管的偏置电压，从而大致上校正由于温度所致的雪崩光电二极管的增益的变化。

在一个实施例中，其方法还包括通过在一个或多个温度下将一基本恒定的光级别施加到雪崩光电二极管上，并且记录在所述一个或多个温度下对于多个偏置电压的雪崩光电二极管的电流输出，从而产生经验数据。在另一个实施例中，对参数的改变是在测量系统进行样本测量之前进行的。在一个此类实施例中，偏置电压在样本测量过程中可基本保持恒定。在一个不同的实施例中，对参数的监测和改变是实时进行的。

在某些实施例中，其方法还可包括在发射出已知强度的光的校准微球体被测量系统测量的同时，改变雪崩光电二极管的偏置电压，直至从雪崩光电二极管获得一个预定的信号级别为止。在一个此类实施例中，其方法还可包括确定雪崩光电二极管在反向偏置电压下相应的相对电流、在预定信号级别下的偏置电压、以及温度。该方法的实施例还可包括使用相应的相对电流、温度、反向偏置电压、以及经验数据来确定偏置电压。前述的方法的每个实施例均可包括此处所述的任何其它步骤。

另一个实施例涉及控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的又一个方法。该方法包括监测最接近于流式细胞计型测量系统的温度。该方法还包括使用光电倍增管的特征曲线响应于温度而改变测量系统的光电倍增管的输出信号，从而基本上校正光电倍增管输出信号的增益变化。光电倍增管的增益响应于温度作近似线性变化。在某些实施例中，所述光电倍增管是测量系统的指示器通道的一部分。在

另一实施例中,光电倍增管的特征曲线随探测波长以及光电倍增管的阴极结构而变化。此处前述方法的每个实施例可包括此处所述的任何其它步骤。

另一个实施例涉及控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的一种方法的另一实施例。该方法包括将测量系统的光电倍增管电压设置为第一值和第二值。该方法还包括在第一值和第二值测量光电倍增管的输出电流。此外,该方法包括根据第一值和第二值的对数与第一值和第二值下输出电流的对数的相对关系来确定光电倍增管的校准电压。该方法还包括将该校准电压施加到光电倍增管上。该方法还包括测试该光电倍增管从而确定该光电倍增管的一个或多个参数是否在预定的容差内。前述方法的每个实施例均可包括此处所述的任何其它步骤。

还有一个实施例涉及控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的另一种方法。该方法包括使用逐次逼近来确定测量系统的探测器的校准电压。该方法还包括将该校准电压施加到探测器上。在一个实施例中,探测器可包括雪崩光电二极管。在一个不同的实施例中,探测器可包括光电倍增管。

在一个实施例中,其方法包括将校准电压与探测器的击穿电压相比较,如果校准电压超过了击穿电压则重复对校准电压的确定过程。该方法的一个不同的实施例包括收集和处理探测器样本以确定探测器信号级别。在一个此类实施例中,其方法可包括将探测器信号级别与校准目标信号级别相比较,如果探测器信号级别高于校准目标信号级别,则减低探测器的偏置电压,并且重复对校准电压的确定过程。在另一个此类实施例中,其方法可包括将探测器信号级别与校准目标信号级别进行比较,如果探测器信号级别不在校准目标信号级别的预定范围之内,则重复对校准电压的确定直至所有的期望的探测器电压级别都被尝试过为止。前述方法的每个实施例均可包括此处所述的任何其它步骤。

再一个实施例涉及控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的一种不同的方法。该方法包括对将会流经流式细胞计型测量系统的液体的温度进行监测。样本微球体被置于该液体中。该方法还包括根据液体在该温度下的粘度来确定测量系统中的样本微球体的速度。

在一个实施例中,其方法还包括基于速度来确定样本微球体之一将存在于测量系统的探测窗口中的时间长度。在某些实施例中,其方法可包括基于速度来确定样本微球体之一从测量系统的一个探测窗口移动到另一个探测窗口的时间长度。在另一个实施例中,其方法可包括基于速度来确定样本微球体之一何时会出现在测量系统的探测窗口中。在又一个实施例中,其方法包括控制测量系统的一个或多个探

测窗口的采样间隔从而对速度进行补偿。

在还有一个实施例中，监测参数和确定速度是在测量系统对样本微球体进行测量之前进行的。在某些实施例中，其方法可包括根据速度来确定测量系统的输出信号的一个或多个特性。在一个此类实施例中，其方法包括利用校正因子来校正由于速度所致的输出信号的误差。所述的校正因子是采用经验测量值来确定的。在另一个实施例中，测量系统被配置为在样本微球体的测量过程中维持液体的压力基本恒定。

在一个实施例中，确定速度包括从表、泊肃叶（Poiseuille）等式、或者从对应于温度的速度的预定值来确定速度。在词类的一些实施例中，该方法还可包括根据速度在样本微球体的测量过程中控制液体的压力。前述方法的每个实施例均可包括此处所述的任何其它步骤。

一种不同的实施例涉及控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的另一种方法。该方法包括测量微球体从流式细胞计型测量系统的第一探测窗口移动到测量系统的第二探测窗口的时间。该方法还包括改变测量系统的施加压力从而使得时间大致恒定。在一个实施例中，该时间是平均时间。微球体可以是样本微球体或者校准微球体。测量时间可包括在第一和第二探测窗口中测量被微球体所散射的光。在另一个实施例中，测量时间可包括用一个探测器测量在第一和第二探测窗口被微球体所散射的光。在第一和第二探测窗口中被微球体所散射的光可被一个分光器导向所述的一个探测器。该方法可以实时操作，也可以非实时地操作。前述方法的每个实施例均可包括此处所述的任何其它步骤。

还有一个实施例涉及控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的一种不同的方法。该方法包括测量微球体从流式细胞计型测量系统的第一探测窗口移动到测量系统的第二探测窗口的平均时间。微球体可包括样本微球体、校准微球体、或者二者兼而有之。该方法还包括将平均时间和参考微球体从第一探测窗口移动到第二探测窗口所用的参考时间进行比较。此外，该方法包括，如果平均时间和参考时间之间的差大于预定值，则改变测量系统的施加压力。

在一个实施例中，改变施加压力包括：如果平均时间大于参考时间则增加施加压力。或者，如果平均时间小于参考时间则减小施加压力。在某些实施例中，预定值被选择为对测量系统的已知的时间变化机制进行补偿。该方法可以实时地操作，也可以非实时地操作。前述方法的每个实施例均可包括此处所述的任何其它步骤。

附图说明

通过阅读以下的详细描述并参考附图，可以明显地获知本发明的其它目的和优点，其中：

图 1 是一示意图，举例描述可用于执行此处所述的方法的测量系统。

图 2 是举例描述示出作为温度的函数的具有 130 伏的反向偏置电压 (V60) 的 APD 的响应的多条偏置曲线的示图。

图 3 是描述作为温度的函数的各种 PMT 的响应的示图。

图 4 是举例描述作为 PMT 偏置电压的对数的函数的 PMT 增益的对数。

图 5 是一流程图，描述用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法的一个实施例。

图 6 是一示意图，描述可被用于执行此处所述的至少一个方法的测量系统的一部分的一个实施例的截面图。

图 7 描述可在此处所述的方法中的一个实施例中测量的脉冲群（即，在不同时间所测得的散射光）。

虽然本发明可采用各种修改和变化形式，其具体的实施例在图中以示例形式给出并且将详细进行描述。但应该理解的是，此处的附图和对其的详细描述并不是为了将本发明局限于此处所揭示的细节，相反，其应该覆盖所有落入如所附的权利要求中所定义的本发明的精神和范围内的修改、等效方法和变化。

具体实施方式

此处将描述用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法的若干不同的实施例。如上所提及的，可以单独使用和进行每个方法。此外，可以组合地使用或进行两个或更多的方法，这取决于例如，测量系统中的各种组件的可变性和/或测量系统的期望精度。

尽管此处对实施例的描述涉及的是微球体或者聚苯乙烯小珠，但应该理解的是，所述测量系统和方法也可以用于微粒子、金纳米粒子、小珠 (bead)、微珠 (microbead)、胶乳粒子、胶乳小珠、荧光小珠、荧光粒子、有色粒子、有色小珠、以及细胞 (cell)。微球体可以作为分子反应的载体。合适的微球体、小珠、以及粒子的例子被描述于 Fulton 的美国专利号 5,736,330、Chandler 等人的美国专利号 5,981,180、Fulton 的美国专利号 6,057,107、Chandler 等人的美国专利号

6,268,222、Chandler 等人的美国专利号 6,449,562、Chandler 等人的美国专利号 6,514,295、Chandler 等人的美国专利号 6,524,793、Chandler 等人的美国专利号 6,528,165，这些专利都通过被引用而完全结合于此。此处所述的测量系统和方法可以用于这些专利中所述的任何微球体、小珠、以及粒子。此外，用于流式细胞计的微球体可以从诸如得克萨斯州奥斯丁市的卢米尼克斯股份有限公司（Luminex Corp.）等的制造商处获得。术语“小珠（bead）”和“微球体（microsphere）”在此是可互换使用的。

图 1 举例描述可用于实现此处所述的方法的测量系统的一个示例。特别是，可以根据此处所述的方法来确定、监测、改变、和/或控制描述于图 1 中的测量系统的一个或多个参数。需要指出的是，此处所描述的图并不是按实际的尺度比例绘制的。特别地，图中某些元件的尺度被夸大以用于强调这些元件的特征。出于阐述清楚的考虑，测量系统的某些元件没有被包括在图中。

在图 1 中，沿着过微球体所流经的试管 12 的横截面的平面示出了测量系统。在一个例子中，试管可以是标准石英试管，比如用于标准流式细胞计中的那种。不过，任何其它适当类型的观察或输送室都可以被用于输送要分析的样本。测量系统包括光源 14。光源 14 可包括本领域已知的任何适当光源，比如激光器。光源可被配置为发射具有一个或多个波长的光，比如蓝光或绿光。光源 14 可被配置为在微球体流经试管的时候对其进行照射。照射会导致微球体发出具有一个或多个波长或波段的荧光。在某些实施例中，系统可包括一个或多个透镜（未示出），其被配置为将来自光源的光聚焦到微球体上或聚焦到流动路径上。系统也可包括不只一个光源。在一个实施例中，这些光源可被配置为以具有不同波长或波段的光（例如，蓝光和绿光）来照射微球体。在某些实施例中，这些光源可被配置为以不同的方向照射微球体。

从微球体前向散射的光可通过折叠式反射镜 18 或者另一种适当的光导组件引导到探测系统 16。或者，探测系统 16 可以直接放置在前向散射的光的路径上。如此，折叠式反射镜或者其它的光导组件可以不包含在系统中。在一个实施例中，前向散射的光可以由微球体以和光源 14 的照射方向成大约 180° 的角度所散射的光，如图 1 中所示。前向散射的光可以不与照射方向正好成 180° 角，从而来自光源的入射光不会撞上探测系统的感光表面。例如，前向散射的光可以是被微球体以与照射方向成小于或大于 180° 的角度所散射的光（例如，以大约 170° 、 175° 、 185° 、或者 190° 所散射的光）。

被微球体散射的、与照射方向成大约 90° 角度的光也可以被收集 (collected)。在一个实施例中, 该散射光可以被一个或多个分光器或者分色镜分为一个以上的光束。例如, 与照射方向成大约 90° 角度而散射的光可以被分光器 20 分为两束不同的光。这两个不同的光束可以由分光器 22 和 24 进一步分成四束不同的光。每束光可以被导入不同的探测系统, 这些探测系统中可包括一个或多个探测器。例如, 四个光束中的一个可以被导入探测系统 26。探测系统 26 可以被配置为探测由微球体所散射的光。

由探测系统 16 和/或探测系统 26 所探测到的散射光通常与光源所照射的粒子的体积成比例。因此, 探测系统 16 的输出信号和/或探测系统 26 的输出信号可被用于确定位于照射区域或者探测窗口中的粒子的直径。此外, 探测系统 16 和/或探测系统 26 的输出信号可被用于对粘在一起或者几乎同时通过照射区域的一个以上的粒子进行识别。因此, 这些粒子可以与其它样本微球体以及校准微球体相区别。而且, 探测系统 16 和/或探测系统 26 的输出信号可如此处所述地被用于基于尺寸的大小来区别样本微球体和校准微球体。

其它 3 个光束可被导入探测系统 28、30 和 32。探测系统 28、30 以及 32 可被配置为探测由微球体所发出的荧光。每个探测系统可被配置为探测不同波长或者不同波长范围的荧光。例如, 其中一个探测系统可被配置为探测绿色荧光。另一个探测系统可被配置为探测黄-橙色的荧光, 而其它探测系统则被配置为探测红色荧光。

在某些实施例中, 滤光器 34、36、以及 38 可以分别被耦合到探测系统 28、30 以及 32 上。滤光器可被配置为阻隔除了探测系统配置为要探测的波长以外的其它波长的荧光。此外, 一个或多个透镜 (未示出) 可以被光学地耦合到各个探测系统上。这些透镜可以被配置为将散射光或者发出的荧光会聚到探测器的感光表面上。

探测器的输出电流与碰撞到其上的荧光成比例, 并且产生电流脉冲。电流脉冲可以被转换为电压脉冲, 经过低通滤波, 然后由 A/D 转换器数字化。处理器 40, 比如 DSP, 对脉冲下的区域进行积分以提供表示荧光的大小的数。此外, 处理器可以执行此处所述的另外的功能 (例如, 对流式细胞计型测量系统的一个或多个参数进行监测, 基于所监测的参数来实时地改变一个或多个参数, 等等)。如图 1 中所示, 处理器 40 可以通过传输媒介 42 被耦合到探测器 26。处理器 40 还可通过传输媒介 42 和一个或多个其它组件 (如 A/D 转换器) 而间接地耦合于探测器 26。处理器可以类似的方式耦合到系统的其它探测器上。

在某些实施例中，由微球体所发出的荧光所产生的输出信号可以被用于确定微球体的身份（identity）以及有关发生在微球体表面的反应的信息。例如，探测系统的其中两个探测系统的输出信号可被用于确定微球体的身份，而另一探测系统的输出信号可被用于确定发生在微球体表面上的反应。因此，对于探测器以及滤光器的选择是可以变化的，这取决于结合或绑定于被测量的微球体和/或反应的染料类型（即，结合或绑定于反应中所涉及的反应物的染料）。

用于确定样本微球体的身份的探测系统（例如，探测系统 28 和 30）可以是 APD、PMT、或者其它光探测器。如这里所述，可以对 APD 实时地校正如这里所述的作为温度的函数的增益变化。用于识别发生于微球体的表面的反应的探测系统（例如，探测系统 32）可以是 PMT、APD、或者其它形式的光探测器。通过采用由 PMT 特征曲线所得出的一个简单乘数，PMT 可以被校正，其中所述 PMT 特征曲线可以如此处所述地被施加到 PMT 的输出信号上。探测器和测量系统还可以如此处所述地进行配置。

尽管图 1 所示系统包括具有两个不同探测窗口的两个探测系统，用于区分具有不同染色特性的微球体，但应该理解的是，该系统可以包括超过两个这样的探测窗口（例如，3 个探测窗口、4 个探测窗口，等等）。在这样的实施例中，系统可包括额外的分光器和额外的具有其它探测窗口的探测系统。此外，滤光器和/或透镜可被连接到各个所述的额外的探测系统上。

在另一个实施例中，系统可包括两个或更多个被配置为区分在微球体的表面上反应的不同材料的探测系统。不同的反应物材料可具有不同于微球体的染色特性的染色特性。

其它可用于执行此处所述的方法的测量系统的例子被阐述于 Chandler 等人的美国专利号 5,981,180，Chandler 等人的美国专利号 6,046,807，Chandler 等人的美国专利号 6,139,800，Chandler 等人的美国专利号 6,366,354，Chandler 等人的美国专利号 6,411,904，Chandler 等人的美国专利号 6,449,562，Chandler 等人的美国专利号 6,524,793 中，所有这些专利都通过被引用而完全结合于此。此处所描述的测量系统也可以按照这些专利中所述的方式来配置。

在流式细胞计型测量系统中，散射光和小珠身份探测通常是采用雪崩光电二极管（APD）作为光学传感器来进行的。APD 相比于其它探测器的优势在于，通过施加反向偏置电压，APD 的输出电流级别或者“增益”可以在较宽的范围内变化。所述的增益与施加的偏置电压的大小成比例，其中该增益可以按照由恒定数量

的入射光子所引起其流动的电子来表示。不幸的是，从入射光子到输出电子间的转换对温度的依赖性很强。因此，APD 相当依赖于温度，其程度比流式细胞计型测量系统中的任何其它元件都要高。

因此，一种控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法的一个实施例包括对最接近于流式细胞计型测量系统的温度进行监测。该方法还包括响应该温度而改变测量系统的 APD 的偏置电压。

每一个 APD 都由制造商额定了一个反向偏置电压（V60），在该电压下可以获得的输出电流比在大致相同照射下的硅二极管要大 60 倍。取决于个体器件，V60 的取值在几十伏到 100 伏以上。

由于 APD 的输出相对于温度而言是非线性的，因此不能在 APD 的整个操作范围内使用恒定的补偿因子。电流输出—温度的经验测量可以被用于研究一种全面的补偿方法。换句话说，可以采用经验数据来确定被用于改变 APD 的参数的校正因子。特别是，可以采用经验数据来改变 APD 的偏置电压，从而大致上校正由于温度所导致的雪崩光电二极管的增益变化。

为了用经验数据来表征 APD 的响应，在一个或多个温度下，将一个大致恒定的光级别施加到 APD 上。在一个或多个给定的温度下，记录在多个偏置电压下 APD 的电流输出。改变温度（例如，增加整数的度数），然后再次重复在多个偏置电压下的测量。所得到的数据集合（例如，如图 2 中所示）充分地描述了特定的 V60 器件的照明—电流随温度变化的曲线。为了获取多个不同器件的响应，可以对具有不同 V60 额定值的 APD 重复这些测量。

在一个实施例中，偏置曲线表可被用于依下述方法校正温度。在初始系统校准时，发射出已知强度的光的校准微球体被引入系统。该校准微球体流经系统，当校准微球体被测量系统测量时，偏置电压被改变直至从 APD 获得预定的信号级别。然后，使用探测器的 V60、在所述预定信号级别下的偏置电压、以及温度作为对 APD 响应表中索引，将 APD 的当前读数插入表中（R 值）。

在另一个实施例中，偏置曲线表可以依以下方式产生。可使用如发光二极管（LED）之类的恒定光输出源经由光缆远程地对 APD 的感光区域进行照射。APD 然后可以被放置在可以改变 APD 暴露于其中的环境温度的环境舱中。然后，当温度和施加给 APD 的偏置电压都变化时，测量系统将 APD 的电流输出（R 值）记录下来。

在正常的样本运行期间，可监测最接近于流式细胞计型测量系统的温度。然

后可使用期望的相对电流、温度、以及经验数据来确定偏置电压。例如，R 值、测得的温度、以及 V60 参数可以被用作 APD 响应表的输入以找出相应的偏置电压。如果测得的温度处于表格的条目之间，则将对应于最接近的温度条目的读数进行内插以获得最佳偏置电压。从表格中所获得的偏置电压被施加到 APD 上以校正其增益随温度的变化。由于样本运行的时间通常在两分钟内，而温度在这段时间内变化不大，所以通常情况下在样本运行的开始阶段进行单次偏置校正并且在运行的过程中维持该偏置就足够了。换句话说，可以在测量系统进行样本测量之前改变偏置电压，而在样本测量的过程中偏置电压可以基本恒定。然而，有可能最接近于测量系统的温度在样本运行的时候随时间被监测，而 APD 的偏置电压可相应地被改变。在这种方式下，对温度的监测以及对 APD 的偏置电压的改变是实时进行的。

某些流式细胞计型测量系统的指示器通道包括用作感光探测器的光电倍增管（PMT）。该指示器通道通常可被定义为用于识别在微球体表面发生的反应中涉及的材料或结合于微球体表面的材料的通道。PMT 产生与照射光电阴极的光的量、施加的偏置电压以及 PMT 内的内部倍增电极（internal dynode）的数量成比例的电流。在一个流式细胞计中，PMT 的偏置电压通常被用作对给定级别的荧光的电流输出进行归一化的“控制”点。目前所采用的用于在校准过程中获得归一化电压的方法是经验性的，进行测量，然后对有可能产生更接近于期望值的输出的 PMT 偏置设置进行有根据的推测。通常，在输出误差级别达到一个可接受的范围之前需要多次迭代。所以，缩短校准时间，从而降低用于寻找最佳 PMT 电压的校准试剂（reagent）的量是很有利的。下文中将描述若干不同的可以使得校准过程比现有情况更快的方法。

由于对于温度的大致线性的响应，相比 APD，PMT 补偿温度变化要简单得多。例如，一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法的一个实施例包括对最接近于流式细胞计型测量系统的温度进行监测。该温度通常在尽量接近 PMT 的位置测量，尽管由于 PMT 的温度变化率相对轻微，精确的位置并不是很关键。该方法还包括采用 PMT 的特征曲线来响应于温度而改变测量系统的 PMT 的输出信号，从而大致上校正 PMT 的输出信号增益由于温度所致的改变。PMT 的增益接近线性地响应于温度而改变。此外，PMT 的特征曲线会随着探测波长和阴极结构而变化。在这种方式下，在给定的探测波长和阴极结构下，PMT 对于温度的响应可以通过一个简单的线性关系来表示，如图 3 中所示，该图来自 Hamamatsu Photonics K.K 1994 年的《光电倍增管-理论到应用》（Photomultiplier tube – Principal

to Application)，在此将其完全地结合于此作为参考。

如前所述，由于 PMT 的增益随温度的变化要比 APD 的小得多，通常没有必要通过改变增益或者确定偏置电压来对器件进行补偿。相反，采用从诸如图 3 中所示的曲线那样的 PMT 特征曲线导出的简单乘数就足够了，其中所述曲线可以通过报告软件应用到最终的 PMT 读数上。

为了对 PMT 进行校准，具有已知荧光量的校准微球体被提供给仪器，并且从系统中流过，就像取得正常的样本那样。当测量系统对校准微球体进行测量时，改变偏置电压，直至获得预定的信号级别。

该方法是一种迭代过程，其中，一组微球体读数的统计值被计算出来，并且在获得期望的容差时终止该过程。如果误差不够小，那么前两次迭代的结果可被用于对下一个 PMT 偏置设定进行预测。在此过程中采用了一个线性等式： $y=m*x+b$ ，其中斜率 m 由在前的偏置和产生的荧光测量值来定义。如果 PMT 的偏置电压对电流增益的传递函数是线性的，可以直接获得最终结果，并由另一个测量来测试。然而，由于 PMT 的电压—电流增益传递函数随偏置电压增加而呈指数增长，线性方法仅仅在曲线的相对较小的一段内有效，因此需要若干次迭代以满足最终的容差要求。

有趣的是，当把 PMT 的电压—增益关系绘制在 $\log-\log$ 图表上（参见图 4）时，其传递函数呈现为一条直线。图 4 中的数据来自 Hamamatsu Photonics K.K1994 年的《光电倍增管-理论到应用》。

如早先所述的，内部倍增电极的数量和施加的偏置电压决定 PMT 的电流放大。对于固定的光级别，如等式 1 中所示，输出电流与 V 的 N 次幂成比例，其中 V 是施加的偏置电压， N 是内部倍增电极的数量，而 A 是包含了 PMT 的若干物理性质的比例常数。

$$i=A*V^N \quad (1)$$

对等式 1 的两边取对数，得到以下等式：

$$\log(i) = N*\log(V)+\log(A) \quad (2)$$

该式可以被写成简单和常见的一阶线性等式：

$$y=m*x+b \quad (3)$$

其中 $y=\log(i)$ ， $m=N$ ， $x=\log(V)$ ， $b=\log(A)$ 。使用对数转换后，现在就有可能仅采用三个样本测量来执行缩短的校准操作。

例如，在一个实施例中，一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个

参数的方法包括将测量系统的 PMT 的电压设置为第一值和第二值。该方法还包括测量在第一值和第二值的 PMT 的输出电流。此外，该方法包括从第一值和第二值的对数对第一值和第二值下的输出电流的对数来确定 PMT 的校准电压。该方法还包括将校准电压施加到 PMT 上，并且对 PMT 进行测试以确定该 PMT 的一个或多个参数是否在预定的容差之内。

以下由步骤 1—7 概括出这种方法的一个具体的例子：

1. 将 PMT 电压设置为最接近于或位于其范围的低端的值 ($V=V_L$)，并且获得一个测量值 ($i=i_L$)。
2. 将 PMT 电压设置为最接近于或位于其范围的高端的值 ($V=V_H$)，并且获得一个测量值 ($i=i_H$)。
3. 对所有四个值取对数。
4. 计算斜率 m 和截距 b 。
5. 求解目标 PMT 设置（在对数空间内） x_{cal} 。
6. 取 x_{cal} 的反对数以获得 PMT 校准电压 V_{cal} 。
7. 施加 V_{cal} ，并测试来确定是否满足期望的容差。

该方法已经过检验，每次均可成功地收敛在容差之内。如果没有满足容差，可以通过采用先前计算所得的 V_{cal} ， i_{cal} 和 V_H ， i_H 在对数空间生成新的斜率和截距，这样可能获得可接受的结果。点 V_{cal} ， i_{cal} 可能相对接近最终的 PMT 电压，只需要烟新的线进行较短的遍历 (traversal) 即可产生可接受的结果。在这种情况下，四个样本测量将被用于寻找适当的校准电压。

另一种用于校准流式细胞计型测量系统的探测器的方法使用逐次逼近法有利地减少了校准迭代的次数。在一个实施例中，一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法包括使用逐次逼近法来确定测量系统的探测器的校准电压，如图 5 中步骤 50 所示。当所有的校准电压都已被施加到探测器上却仍未获得成功的校准时，该方法将以失败退出校准，如步骤 52 中所示。由于探测器可以是 APD、PMT、或者任何其它适用于该测量系统的探测器，每个探测器电压可与探测器电压限值进行比较，如步骤 54 中所示。如果校准电压超过了该电压限值，可以通过至少重复步骤 50 来确定一个不同的校准电压。

如步骤 56、58 以及 60 中所示的，该方法将校准电压施加给探测器，从探测器收集数据，并可包括构件收集到的数据的直方图，计算直方图的峰值，并且将直方图峰值和校准目标峰值进行比较。如果直方图峰值足够接近于校准目标峰值，校

准就可终止，如步骤 62 中所示。

该方法还可包括确定直方图峰值是否在校准目标峰值之上，如步骤 64 中所示。步骤 64 的输出可被用于修正由步骤 50 中的逐次逼近法所产生的下一个校准电压。

尽管该方法在上文中相对于直方图进行了描述，但应该理解的是，可以采用任何合适的统计测量来进行该方法。例如，确定探测器信号级别的任何适当方法都可以被采用，这些方法可（但不需要）包括从小珠样本的集合来确定测量的统计方法，比如平均数，中值等。

特别是，逐次逼近法通过设置和清除命令字中的位，只尝试多达 N 次来使得测得的值等于目标值。在一个实施例中，该方法可包括收集和处理探测器样本来确定探测器信号级别。在另一个此类实施例中，该方法可包括将探测器信号级别和校准目标信号级别进行比较，如果探测器信号级别高于校准目标信号级别，则降低探测器偏置电压并重复对校准电压的确定。在又一个此类的实施例中，该方法可包括将探测器信号级别和校准目标信号级别进行比较，如果探测器信号级别不在校准目标信号级别的预定范围以内，则重复对校准电压的确定，直至所有所期望的探测器电压级别都已被尝试过为止。

这样一种方法的一个具体的例子包括以下步骤：

1. 将位掩码 (bit mask) 和 DacCmd 值初始化为 2^N 。对于 12 位 Dac (“数字-模拟转换器”)， $N=12$ 。在此例中，位掩码=4096，DacCmd 值=4096。该 Dac 可包括任何适当的 Dac，例如可从马萨诸塞州的诺伍德市的模拟设备有限公司 (Analog Devices, Inc.) 购得的 Dac。
2. 使用当前的掩码位来清除 DacCmd 中相应的位。我们驱动要么超出目标，要么超出探测器最大电压限值。
3. 将掩码向右移一位 (例如，移动到下一个最高有效位)。
4. 如果掩码是 0，则所有可能的位已经被检测而还没有获得充分的校准。该方法可进行到步骤 12。
5. 将掩码和 DacCmd 相或以设置下一个最高有效位。
6. 确定对应于 DacCmd 二进制值的探测器电压。将该探测器电压和探测器击穿电压或者最大电压相比较。如果该电压超过了探测器击穿电压，则回到步骤 2。
7. 将 DacCmd 值 (例如，所述电压) 发送给测量系统。

8. 等待电压变化生效。
9. 将新的直方图峰值和该通道的校准目标峰值进行比较。如果直方图峰值大于校准目标，则返回步骤 2。
10. 如果直方图峰值并不充分接近期望目标，则返回步骤 3。
11. 校准通过。方法结束。
12. 校准失败。方法结束。

在步骤 1—12 中所描述的示例性方法可包括此处所述的任何其它步骤。

某些流式细胞计型测量系统在小珠流经两个探测窗口时使用流体静力聚焦技术将其分离出来进行个别测量。测量窗口具有固定的大小和物理间隔。例如，在测量系统中的光源照射点之间的距离定义了所述间隔。

底层液体传送体的速度的变化会改变小珠位于探测窗口内的时间的长度，以及从一个窗口到下一个窗口的间隔时间的长度。最终的读数与小珠存在于每个探测窗口内的时间的长度是成比例的。此外，系统还使用窗口内传送时间来确定第二探测窗口何时有效（即小珠何时位于第二探测窗口中以待测量）。如果样本测量和实际小珠存在在时间上的对准不同于在校准期间所获得的值，或者在照明窗口中的持续（停留）时间不同，测量的精度就会下降。

如果测量系统被配置为在样本微球体的测量过程中维持液体的压力大致恒定，则温度的效果对于液体的速度变化造成的影响最大。粘度定义是液体的流动阻力的度量。每单位时间内以压力 P 流经直径 R 、长度 L 的管子的液体的容积可以由泊肃叶（Poiseuille）等式来表示：

$$V/T = (\pi * R^4 * P) / (8 * N * L) \quad (4)$$

其中 V/T 是单位时间的容积（与速度成比例），而 N 是以泊（poise）为单位的粘度。流动舱的毛细管，虽然其尺度为矩形而不是圆形，但可以被视为简单的管子。所以，如泊肃叶等式中所定义的，小珠速度与液体传送体的粘度成反比例。

用作流式细胞计型测量系统的小珠传送体的液体的主要成分是水。在 15°C 到 30°C 的操作温度范围内，粘度由 1.139 厘泊变化到 0.7975 厘泊，其具有 43% 的显著变化。以上的粘度值是从第 61 版的《物理化学手册》（Handbook of Chemistry & Physics）中的“水在 0 到 100°C 之间的粘度”（The Viscosity of Water 0 to 100°C ）中所得的。护层（sheath）和样本液体的速度如小珠的速度一样也变化了大约 43%。因此，操作温度可以被测量，然后被用于确定液体的粘度。相应地，可以从表、泊肃叶等式、或者速度—温度的预定值来确定液体的速度。在此类实施例中，该方

法可包括基于速度在样本微球体的测量期间控制液体的压力。

此外，液体的速度可以被用于确定小珠速度。同样，传送时间可以被实时地提取并校正。如果液体的温度在样本测量过程中基本上没有变化，对温度的监测和对速度的确定可以在测量系统对样本微球体进行测量之前进行。然而，该方法的这些步骤也可以实时地进行。

相应地，用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的一个方法包括对将流经流式细胞计型测量系统的液体的温度进行监测。样本微球体被置于该液体中。该方法还包括根据在所述温度下的液体的粘度来确定测量系统中的样本微球体的速度。在一些实施例中，该方法还包括基于所述的速度确定样本微球体的其中之一将出现在测量系统的探测窗口中的时间长度。在另一个实施例中，该方法包括基于所述的速度确定其中一个样本微球体从测量系统的一个探测窗口移动到另一个探测窗口的时间长度。此外，该方法可包括基于所述的速度确定何时其中一个样本微球体会出现在测量系统的探测窗口中。而且，该方法可包括控制测量系统的一个或数个探测窗口的采样间隔，从而对速度进行补偿。

窗口内传送时间可以被测量，并保存在系统的非易失性存储器中，或者保存在在初始校准过程中对系统进行控制的计算机中。所测得的传送时间然后可以被用于后续的样本运行中以适当地对第二探测窗口的采样间隔进行定时。窗口内传送时间可以被缩短或者延长以补偿粘度变化。校准系统时的温度与当前温度相对可用于确定要施加的校正量。温度对粘度因子的简表可以被存储在对系统进行控制的计算机或者系统的非易失性存储器中。在任一情况下，传送时间校正因子可以从所述的表计算而得，并且在样本运行开始之前施加。作为选择，任何其它在本领域内已知的适当方法也可被用于确定校正因子。

该方法还可以包括根据速度确定测量系统的输出信号的一个或多个特性。例如，小珠存在于探测窗口中的时间长度决定了探测器的输出电脉冲的幅度和形状。脉冲然后经过模拟低通滤波器，所述滤波器具有减小幅度和展宽脉冲宽度的显著效果。经滤波后的脉冲被数字化，脉冲下的区域被计算以得到与光级别大致成比例的值。

此外，该方法可包括使用校正因子对输出信号由于速度所致的误差进行校正。所述校正因子可以使用经验测量值来确定。采用经验测量值来构建用于由流速变化所致的脉冲宽度变化的校正因子的表是显而易见的。这张表可以被存储在系统的存储器中，或者是连接到系统的控制计算机中。

另一种对由于温度变化所致的速度变化进行补偿的方法是按照粘度的变化依比例地改变施加的液体压力。这会使得速度维持恒定，因此在每个测量窗口内，或者其之间的时间不会有明显的变化。可以实时地或在样本运行开始时实时地使用泊肃叶等式，或者经由从泊肃叶等式所计算出的预定表，或者通过其它的方法来进行该方法，从而动态地设置合适的压力。

这些方法已经证明对恒定压力方案提供了很大的改进，不过，可能希望对于温度变化的其它补偿。所以，此处描述了另一种方法，其可以与上述方法分开使用，或与上述方法结合使用，来提供一种微调机制。与上述的方法不同，该方法采用光学机制。此外，该方法可以使用测量和控制算法。然而，如此处所述的，撇开所附加的光学机制和算法不谈，该方法相对来说是便宜和快捷的。

当流式细胞计型测量系统的光学元件被装配时，照明点（例如，激光点）之间的距离被初始地设置。随着照明点（例如，或者是光束）间的距离减少，由于小珠在探测窗口间移动的距离较短，速度变化对于小珠传送时间的影响被最小化。

由每个光束的垂直光照分布（profile）（即在与微球体流经测量系统的方向大致平行的方向上的每个光束的分布）来进一步定义最小的间隔距离。例如，如果光束强度自峰到肩迅速地减小，而且没有第二最大值，就有可能将光束彼此相对接近地放置，因为从一个光源出来的光不会溢出到其它的光照点中。需要留意以避免交迭光束，因为这样的交迭会导致在分类和指示器通道之间需要采用复杂的补偿方案，从而就造成了灵敏度降低。

如前所述的，重要的是保持照明点之间的小珠传送时间基本恒定，该时间又基本上使速度以及微球体在各自的照明窗口内所花费的时间固定。

用于使小珠传送时间维持基本恒定的一个方法涉及实时地测量一个小珠通过两个探测窗口的平均时间，并且按需控制施加的压力以保持传送时间恒定。根据一个实施例，一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法包括对微球体从流式细胞计型测量系统的第一探测窗口运动到测量系统的第二探测窗口的时间进行测量。在一个实施例中，该时间可以是平均时间。所述微球体可以是样本微球体或者是校准微球体。对时间的测量可包括测量在第一和第二探测窗口中被微球体所散射的光。在另一个实施例中，对时间的测量可包括用一个探测器测量在第一和第二探测窗口中被微球体所散射的光。在一个此类实施例中，在第一和第二探测窗口中被微球体所散射的光被一个分光器导向一个探测器。该方法还包括改变测量系统的施加压力，从而使得时间基本恒定。该方法可以实时地操作。如上所述的

实施例可以包括此处所述的任何其它步骤。

不幸的是，大多数流式细胞计型测量系统的当前的光学设计使得其不可能对通过第二探测窗口的每个小珠进行探测，其中在第二探测窗口通常只有指示器荧光被测量，这是因为荧光发射（它是无法预先得知的）不会对于各个小珠都恒定，而且对于某些小珠而言非常可能是零。明显的解决之道是增加另一个光学探测器来测量由小珠所散射的第二光照源的光，不过这会对系统增加显著的成本，因为为了处理新信号，需要增加额外的电子和数字处理链。

所建议的方法则既简单又便宜，因为其涉及的是在两个探测窗口中采用同一个散射光探测器来测量散射。由于当前的光学布局防止了第二（指示器）窗口中的散射光到达散射探测器，因此必须重新置放探测器以使得其接收由小珠发射或者反射的所有光。这一步完成后，可由下游的电子设备分别辨认出与来自每个光源的散射大致成比例的清晰的峰。

图 6 描述了可以用于执行此处所述的方法的测量系统的一个实施例。如图 6 中所示，测量系统包括光源 70 和 72。光源 70 可以是例如发射的光波长大约为 639nm 的激光器。该激光器可适用于为测量系统的分类通道提供光照。光源 72 可以是例如发射的光波长大约为 532nm 的激光器。该激光器可适用于为测量系统的指示器通道提供光照。注意，每个激光器的照射区域并非与小珠流动的轴（未示出）相重合。其它的光源也可被用于上述的例子中。例如，依要被测量的样本的不同，光源及其波长可以改变。

如图 6 中所示，光源 70 和 72 均照射试管 74。特别地，光源 70 和 72 被配置为在小珠 76 流经试管 74 时对其进行照射。如图 6 中所进一步示出的，光源 70 和 72 可以被配置为以大致相对的角度来照射小珠。不过，应该可以理解的是，光源可以以任何合适的角度对小珠进行照射。

由于两个光源的照射而被小珠所散射的光可以被透镜 78 收集。透镜 78 可以包括本领域任何已知的合适的透镜。此外，透镜 78 可以由反射收集器（collector）所代替，或者可以不包含在该系统中。虽然图中显示透镜 78 以（相对于光源 70 和 72）大约 90° 的收集角来收集光，但应该理解的是，透镜可以被设置为与光源成任意合适的收集角度。

被透镜 78 所收集的光被引向分光器 80。分光器 80 可包括本领域任何已知的合适的光学组件，比如玻璃板或者是分光滤光器。分光器 80 被配置为将透镜收集的光的一部分引导给探测器 82。探测器 82 可被配置为对由于两个（或多个）光源

的照射而被小珠散射的光进行探测。在这种方式下，相对如前所提供的光源的例子而言，探测器 82 可被配置为探测由小珠所散射的、波长大约为 532nm 和 639nm 的光。该探测器可包括本领域任何已知的合适的探测器，比如 CCD 器件。

探测器 82 因此将探测单个小珠的两个不同的散射信号。这些散射信号在不同的波长下被探测，所述波长则基于光源的波长来决定。由于在小珠通过试管时，每个光源在不同时间内照射小珠，则不同的散射信号被探测的时间就可以被用来测量小珠或者微球体从测量系统的第一探测窗口移动到测量系统的第二探测窗口的时间。

此外，分光器 80 被配置为传输透镜所收集的光的其它部分。被传输的该部分光可被光学组件 84 引导给系统的探测子系统的分类部分 86。光学组件 84 可以包括例如折叠式反射镜、分光滤光器、局部透光镜、或者本领域已知的其它合适的组件。或者，取决于诸如探测子系统的分类部分的布置等因素，光学组件 84 可以不被包含在系统中。所述探测子系统的分类部分可包括本领域任何已知的组件。在某些实施例中，探测子系统的分类部分可以如图 1 所述的那样配置。被分光器 80 所传送的另一部分光可以被引导给探测子系统的指示器通道（未示出）。尽管该系统使用第一照射区域用于分类，使用第二区域用于指示器信号，不过在采用了该技术的设备中的使用方式不局限于这些实施例。荧光或者散射光可以被用于另一种用途，例如，对荧光指示器或者在细胞、小珠及其它粒子中的其它染料进行测量。

被分光器 80 引导给探测器 82 的荧光发射（如果其存在的话）将被加到散射信号，但其作用不是很重要，因为其幅度远小于散射光的幅度。如上所述的，图 6 中所示的实现方法采用分光器 80，其可以是波长分光器，它将散射的光重新引导给位置重置的探测器而不改变施加给分类探测器的光谱。显然，其它的实施例也是可能的。例如，可以想像，可以将探测器安排成使得不包含额外的部件。图 6 所示的系统还可以进一步依此处所述进行配置。

一种用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的方法的另一个实施例包括测量微球体从流式细胞计型测量系统的第一探测窗口移动到测量系统的第二探测窗口的平均时间。微球体可包括样本微球体、校准微球体、或者二者兼而有之。该方法还包括将平均时间和参考时间进行比较，所谓参考时间就是参考微球体从第一探测窗口移动到第二探测窗口的时间。该方法可以包括对参考时间的测量，也可以不包括这一步。此外，该方法包括，如果平均时间和参考时间的差异大于预定值，则改变测量系统的施加压力。在一些实施例中，可选择该预定值来补偿测量

系统的已知的时间变化机制。在一个实施例中，改变施加的压力包括，如果平均时间大于参考时间，则提高施加的压力。在一个不同的实施例中，改变施加的压力包括，如果平均时间小于参考时间，则降低施加的压力。该方法同样可以实时地进行。

上述的方法提供了一种直接地控制系统压力从而使得连续的散射脉冲之间的时间大致恒定的技术。利用由数字信号处理器或者其它合适的处理器所测得的采样信号，使用电子硬件（例如，计数器、数字比较器，等等）或软件可实现该技术。在任一实施例中，该方法是模拟的，得到相同的结果。以下在步骤 1-6 中提供该算法的高级描述，脉冲群的例子示于图 7。

1. 当在已知的压力和温度下校准系统时，测量连续的散射脉冲峰之间的平均传送时间，并保存以便以后参考。
2. 在正常样本获取过程中，来自红色激光器（或者第一个照射小珠的任何其它光源）的第一散射脉冲启动计时器。例如，如图 7 中所示，在 t_1 时刻，对应于具有 639nm 波长的激光器照射的散射脉冲被探测到。因此，计时器开始于 t_1 。
3. 当第二散射脉冲到达时，计时器停止。例如，如图 7 中所示，当对应于具有 532nm 波长的激光器照射的散射脉冲在 t_2 时刻被探测到时，计时器停止。
4. 计时器的值随后被用于和在校准操作期间所测得的传送时间相比较。
5. 如果计时器值明显高于校准时间，则压力源（例如，泵）的一个或多个参数会被改变以增加其压力。压力源的参数可以由处理器来改变。或者，如果 t_2 和 t_1 的差大于 t_{cal} ，则可增加压力源的压力。 t_{cal} 可以是定义小珠的传送时间的可接受变化量的预定值。
6. 如果计时器值明显低于校准时间，则压力源的一个或多个参数会被改变以降低其压力。所述一个或多个参数可以由处理器来改变。或者，如果 t_2 和 t_1 的差小于 t_{cal} ，则压力源的压力可以被减小。步骤 5 和步骤 6 中所用的 t_{cal} 具有相同值。

为了保持该“控制系统”相对稳定，有以下若干情况可被加以考虑。例如，可以进行该方法使得系统不被控制为对经过系统的每个小珠事件尝试或作出正向或者反向的压力校正。可以采用某些平均方法来补偿被称为“小珠抖动 (bead jitter)”的已知时间变化机制，该机制被认为至少是部分地由样本核心的速度梯度造成的。而且，应当谨慎地选择引起压力校正的时间误差的阈值。误差的幅度最好作为决定

压力校正量的控制器的输入。很可能的是可使用经典的积分-差分控制器来用于良好的操作。

虽然以上列举的校正因子可以被用于在样本微球体的测量之前对测量误差的主要部分进行校正,但在测量过程中也可以进行精细校正以补偿实施了上述技术之后可能存在的残留误差。例如,用于控制流式细胞计型测量系统的一个或多个参数的一个方法包括在测量系统对样本微球体进行测量时监测测量系统的一个或多个参数。该方法还包括基于监测到的参数实时地改变一个或多个参数。例如,如上所述,被监测且被改变的一个或多个参数可包括测量系统的 PMT 的参数。此外,使用该过程也可消除那些没有在本说明书加以标识的误差源。

流式细胞计型测量系统基于测得的微球体内的两个或多个染料的亮度(intensity)来识别通过系统的微球体。这一识别技术也可以被用于在所有通道中(指示器通道和分类通道两者)识别含有已知量的荧光强度的校准微球体。在校准微球体的测量结果已知之后,可以将精细校正因子施加给指示器和/或分类通道以用于样本微球体测量。

在区分校准微球体和样本微球体时可能导致该技术复杂化。例如,校准微球体的新的光谱地址可以基于染色级别组合而创建,但这会使得系统的多路处理能力降低 N-1。另一种技术通过使得校准微球体的直径大于或者小于样本微球体的直径而对其进行识别。

测量系统可以对被微球体所散射的和照射平面成 90° 角的光线进行测量。散射光的级别被用于识别那些可能粘在一起或者可能基本同时通过照射区域的多个微球体。例如,散射光通常与存在于照射区域内的所有粒子的体积成比例;因此,多个微球体要比单个微球体的散射信号更强。由于大多数的微球体通常作为单个对象通过照射区域,通过考虑群体事件,就容易识别不属于单个小珠的那些事件。通常,两个,有时为三个,微球体集合在一起并产生比单个微球体所产生的信号要强的信号。单个微球体的散射信号级别通常在化验进展期间进行,因为化验形式对于散射信号会产生影响。

较佳的情况下应该采用直径小于而不是大于样本微球体的直径的校准微球体,因为可以更容易地将校准微球体从通过照射区域的任意多的微球体组合中区分出来。因此,对测量设备的参数监测可以采用直径小于样本微球体的直径的校准微球体的测量数据来进行。此外,被监测和改变的一个或多个参数可以包括由测量系统的探测器所产生的输出信号,这些输出信号响应于由样本微球体所散射的光。例

如，如果校准微球体直径对样本微球体直径的比率已知，就也有可能使用校准微球体来对散射测量结果进行微调。

至少部分校准微球体也可具有不同的光谱地址。如此，一系列不同的校准微球体可以被用于增强上述的校准方法。例如，通过使用直径作为第一区别点，校准微球体的光谱地址可作为校准空间中的第二区别点，正如在样本空间里那样。具有多个校准级别可用于下面的实现中，这些校准级别在分类空间内被充分地分开以对微球体的身份加以辨别。

例如，可被监测和改变的一个或多个参数可包括样本微球体的测量中的线性性。监测或改变测量设备的参数的测量可包括测量系统的分类通道的测量。在此实施例中，对测量设备的参数的改变较佳地校正了测量中的任何非线性性。如此，多个校正级别可被用于探测和校正分级空间中的非线性性。当前的测量系统仅使用单点校准，因此由于系统非线性性所导致的误差就不能被校正。在以二维表示的双染料小珠系统中，该非线性性可以被当作基于分类微球体的被观测的位置的平面中分类空间的变体。对非线性性的校正改进了该平面中的微球体分类精度。该技术可以类似效果被扩展到任何维数。

多个校准级别也可以被用于探测和校正指示器信号的非线性性。类似于如上所述的技术，指示器通道在目前的测量系统中也可能经受单个校准点。对指示器通道中的非线性性进行探测和校正可如上所述进行操作。例如，在测量系统的参数被监测和改变期间所进行的测量可包括对于测量系统的指示器通道的测量。而且，在测量系统的参数被监测和改变期间所进行的测量可包括对于测量系统的指示器通道和分类通道的测量。如此，在分类和指示器通道中的非线性性可以大致同时地被监测和校正。

在另一个例子中，可被监测和改变的测量系统的一个或多个参数包括测量系统的动态范围。例如，多个校准级别也可被用于对系统的动态范围进行实时的确定。测量系统具有有限的线性范围。通过在一个或多个被唯一识别的校准微球体上使用不同的指示器校准级别，就有可能识别出探测器的探测下限和/或上限，在下限和上限处系统由于信号削波而变得非线性。

在某些实施例中，多个校准级别可被用于确定系统健康状态分类。如此，被监测和改变的一个或多个参数可包括测量系统健康状态。测量系统健康状态可包括分类通道的健康状态、指示器通道的健康状态、或者二者兼而有之。例如，如果上述的各个方法的集合不能就温度或者其它效应对系统进行补偿，校准微球体荧光分

类级别将会比其预期值更高。可以设置一个阈值级别，而校准微球体荧光分类级别可与该阈值相比较。如果校准微球体荧光分类级别落在阈值级别的选定的一侧，可向系统操作者提供或者向耦合于测量系统的计算机发送警告，告知测量结果是可疑的。所述警告可以是可视的输出信号和/或音频输出信号。在类似的方式下，多个校准级别可以被用于确定指示器系统健康状态。类似于对分类系统健康状态的确定，指示器系统中不可校正的误差可以被识别并报告给系统操作者或者与测量系统相连的计算机。

而且，多个校准级别可以被用于扩展指示器通道的线性动态范围。如此，改变测量系统的参数可包括对测量系统的指示器通道的线性动态范围加以扩展。通过包含存在于非线性区域内的若干明亮级别的校准微球体，有可能将实际测得的荧光级别映射到其线性等价量上。通过在各个校准微球体值之间内插，可以从校准数据构造出从测得的曲线到期望曲线的平滑映射。因此，如果采用该曲线对非线性区域内的样本微球体进行调整，系统的线性的、可用的测量范围可被显著地扩展。

在以上描述中，已经识别出若干测量误差因素（contributor）以及分别针对它们的实时校正技术。此外，还创建了一种使用小直径校准微球体的实时微调方法，其中所述的校准微球体可以被包含于微球体样本混合物中。微调过程的附加特征包括对系统健康状态的实时识别、对一个或多个通道中的非线性的校正、以及对于测量系统的可用指示器动态范围的显著扩展。

执行诸如这里所述的方法的程序指令可通过载体介质传送或存储于载体介质上。载体介质可以是诸如导线、电缆、或无线传输链路、或沿诸如导线、电缆或链路传播的信号之类的传输介质。载体介质可以是诸如只读存储器、随机存取存储器、磁盘或光盘、或磁带之类的存储介质。

在一个实施例中，处理器可以被配置为执行程序指令以实行根据上述实施例的由计算机所实现的方法。该处理器可以采取各种形式，包括采用数字信号处理芯片或现场可编程门阵列的专用处理板、个人计算机系统、大型计算机系统、工作站、网络设备、因特网设备、个人数字助理（PDA）、电视系统、或者其它设备。总之，术语“计算机系统”可以被宽泛地定义为包括具有一个或多个数字信号处理元件或者其它处理元件的任何设备。

程序指令可以以各种方式实现，包括基于过程的技术、基于组件的技术、和/或面向对象的技术，以及其它技术。例如，程序指令可以采用 ActiveX 控件、C++ 对象、JavaBeans、Microsoft Foundation Classes（“MFC”）、或者其它的技术或

方法来按需实现。在采用 FPGA 实现方式时，可以使用诸如 VHDL 的高级语言来设计嵌入于设备内的信号处理电路。

从本揭示中受益的那些本领域技术人员可以理解到：本发明被确信可以提供对流式细胞计型测量系统的一个或多个参数进行控制的方法。在参考本说明书的情况下，本发明的各方面的进一步的修改以及替换实施例对于本领域技术人员而言是显而易见的。因此，本说明书要被理解为仅仅是示例性的，其目的在于教导本领域技术人员实现本发明的总方式。应该理解的是，此处所示和所述的本发明的一些形式是当前的优选实施例。在受益于本发明的说明书的教导之后，本领域的技术人员将理解，此处所提及和描述的元件和材料可以被替换，部件和过程可被保留，而且本发明的某些特征可以被单独地使用。在不背离如所附的权利要求书中所描述的本发明的精神和范围的前提下，此处所述的元件可以被改变。

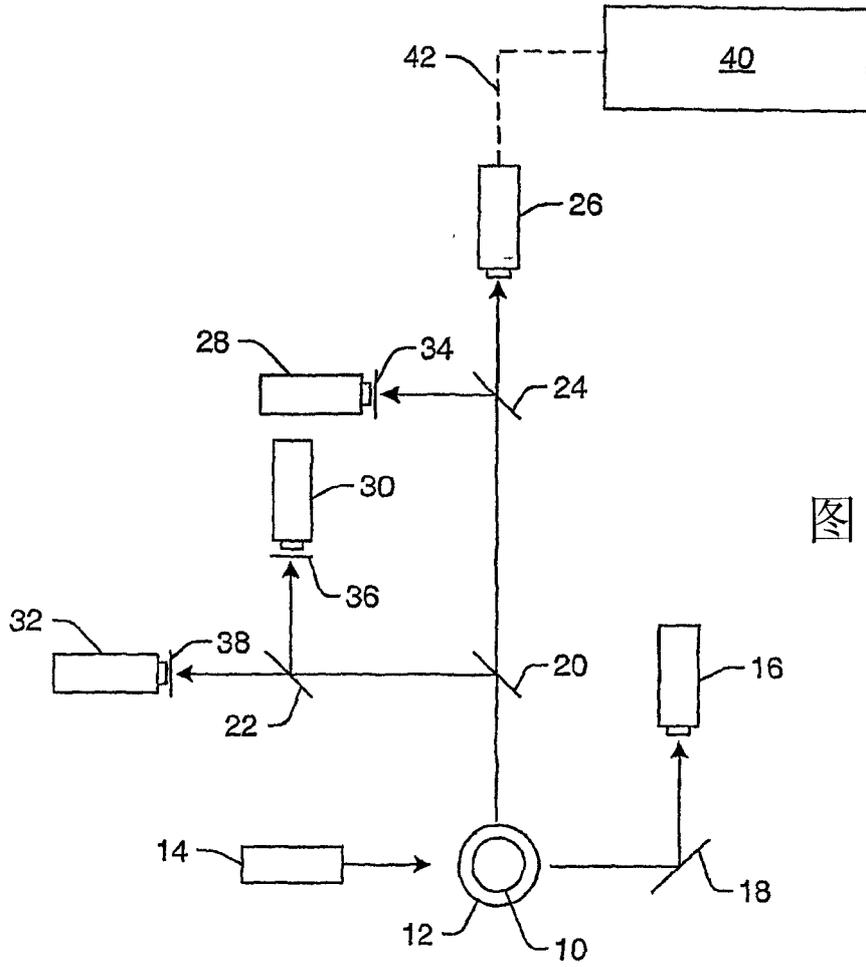


图 1

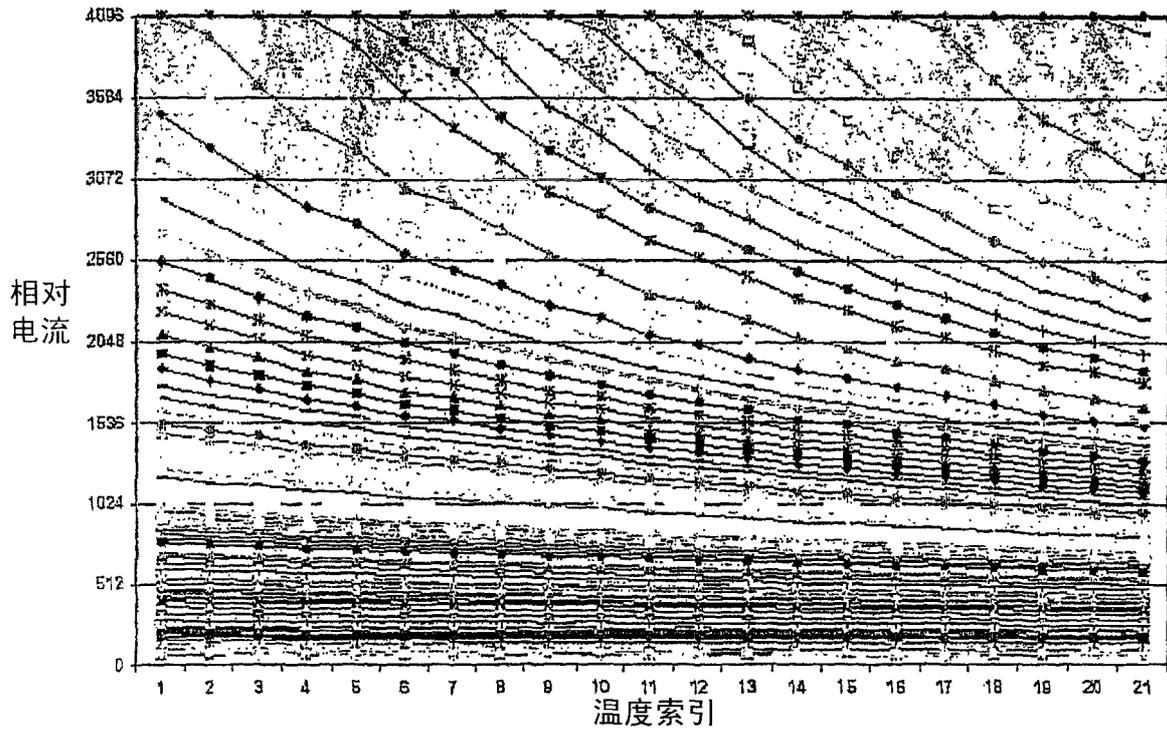


图 2

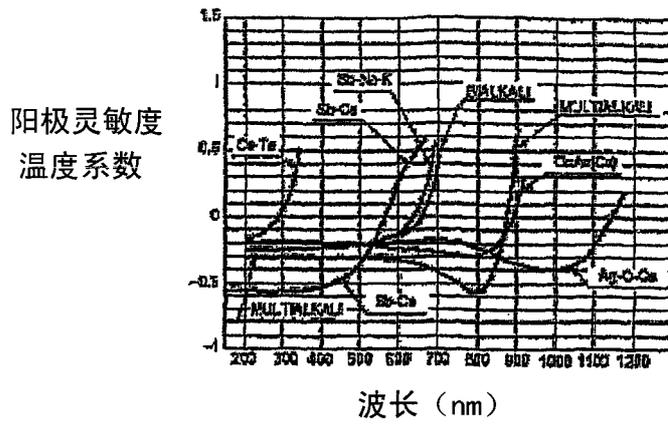


图 3

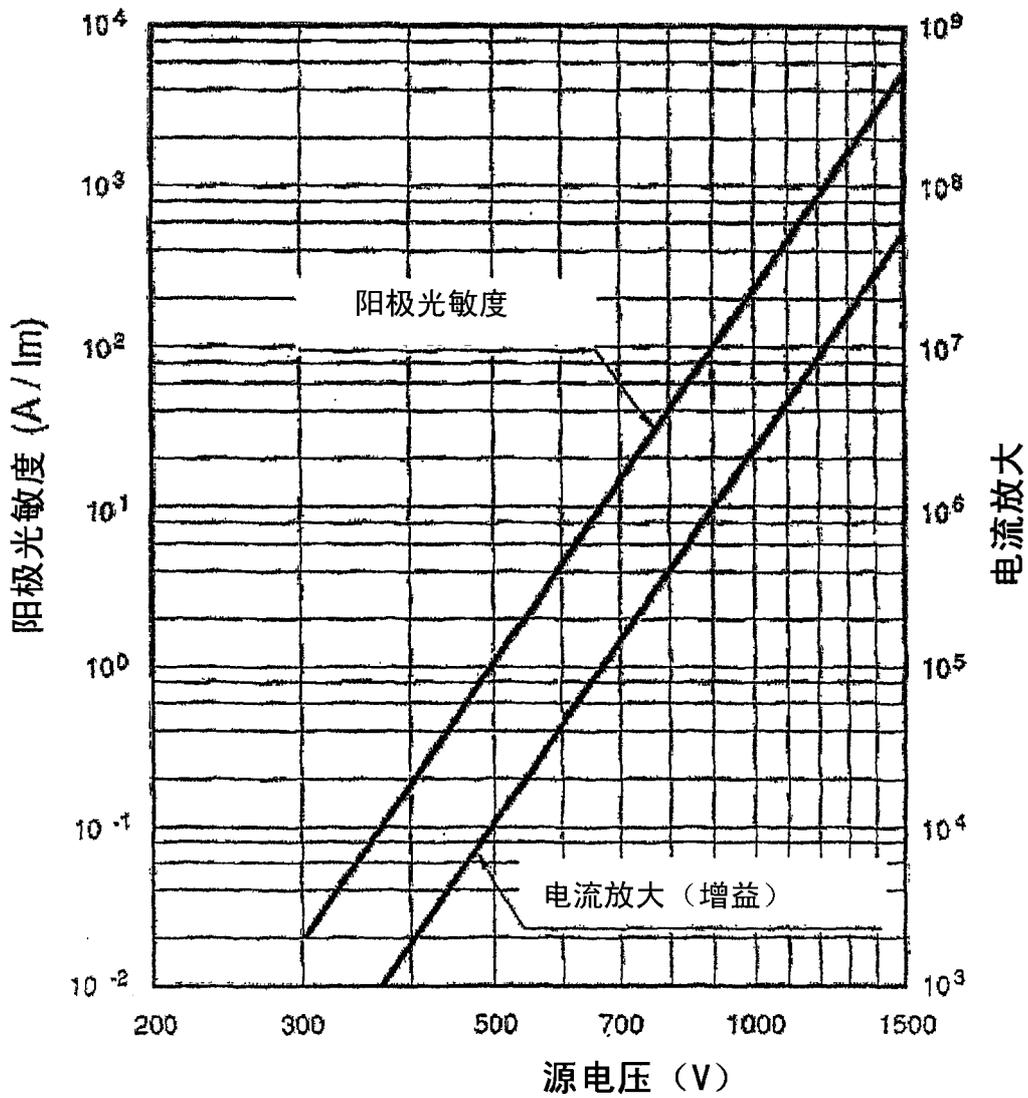


图 4

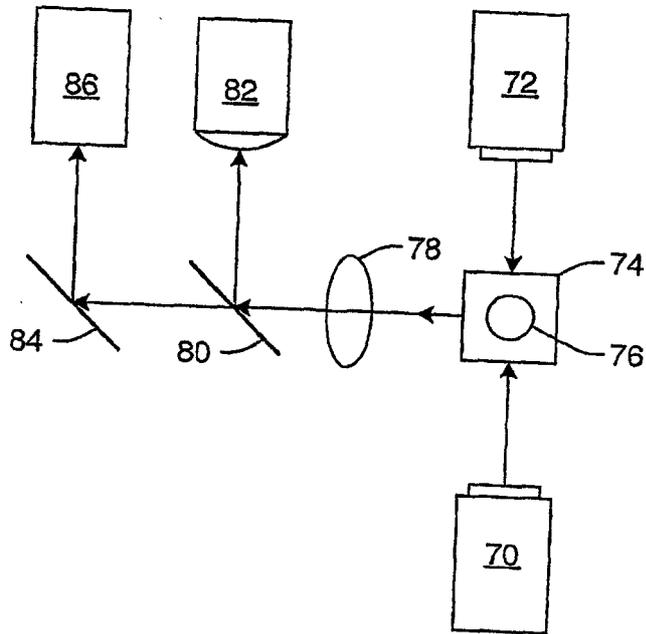


图 6

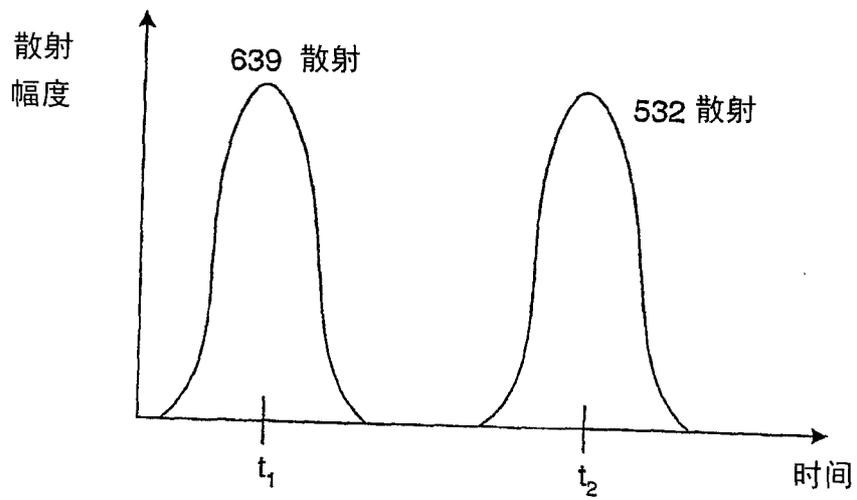


图 7