



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 107462327 B

(45)授权公告日 2020.06.09

(21)申请号 201710684328.3

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

(22)申请日 2012.09.12

代理人 余刚 吴孟秋

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107462327 A

(51)Int.Cl.

G01J 3/02(2006.01)

(43)申请公布日 2017.12.12

G01J 3/28(2006.01)

(30)优先权数据

G01N 15/14(2006.01)

2011-199901 2011.09.13 JP

审查员 王杰

(62)分案原申请数据

201280043375.5 2012.09.12

(73)专利权人 索尼公司

地址 日本东京

(72)发明人 新田尚

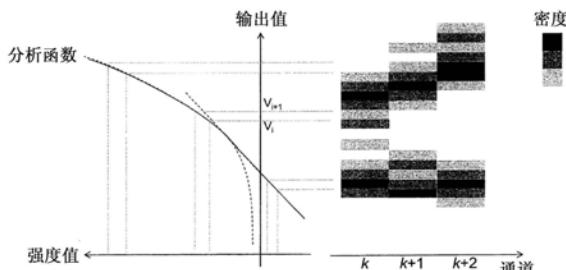
权利要求书2页 说明书12页 附图12页

(54)发明名称

光谱分析设备、光谱分析方法以及光谱图显示的方法

(57)摘要

本发明涉及光谱分析设备、光谱分析方法以及光谱图显示的方法。提供了一种光谱分析设备，包括处理单元，被配置为使用分析函数生成分析数据，在所述分析函数中，包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设置为来自测量数据的变量，所述测量数据包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量目标对象的光而获取的光的强度值。



1. 一种光谱分析设备,包括:

处理单元,被配置为以光谱图生成分析数据,在所述光谱图中,一个轴表示具有不同检测波长带的多个光接收元件的检测通道号,且另一轴表示分析函数的输出值,在所述分析函数中,包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设置为来自测量数据的变量,所述测量数据包括通过检测来自测量目标细颗粒的光而获取的光的强度值,

其中,至少具有长波长的检测通道的检测波长带宽比具有短波长的检测通道的检测波长带宽宽,

其中,所述处理单元被配置为通过应用对于测量数据中强度值小于预定值的数据线性函数被设为主函数以及对于测量数据中强度值大于预定值的数据对数函数被设为主函数的函数作为分析函数来生成所述分析数据。

2. 根据权利要求1所述的光谱分析设备,包括:

测量单元,被配置为检测从所述测量目标细颗粒发射的荧光,并将所检测的荧光的强度转换成电信号,以作为所述测量数据输出。

3. 根据权利要求2所述的光谱分析设备,其中,所述测量单元包括照射系统,所述照射系统将来自光源的光会聚/照射到所述测量目标细颗粒。

4. 根据权利要求3所述的光谱分析设备,其中,所述测量单元包括检测系统,所述检测系统包括:光谱分离元件,所述光谱分离元件光谱分离从所述测量目标细颗粒发射的荧光;和光接收元件阵列,检测光谱分离的所述荧光。

5. 根据权利要求4所述的光谱分析设备,

其中,所述测量目标细颗粒以一行被布置在形成在流动池中或微芯片上的流路内部并通过所述流路。

6. 根据权利要求4所述的光谱分析设备,

其中,所述光接收元件阵列包括具有不同检测波长带的多个独立检测通道的阵列。

7. 根据权利要求1所述的光谱分析设备,其中,关于所述测量目标细颗粒的数量的信息由色彩的灰度、色调表示。

8. 根据权利要求1所述的光谱分析设备,

其中,通过从包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量样本的光所获得的强度值的测量数据中减去包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自对照样本的光所获得的强度值的测量数据来校正背景值。

9. 根据权利要求2所述的光谱分析设备,其中,所述测量目标细颗粒被单染色、无染色或多染色。

10. 根据权利要求3所述的光谱分析设备,其中,所述光源的波长周围的所检测的荧光被限制以防止所述光源泄露。

11. 根据权利要求1所述的光谱分析设备,其中,所述处理单元根据每个光接收元件的检测波长带宽校正所述强度值并生成所述分析数据。

12. 一种细颗粒测量设备,包括:

根据权利要求1所述的光谱分析设备。

13. 根据权利要求12所述的细颗粒测量设备,其中,所述细颗粒测量设备是光谱流式细胞仪。

14. 一种利用流式细胞仪进行光谱分析的方法,包括:

以光谱图生成分析数据,在所述光谱图中,一个轴表示具有不同检测波长带的多个光接收元件的检测通道号,且另一轴表示分析函数的输出值,在所述分析函数中,包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设置为来自测量数据的变量,所述测量数据包括通过检测来自测量目标细颗粒的光而获取的光的强度值,

其中,至少具有长波长的检测通道的检测波长带宽比具有短波长的检测通道的检测波长带宽宽,

其中,通过应用对于测量数据中强度值小于预定值的数据线性函数被设为主函数以及对于测量数据中强度值大于预定值的数据对数函数被设为主函数的函数作为分析函数来生成所述分析数据。

15. 一种光谱分析设备,包括:

处理单元,被配置为使用分析函数来生成分析数据,在所述分析函数中,包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设置为来自测量数据的变量,所述测量数据包括通过使用具有不同的检测波长带的多个光接收元件检测来自测量目标细颗粒的光而获取的光的强度值,

其中,所述处理单元被配置为根据所述多个光接收元件的检测波长带宽度和相对灵敏度来校正所述强度值,

其中,所述处理单元被配置为通过应用对于测量数据中强度值小于预定值的数据线性函数被设为主函数以及对于测量数据中强度值大于预定值的数据对数函数被设为主函数的函数作为分析函数来生成分析数据。

## 光谱分析设备、光谱分析方法以及光谱图显示的方法

[0001] 本申请是国际申请日为2012年9月12日、国际申请号为PCT/JP2012/005780、发明名称为“光谱分析设备、细颗粒测量设备以及用于光谱分析或光谱图显示的方法和程序”的PCT申请的中国国家阶段申请的分案申请，该中国国家阶段申请的进入国家阶段日为2014年3月6日，申请号为201280043375.5。

### 技术领域

[0002] 本技术涉及光谱分析设备、细颗粒测量设备以及用于光谱分析或光谱图显示的方法和程序。更具体地，本技术涉及能够获得准确地反映测量目标对象的光学特性的光谱图的光谱分析设备等。

### 背景技术

[0003] 流式细胞仪是通过对流过流动池的诸如细胞、珠子等的细颗粒照射光并检测从细颗粒发射的荧光、散射光等来光学测量细颗粒的特性的设备。

[0004] 例如，当检测到细胞的荧光时，将具有适当波长和强度的激发光（诸如激光）照射到荧光燃料标记的细胞。通过透镜等将从荧光染料发射的荧光会聚，使用诸如过滤器或二向色镜的波长选择元件选择适当波长带的光，且使用诸如光电倍增管（PMT）的光接收元件检测所选择的光。此时，能够通过波长选择元件和光接收元件的多个组合同时检测和分析来自标记到细胞的多个荧光燃料的荧光。此外，还可以通过组合多个波长的激发光来增加可分析荧光染料的数量。

[0005] 在相关技术中，流式细胞仪的分析数据由直方图或二维（2D）图显示。虽然线性轴或对数轴一般被用作表示直方图和2D图中的光的强度值的坐标轴，但是也已知使用具有线性轴和对数轴组合的特性的双指数轴的技术（见NPL 1）。在使用双指数轴作为坐标轴的直方图和2D图中，利用对数轴的特性显示宽动态范围是可能的，且同时根据线性轴的特性显示负数也是可能的。

[0006] 在通过流式细胞仪进行的荧光检测中，除了使用波长选择元件（诸如过滤器）选择不连续波长带的多束光并测量每个波长带的光的强度的方法之外，还存在测量连续波长带中的光的强度作为荧光光谱的方法。在荧光光谱是可测量的光谱流式细胞仪中，使用光谱元件（诸如棱镜或光栅）光谱分离从细颗粒发射的荧光。使用其中布置了具有不同检测波长带的多个光接收元件的光接收元件阵列检测光谱分离的荧光。作为光接收元件阵列，使用PMT阵列或光电二极管阵列，在所述PMT阵列或光电二极管阵列中，诸如PMT或光电二极管的光接收元件被一维布置或以2D光接收元件（诸如电荷耦合器件（CCD）或互补金属氧化物半导体（CMOS））的多个独立的检测通道的阵列布置。

[0007] [引文列表]

[0008] [专利文献]

[0009] [PTL 1]

[0010] JP 2003-83894A

[0011] [非专利文献]

[0012] [NPL 1]

[0013] A New “Logicle” Display Method Avoids Deceptive Effects of Logarithmic Scaling for Low Signals and Compensated Data. *Cytometry Part A* 69A:541-551, 2006.

## 发明内容

[0014] [技术问题]

[0015] 除了直方图和2D图,还可由光谱图显示光谱流式细胞仪中的分析数据。在光谱图中,在横轴上表示光接收元件的通道或检测波长,在垂直轴上表示光的强度值,且关于细颗粒的数量(计数事件或密度)的信息(总体信息)由色彩的灰度、色调等表示。根据光谱图,可以直观地识别细颗粒的荧光光谱和总体信息。

[0016] 在光谱图中,线性轴或对数轴在相关技术中被用作表示光的强度值的坐标轴。然而,使用对数轴的图具有如下限制,即,具有低强度值的细颗粒的光谱呈现出不合理高分散性,且负数未被显示。另一方面,存在一个问题,即,即使在使用线性轴的图中也难以区分具有低强度值的细颗粒的光谱形状。此外,在相关技术的光谱图中,没有适于通过减去从在对照样本(诸如未标记的细胞)中检测的强度值(背景值)导出的光谱分量来显示光谱的方法。

[0017] 期望提供用于显示宽动态范围和负数并获得适当反映从细颗粒产生的光的强度的光谱图的技术。

[0018] [问题的解决方案]

[0019] 根据本技术的一个实施方式,提供了一种光谱分析设备,包括:处理单元,被配置为使用分析函数生成分析数据,在所述分析函数中,包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设置来自测量数据的变量,所述测量数据包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量目标对象的光而获取的光的强度值。

[0020] 光谱分析设备包括,显示单元,被配置为在光谱图中显示分析数据,在所述光谱图中,一个轴表示对应于检测波长带的值而另一个轴表示分析函数的输出值。

[0021] 根据该光谱图,可显示包括负值的宽的动态范围,且可通过抑制色散显示适当表达测量目标对象的光学特性的光谱。

[0022] 在该光谱分析设备中,处理单元被配置为通过应用对于测量数据中强度值小的数据线性函数被设为主函数的元素以及对比测量数据中强度值大的数据对数函数被设为主函数的函数作为分析函数来生成分析数据。

[0023] 具体而言,处理单元可通过应用对于测量数据中强度值小于预定值的数据线性函数被设为主函数以及对于测量数据中强度值大于预定值的数据对数函数被设为主函数的函数作为分析函数来生成分析数据。在这种情况下,显示单元显示光谱图,在所述光谱图中,在输出值大于预定值的区域中输出值的轴被设为对数轴而在输出值小于预定值的区域中输出值的轴被设为线性轴。

[0024] 在光谱分析设备中,优选的是,处理单元被配置为在从包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量样本的光所获得的强度值的测量数据中减去包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自对照样本的光所获得的强度

值的测量数据之后,使用分析函数来生成校正的分析数据,在所述分析函数中,包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设为变量,且显示单元被配置为在光谱图中显示校正的分析数据。

[0025] 此外,在光谱分析设备中,测量数据可包括由光接收元件阵列检测和获得的光的强度值,在所述光接收元件阵列中,具有不同检测波长带的多个光接收元件被布置为光谱分离来自测量目标对象的光。在这种情况下,处理单元优选校正每个光接收元件的检测波长带宽度中的强度值并生成分析数据。

[0026] 在根据本技术的光谱分析设备中,特别地,测量目标对象可以是细颗粒,且细颗粒的光学特性可被显示在光谱图中。在这种情况下,处理单元优选进行光谱图的多色显示。可根据色调、饱和度和/或反映细颗粒的频率信息的亮度进行多色显示。

[0027] 此外,根据本技术的光谱分析设备特别即使在微颗粒测量设备中也可被配置为光谱流式细胞仪。

[0028] 根据本技术的其它实施方式,提供了一种光谱分析法,包括:使用分析函数生成分析数据的过程,在所述分析函数中,包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设为来自测量数据的变量,所述测量数据包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量目标对象的光而获取的光的强度值;以及本发明提供了一种光谱图显示方法,包括显示光谱图的过程,在所述光谱图中,一个轴表示对应于检测波长带的值而另一个轴表示分析函数的输出值。

[0029] 根据本技术的另一些实施方式,提供了一种光谱分析程序,用于执行:使用分析函数生成分析数据,在所述分析函数中,包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设为来自测量数据的变量,所述测量数据包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量目标对象的光而获取的光的强度值;以及本发明提供了一种光谱显示程序,用于执行:显示光谱图中的分析数据,在所述光谱图中,一个轴表示对应于检测波长带的值而另一个轴表示分析函数的输出值。

[0030] 在本技术中,“细颗粒”包括生物相关的细颗粒,诸如细胞、微生物,和脂质体或合成颗粒,诸如胶乳颗粒、凝胶颗粒和工业颗粒。

[0031] 生物相关的细颗粒包括染色体、脂质体、线粒体和构成各种细胞的细胞器官。这些细胞包括动物细胞(诸如血细胞)和植物细胞。微生物包括细菌(诸如大肠杆菌)、病毒(诸如烟草花叶病毒),和真菌(诸如酵母)。此外,生物相关的细颗粒还可包括生物相关大分子,诸如核酸、蛋白质和它们的复合物。此外,工业颗粒例如可以是有机或无机聚合物材料或金属。有机聚合物材料包括聚苯乙烯、苯乙烯-二乙烯基苯、聚甲基丙烯酸甲酯等。无机聚合物材料包括玻璃、硅石、磁性材料等。金属包括胶体金、铝等。在一般情况下,这些细颗粒的形状通常是球形,但也可以是非球面。此外,尺寸、质量等没有特别限制。

[0032] [本发明的有利效果]

[0033] 根据本技术,提供了用于显示宽动态范围和负数并获得适当反映细颗粒所产生的光的强度的光谱图的技术。

## 附图说明

[0034] 图1是示出根据本技术的光谱分析设备A的功能配置的框图。

- [0035] 图2是示出光谱分析设备A的测量单元10的配置的示意图。
- [0036] 图3是作为示出分析函数的示图的替代的曲线图。
- [0037] 图4是作为示出其中水平轴表示PMT通道号而垂直轴表示分析函数的输出值的光谱图的示图的替代的曲线图。
- [0038] 图5是作为示出通过测量实例1中的混合样本所获得的光谱图的示图的替代的曲线图。
- [0039] 图6是作为示出根据色调反映图5中所示的光谱图中的珠子的频率信息的光谱图的示图的替代的曲线图。
- [0040] 图7是作为示出通过测量实例1中的混合样本的光谱图和背景值校正之后的混合样本的光谱图的示图的替代的曲线图。
- [0041] 图8是作为示出通过确定实例2中的PMT阵列的每个PMT的检测波长带所获得的结果的示图的替代的曲线图。
- [0042] 图9是作为示出通过计算实例2中的PMT阵列的每个PMT的相对灵敏度所获得的结果的示图的替代的曲线图。
- [0043] 图10是作为示出在实例2中通过使用荧光分光光度计测量所获得的荧光珠的光谱图的示图的替代的曲线图。
- [0044] 图11是作为示出在实例2中通过使用流式细胞仪测量所获得的荧光珠、荧光颗粒套盒(FPK) 505的光谱图的示图的替代的曲线图,其中,曲线图(A)示出校正处理前的图,曲线图(B)示出通过第一校正强度值的图,且曲线图(C)示出通过第二校正强度值的图。
- [0045] 图12是作为示出在实例2中通过使用流式细胞仪测量所获得的荧光珠、FPK 505的光谱图的示图的替代的曲线图,其中,曲线图(A)示出校正处理前的图,曲线图(B)示出通过第一校正强度值的图,且曲线图(C)示出通过第二校正强度值的图。
- [0046] 图13是作为示出在实例2中通过使用流式细胞仪测量所获得的荧光珠、FPK 528的光谱图的示图的替代的曲线图,其中,曲线图(A)示出校正处理前的图,曲线图(B)示出通过第一校正强度值的图,且曲线图(C)示出通过第二校正强度值的图。
- [0047] 图14是作为示出在实例2中通过使用流式细胞仪测量所获得的荧光珠、FPK 549的光谱图的示图的替代的曲线图,其中,曲线图(A)示出校正处理前的图,曲线图(B)示出通过第一校正强度值的图,且曲线图(C)示出通过第二校正强度值的图。
- [0048] 图15是作为示出在实例2中通过使用流式细胞仪测量所获得的荧光珠、FPK 667的光谱图的示图的替代的曲线图,其中,曲线图(A)示出校正处理前的图,曲线图(B)示出通过第一校正强度值的图,且曲线图(C)示出通过第二校正强度值的图。
- [0049] 图16是作为示出其中根据光接收元件的检测波长带宽度进行校正且水平轴表示通过测量实例1中的混合样本所获得的光谱图中的检测波长的图的图的替代的曲线图。

## 具体实施方式

[0050] 在下文中,将参考附图来描述本技术的优选实施方式。下文描述的实施方式是本技术的代表性实施方式。因此,本技术的范围不能被狭义地解释。将按下列顺序来给出描述。

[0051] 1. 光谱分析设备的配置

- [0052] 2. 分析数据的生成
- [0053] (1) 分析函数
- [0054] (2) 背景校正
- [0055] (3) 根据光接收元件的检测波长带宽度和相对灵敏度的校正
- [0056] <第一校正强度值的计算>
- [0057] <第二校正强度值的计算>
- [0058] 3. 数据显示
- [0059] 4. 光谱分析和光谱图显示的程序
- [0060] 1. 光谱分析设备的配置
- [0061] 图1是示出根据本技术的光谱分析设备A的功能配置的框图。此外,图2是示出光谱分析设备A的测量单元10的配置的示意图。在下文中,将描述其中光谱分析设备A被配置为光谱流式细胞仪的实例。  
[0062] 光谱分析设备A包括测量单元10,其通过对细颗粒照射激光来检测从细颗粒发射的荧光、将所检测的荧光的强度转换成电信号,并作为测量数据输出电信号;中央处理单元(CPU) 20;存储器30;和硬盘(存储单元) 40。在光谱分析设备中,CPU 20、存储器30和硬盘(存储单元) 40构成处理单元。此外,光谱分析设备A包括鼠标51、键盘52和被配置为包括作为用户界面的显示器61和打印机62的显示单元60。
- [0063] 测量单元10可具有与相关技术的细颗粒测量设备相同的配置。具体而言,测量单元10包括照射系统,其将来自光源101的光会聚/照射到细颗粒P;和检测系统,其包括光谱分离从细颗粒P发射的荧光的光谱元件(spectral element) 102,和检测光谱分离的光的光接收元件阵列103。在光谱分析设备A中,细颗粒P以一行被布置在形成在流动池中或微芯片上的流路内部并通过流路。
- [0064] 除了光源101之外,照射系统还包括用于将激光会聚/照射到细颗粒P的聚光透镜、分色镜、带通滤波器等(未示出)。光源101可以是发射具有不同波长的光的两个或更多个光源的组合。在这种情况下,两束或多束激光照射到细颗粒P的位置可以是相同的或不同的。此外,检测系统可包括用于会聚从细颗粒P生成的荧光并将光引导至光谱元件102的聚光透镜等(未示出)。在这里,使用PMT阵列的配置实例被示出为光接收元件阵列103,在PMT阵列中,以一维布置具有不同的检测波长带的32个PMT。具有不同检测波长带的多个独立检测通道的阵列(诸如光电二极管或2D光接收元件(诸如CCD或CMOS))也可用于在光接收元件阵列103中。
- [0065] 在光谱分析设备A中,除了荧光之外,测量单元10也可被配置为根据激光(例如前向散射光、侧向散射光以及瑞利散射、米氏(Mie)散射或等散射光)的照射检测从细颗粒P生成的光。
- [0066] 2. 分析数据的生成
- [0067] (1) 分析函数
- [0068] CPU 20和存储器30与存储在硬盘40中的操作系统(OS) 42和用于光谱分析和光谱图显示的程序41协作操作,并根据包括从测量单元10输出的荧光的强度值的测量数据使用分析函数生成分析数据。使用其中包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设为来自测量数据的变量的分析函数来生成分析数据。

[0069] 在这里,通过通道1至32的PMT中的通道k的PMT所获得的第n个强度值被定义为 $I_{[k,n]}$ ,此外,分析函数被定义为 $F(x)$ (其中x是变量)。在这种情况下,通过 $F(I_{[k,n]})$ 获得分析数据的输出值。

[0070] 在图3中,示出了分析函数 $F(x)$ 。在分析函数 $F(x)$ 中,对于强度值I小的数据,线性函数被设为主函数元素,而对于强度值I大的数据,对数函数被设为主函数元素。换言之,在分析函数 $F(x)$ 中,线性函数的元素被更强地应用于强度值I小的数据,而对数函数的元素被更强地应用于强度值大的数据。

[0071] 可以将诸如基于双指数技术的函数或Logicle函数的现有技术的一致的函数应用于分析函数 $F(x)$ (见NPL1)。更方便地,可以将其中对于强度值I小于预定值 $I_a$ 的测量数据区域RL线性函数被设为函数元素而对于强度值I大于预定值 $I_a$ 的测量数据区域RH对数函数被设为函数元素的函数用作分析函数 $F(x)$ 。更方便地,作为分析函数 $F(x)$ ,线性函数可应用于强度值I小于预定值 $I_a$ 的测量数据区域RL,而对数函数可应用于强度值I大于预定值 $I_a$ 的测量数据区域RH。

[0072] 在这种情况下,对于用作边界值的强度值 $I_a$ ,仅需要应用线性函数和对数函数中的一个作为函数元素。此外,期望分析函数 $F(x)$ 在测量数据区域RL和测量数据区域RH之间的边界处是连续的,且测量数据区域RL和测量数据区域RH中的分析函数 $F(x)$ 的斜率在边界值 $I_a$ 处是一致的。

[0073] 根据由分析函数 $F(x)$ 进行的测量数据的转换,可提供利用对数函数的特性的宽的动态范围,同时也可根据线性轴的特性获得包括负值的分析数据。边界值 $I_a$ 可被任意设置,只要表现出根据本技术的有益效果即可,且例如可根据上述的NPL 1中公开的方法设置。

[0074] (2) 背景校正

[0075] 当生成分析数据时,处理单元使用通过测量用于诸如细胞(未标记的细胞)的阴性对照的细颗粒(对照样本,其未被荧光染料标记)所获得的分析数据来校正背景值。通过从测量样本的测量数据中减去对照样本的测量数据值来校正背景值。

[0076] 通过通道1至32的PMT中的通道k的PMT所获得的第n个对照样本的强度值被定义为 $I_{o[k,n]}$ ,且测量样本的强度值被定义为 $I_{[k,n]}$ 。在这种情况下,通过从测量样本的强度值 $I_{[k,n]}$ 中减去对照样本的强度值 $I_{o[k,n]}$ ,即通过计算 $(I_{[k,n]}-I_{o[k,n]})$ 的值来校正背景值。

[0077] 优选使根据相减后的测量数据 $(I_{[k,n]}-I_{o[k,n]})$ 使用分析函数 $F(x)$ 来生成上述分析数据。

[0078] (3) 根据光接收元件的检测波长带宽度和相对灵敏度的校正

[0079] 此外,被配置为包括CPU 20、存储器30和硬盘40的处理单元通过根据每个光接收元件(在这里,是通道1至32的PMT)的检测波长宽度校正荧光的强度值来进行计算第一校正强度值的校正处理。此外,处理单元通过使用每个PMT的灵敏度数据校正第一校正强度值来进行计算第二校正强度值的校正处理。

[0080] <第一校正强度值的计算>

[0081] 通过由每个PMT获取的荧光的强度值除以每个PMT的检测波长带宽来实施第一校正强度值的计算。

[0082] 具体地,通过通道1至32的PMT中的通道k的PMT所获得的第n个对照样本的强度值被定义为 $I_{[k,n]}$ ,通道k的PMT的检测下限波长被设为 $L[k]$ 且检测上限波长被设为 $H[k]$ 。在

这种情况下,第一校正强度值 $J_1[k,n]$ 由下面的表达式计算。在这里,k表示1至32的整数。

[0083]  $J_1[k,n] = I[k,n] / (H[k] - L[k])$

[0084] 当包括光谱元件102的测量单元10的光学系统具有非线性时,由通道1到32的PMT检测的光的波长带宽度在PMT之间变的不同(见后面给出的图8)。因此,由每个PMT获取的荧光的强度值在检测波长宽度宽的通道中相对较大而在检测波长宽度窄的通道中相对较小,且光谱形状会出现失真。

[0085] 可以在通过由每个PMT获取的荧光的强度值除以每个PMT的检测波长带获得的第一校正强度值中补偿由于上述光学系统的非线性而引起的光谱形状的失真。

[0086] 每个PMT的检测波长宽度( $H[k] - L[k]$ )由构成测量单元10的光学元件,诸如分光元件102、聚光透镜、分色镜和带通滤波器的类型或布局唯一确定(见在后面给出的图8)。因此,在已经完成了包括光学元件的选择和布局的设备设计的步骤中,可以通过获取每个PMT的检测波长宽度来根据由每个PMT获取的荧光的强度值计算第一校正强度值。

[0087] <第二校正强度值的计算>

[0088] 通过每个PMT中的第一校正强度值除以每个PMT的相对灵敏度来实施第二校正强度值的计算。

[0089] 具体地,由通道1至32的PMT中的通道k的PMT的相对灵敏度被设置为 $S[k]$ 。在这种情况下,第二校正强度值 $J_2[k,n]$ 由下面的表达式计算。

[0090]  $J_2[k,n] = J_1[k,n] / S[k]$

[0091] 在这里,对于相对灵敏度,通过对PMT照射相同强度和相同波长的光在每个通道中获得的强度值由对其中已获得最高强度值的通道的强度值的相对值指示。可根据记录当相同强度和相同波长的光已经被照射到PMT时从每个通道输出的电信号量的灵敏度数据预先计算相对灵敏度。每个PMT中固有的灵敏度差和由用户对每个PMT设置的灵敏度差(增益)两者都反映在灵敏度数据中。增益可通过改变设置值(诸如施加的电压)来适当地调整增益。

[0092] 通道1至32的PMT的灵敏度根据PMT的个体差和增益设置差而在PMT之间是不同的(见在后面给出的图9)。因此,由每个PMT获取的荧光的强度值在灵敏度高的通道中相对较大而在灵敏度低的通道中相对较小,从而光谱形状出现失真。

[0093] 可以在通过由每个PMT的荧光的第一校正强度值除以每个PMT的相对灵敏度获得的第二校正强度值中补偿由于上述光学接收元件之间的灵敏度差而引起的光谱形状的失真。

[0094] 优选使用分析函数 $F(x)$ 根据第一校正强度值或第二测量强度值的校正处理之后的测量数据( $J_1[k,n]$ 或 $J_2[k,n]$ )生成上述分析数据。第一校正强度值或第二测量强度值的校正处理不限于以下方法:可为由如上所述的分析函数 $F(x)$ 转换前的测量数据进行该方法,且可为由分析函数 $F(x)$ 转换后的测量数据进行该方法。

[0095] 3. 数据显示

[0096] 处理单元生成其中一个轴表示对应于检测波长带的值而另一个轴表示分析函数的输出值的光谱图,并使得显示单元60显示光谱图。光谱图可具有水平轴,其表示通道号或作为对应于检测波长带的PMT的检测波长,而垂直轴表示分析函数的输出值(见后面给出的图5和图16的(C))。

[0097] 其中水平轴表示PMT的通道号且垂直轴表示分析函数的输出值的光谱图被示于图

4中。由通道k的PMT获得的第n个强度值被设置为 $I[k, n]$ ，且输出值被设置为 $F(I[k, n])$ 。计算包括在大于或等于 $V_i$ 并小于 $V_{i+1}$ 的输出值范围内的细颗粒的数量(事件计数或密度)，且对应于通道k和强度 $V_i$ 至 $V_{i+1}$ 的区域被涂有对应于计算结果的值的色调。通过对每个通道和输出值范围重复此过程来创建和显示在图中示出的光谱图。根据反映信息的色调、饱和度和/或亮度通过进行光谱图的多色显示来获得关于细颗粒的数量的信息(频率信息)。可通过相关技术中公知的技术来进行频率信息至色调、饱和度和/或亮度的转换(见实例)。

[0098] 在光谱图中，根据由分析函数 $F(x)$ 对测量数据的转换可以利用对数函数的特性显示宽的动态范围，并根据线性轴的特性也可以表达负输出值。此外，可以解决在强度值小的区域中以不合理的高分散性提取光谱的问题。

[0099] 此外，当已经在光谱图中进行了对垂直轴的分析数据值的上述背景校正时，即使在相减后的测量数据 $(I[k, n] - I_o[k, n])$ 成为负值时也可以显示光谱。

[0100] 优选根据上述光接收元件的检测波长带宽度和相对灵敏度校正垂直轴的分析数据值。由此，可以显示其中由于设备的光学系统的非线性和光接收元件之间的灵敏度差而引起的光谱形状失真已经被补偿的图。当进行了根据光接收元件的检测波长带宽度等的校正时，光谱图的水平轴表示PMT的检测波长(见后面给出的图11至图15的(B) / (C))。

[0101] 在光谱图中，可以通过基于以预定检测波长预定荧光强度值检测的细颗粒的数量(事件计数或密度)的平均值、标准误差、中值或四分位点的统计数值等来显示强度值(见后面给出的图12)。此外，光谱图也可被显示为三维(3D)图，表示事件计数的坐标轴已被添加到该图中。可根据伪3D显示来显示这种3D图。

[0102] 4. 用于光谱分析和光谱图显示的程序

[0103] 根据本技术的光谱分析程序和光谱图显示程序在上述光谱分析设备中执行生成分析数据并显示数据的步骤。

[0104] 程序(参见图1中的参考标号41)被存储/保留在硬盘40中并在CPU20和OS 42的控制下被加载到存储器30。该程序执行生成分析数据和显示数据的过程。程序可被记录在计算机可读记录介质中。记录介质没有特别限制，只要该记录介质是计算机可读记录介质即可。具体地，例如，可使用软盘或盘形记录介质(诸如小型光盘只读存储器(CD-ROM))。此外，也可使用磁带记录介质，诸如磁带。

[0105] 此外，本技术也可以被配置如下。

[0106] (1) 一种光谱分析设备，包括：

[0107] 处理单元，被配置为使用分析函数来生成分析数据，在所述分析函数中包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设为来自测量数据的变量，所述测量数据包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量目标对象的光而获取的光的强度值。

[0108] (2) 根据(1)所述的光谱分析设备，包括：

[0109] 显示单元，被配置为以一个轴表示对应于检测波长带的值而另一个轴表示分析函数的输出值的光谱图显示分析数据。

[0110] (3) 根据(2)所述的光谱分析设备，其中，处理单元通过其中对于所述强度值小于所述测量数据中的预定值的数据所述线性函数被设为主函数元素的函数以及对于所述强度值大于所述测量数据中的所述预定值的数据所述对数函数被设为主函数元素的函数应

用为分析函数来生成分析数据。

[0111] (4) 根据 (2) 或 (3) 所述的光谱分析设备, 其中, 处理单元通过将所述线性函数的元素作为分析函数更强地应用至强度值小于预定值的数据以及将所述对数函数的元素作为分析函数更强地应用至强度值大于测量数据中的预定值的数据来生成分析数据。

[0112] (5) 根据 (4) 所述的光谱分析设备, 其中, 显示单元显示光谱图, 在所述光谱图中, 在输出值大于预定值的区域中, 所述输出值的轴被设为对数轴, 而在输出值小于预定值的区域中, 所述输出值的轴被设为线性轴。

[0113] (6) 根据 (2) 至 (5) 中任一项所述的光谱分析设备,

[0114] 其中, 在从包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自测量样本的光所获得的强度值的测量数据中减去包括通过使用具有不同检测波长带的多个光接收元件检测来自对照样本的光所获得的强度值的测量数据之后, 处理单元使用分析分析函数来生成校正的分析数据, 在所述分析函数中, 包括作为函数元素的线性函数和对数函数且强度值被设为变量, 且

[0115] 其中, 显示单元以所述光谱图显示校正的分析数据。

[0116] (7) 根据 (1) 至 (6) 中任一项所述的光谱分析设备, 其中, 测量数据包括通过光接收元件阵列检测和获得的光强度值, 在所述光接收单元阵列中, 具有不同检测波长带的多个光接收元件被布置为光谱分离来自测量目标对象的光。

[0117] (8) 根据 (1) 至 (7) 中任一项所述的光谱分析设备, 其中, 处理单元根据每个光接收元件的检测波长带宽度校正强度值并生成分析数据。

[0118] (9) 根据 (1) 至 (8) 中任一项所述的光谱分析设备,

[0119] 其中, 测量目标对象是细颗粒, 且

[0120] 其中, 细颗粒的光学特性以光谱图显示。

[0121] (10) 根据 (1) 至 (9) 中任一项所述的光谱分析设备, 其中, 显示单元进行光谱图的多色显示。

[0122] (11) 根据 (9) 或 (10) 所述的光谱分析设备, 其中, 显示单元根据反映细颗粒的频率信息的色调、饱和度和/或亮度进行光谱图的多色显示。

[0123] [实例1]

[0124] 1. 光谱图生成和背景校正

[0125] 制作配备了图2中所示的配置的测量单元的原型光谱流式细胞仪。作为光源, 使用波长为488nm的激光二极管和波长为638nm的激光二极管。此外, 作为光谱元件, 使用组合了多个棱镜的棱镜阵列。作为光接收元件阵列, 使用32个通道的PMT阵列。可光谱检测到波长500nm至800nm的荧光。

[0126] 使用该设备, 可测量从Sherotech公司获取的荧光珠、FPK 528、FPK505和FPK 549的混合样本以及未标记的阴性对照珠(空白珠)。在根据使用用于所获取的数据的统计软件R (<http://www.R-project.org/>) 进行的筛选来提取适当的群体之后, 可显示光谱图。

[0127] 结果示于图5中。曲线图(A)示出其中垂直轴表示作为对数轴的强度值I的图, 且曲线图(B)示出其中线性轴代表强度值I的图。曲线图(C)示出其中垂直轴在强度值I大于10,000的区域中被设对数轴而在强度值I小于10,000的区域中被设为线性轴的光谱图。水平轴表示PMT的通道号。在这里, 根据光谱图的灰度来指示珠频率信息。

[0128] 在曲线图(A)中示出的对数轴图中,其中荧光水平低的(暗)珠子的光谱的分散性被显示为非常大。此外,在曲线图(B)中所示的线性轴中,其中荧光水平高的(亮)珠子的光谱的分散性被显示为非常大且难以区分暗珠子的光谱形状。另一方面,在曲线图(C)中示出的混合轴图中,暗珠子的光谱不是非常宽,可显示其中分散性低的尖锐形状,且可在能够清楚地区分它们的状态下显示宽的动态范围的三种类型的珠子的光谱形状。

[0129] 此外,图6示出根据图5的曲线图(C)中示出的图中的色调反映频率信息的光谱图。曲线图(A)是通过使用统计软件R的“rainbow”函数进行到频率信息的色调、饱和度和/或亮度的转换而获得的图。曲线图(B)是通过使用统计软件R的“topo.color”函数进行到频率信息的色调、饱和度和/或亮度的转换而获得的图。曲线图(C)是通过使用统计软件R的“cm.colors”函数进行到频率信息的色调、饱和度和/或亮度的转换而获得的图。曲线图(D)是通过使用统计软件R的“terrain.colors”函数进行到频率信息的色调、饱和度和/或亮度的转换而获得的图。曲线图(E)是通过使用统计软件R的“heat.colors”函数进行到频率信息的色调、饱和度和/或亮度的转换而获得的图。曲线图(F)是通过使用统计软件R的“grey”函数进行到频率信息的色调、饱和度和/或亮度的转换而获得的图。在这些光谱图中,省略了通道20至32的PMT的测量结果的示图。

[0130] 图7示出通过进行其中从混合样本的测量数据中减去空白珠子的测量数据的背景校正所获得的结果。曲线图(A)至(C)示出其中垂直轴作为对数轴表示强度值I和 $I_0$ 的图,且图(D)至(F)示出其中垂直轴在强度值I或相减后的强度值( $I-I_0$ )大于10,000的区域中被设为对数轴并而在强度值I或强度值( $I-I_0$ )小于10,000的区域中被设为线性轴的光谱图。此外,曲线图(A)和(D)示出混合样本的光谱图,曲线图(B)和(D)示出空白珠子的光谱图,且图(C)和(F)示出背景校正后的混合样本的光谱图。

[0131] 在曲线图(F)中所示的图中,与曲线图(C)中所示的图相比,可以清楚地确认暗珠子的光谱形状。

[0132] 如从上述结果看到的,根据本技术的光谱分析设备,可提供包括负数的宽的动态范围且可显示适当地反映细颗粒所产生的光的强度的光谱图。

[0133] [实例2]

[0134] 2.根据光接收元件的检测波长带宽度和相对灵敏度的校正

[0135] 在图8中示出了在原型设备中确定检测波长带的曲线。在曲线图中,“X”表示每个通道的PMT的检测下限波长 $L[k]$ ,而“0”表示检测上限波长 $H[k]$ 。在这里,k表示为1至32的整数。每个PMT的检测波长带宽度( $H[k]-L[k]$ )被确认为与长波长侧的PMT一样宽。在检测638nm的波长周围的荧光的通道21之前和之后的PMT中,所检测的荧光还受到防止来自波长为638nm的光源的激光的泄漏的滤光器的限制。

[0136] 此外,通过计算每个PMT的相对灵敏度而获得的曲线图示于图9中。当通道32的强度值被设置为1时,相对灵敏度由相对值表示,在通道32中,通过对PMT照射相同强度和相同波长的光由通道获得的强度值中已经获得最高强度值。

[0137] 首先,使用F-4500荧光分光光度计(日立高新技术公司(Hitachi High-Technologies Corporation))测量市售的荧光珠的荧光光谱。作为荧光珠,使用从Sherotech公司获取的FPK 505、FPK 528、FPK 549和FPK 667四种类型。所获得的光谱图(标准光谱图)示于图10中。曲线图(A)示出FPK 505的荧光光谱,曲线图(B)示出FPK 528的荧光

光谱,曲线图(C)示出FPK 549的荧光光谱,且曲线图(D)示出FPK 667的荧光光谱。水平轴表示荧光波长(500nm至800nm),且垂直轴表示荧光强度值(对数表示)。激光的激发波长在曲线图(A)至(C)中是488nm的波长而在图(D)中是638nm的波长。

[0138] 接下来,使用原型设备测量荧光珠的荧光光谱。所获得的光谱图示于图11至图15中。图11和图12示出FPK 505的图,图13示出FPK 528的图。图14示出FPK 549的图,且图15示出FPK 667的图。在图11中,以光谱的颜色显示每个通道中的事件计数。此外,在图12中,由基于事件计数的平均值(由实线表示)和平均值±标准偏差(由虚线表示)显示强度值。

[0139] 在图11至图15的曲线图(A)中,示出其中水平轴表示通道号而垂直轴表示在每个通道中获取的荧光的强度值 $I[k]$ 的对数(其中k表示1至32的整数)的光谱图。

[0140] 图11至图15的曲线图(A)的光谱图中示出的光谱形状明显不同于图10中所示的标准光谱图的光谱形状。这表明,由于设备的光学系统引起的测量误差和光接收元件之间的灵敏度差,会在直接使用由PMT获取的荧光的强度值 $I[k]$ 的荧光光谱中出现光谱形状失真。

[0141] 在图11至图15的曲线图(B)中,示出其中水平轴表示检测波长而垂直轴表示在每个通道中获取的荧光强度值的第一校正强度值 $J_1[k]$ 的对数(其中k表示1至32的整数)。通过由每个PMT获取的荧光的强度值 $I[k]$ 除以图8中所示的每个PMT的检测波长带宽度( $H[k] - L[k]$ )获得第一校正强度值 $J_1[k]$ 。更具体地,通过由通道k的PMT获取的第n个强度值 $I[k, n]$ 除以PMT的检测波长带宽度( $H[k] - L[k]$ )以获得第一校正值 $J_1[k]$ 并在水平轴的 $L[k]$ 至 $H[k]$ 的范围内绘制 $J_1[k, n]$ 的分布来创建光谱图。

[0142] 图11至图15的曲线图(B)的光谱图中所示的光谱形状基本上与图10中所示的标准光谱图的光谱形状一致。这表明,可通过根据由每个PMT获取的荧光的强度值 $I[k]$ 除以每个PMT的检测波长带宽度( $H[k] - L[k]$ )的校正过程补偿由于设备的光学系统的非线性引起的测量误差来校正光谱形状的失真。

[0143] 在图11至图15的曲线图(C)中,示出其中水平轴表示检测波长且垂直轴表示在每个通道中获取的荧光强度值的第二校正强度值 $J_2[k]$ 的对数(其中k表示1至32的整数)。通过第一校对强度值 $J_1[k]$ 除以图9中所示的每个PMT的相对灵敏度 $S[k]$ 获得第二校正强度值 $J_2[k]$ 。

[0144] 图11至图15的曲线图(C)的光谱图中所示的光谱形状与图10中所示的标准光谱图的光谱形状一致。特别地,虽然在基于图11至图15的(B)的第一校正强度值 $J_1[k]$ 的光谱图中观看到假设由波长为500nm周围的区域中的PMT的灵敏度差引起的光谱形状的失真,但是可在基于图11至图15的曲线图(C)的第二校正强度值 $J_2[k]$ 的光谱图中校正该失真。这表明,可通过根据第一校对强度值 $J_1[k]$ 除以每个PMT的相对灵敏度 $S[k]$ 的校正过程补偿由于光接收元件之间的灵敏度差引起的测量误差。

[0145] 图16示出其中根据检测波长带宽度校正在实例1中获得的数据且水平轴表示检测波长的光谱图。在曲线图(C)中所示的混合轴图中,暗珠子的光谱不是非常宽,可显示其中分散性低的尖锐形状,且可以能够清楚地区分它们的状态显示宽的动态范围的三种类型的珠子的光谱形状。

[0146] 本领域技术人员应理解,根据设计要求和其它因素,可以进行各种修改、组合、子组合和变形,只要它们在所附权利要求或其等同替换的范围内。

[0147] [工业实用性]

[0148] 在根据本技术的光谱分析设备中,可以显示宽的动态范围和负数并获得适当反映测量目标对象的光学特性的光谱图。根据本技术的光谱分析设备可被适当应用于细颗粒测量设备(特别是光谱流式细胞仪),其用于进一步详细分析细胞等的细颗粒的光学特性。

[0149] [参考标号列表]

[0150] A光谱分析设备 P细颗粒 10测量单元 101光源102光谱元件 103光接收元件阵列 20CPU 30存储器40硬盘(存储单元) 41荧光强度校正程序 420S 51鼠标 52键盘 60显示单元 61显示器 62打印机。

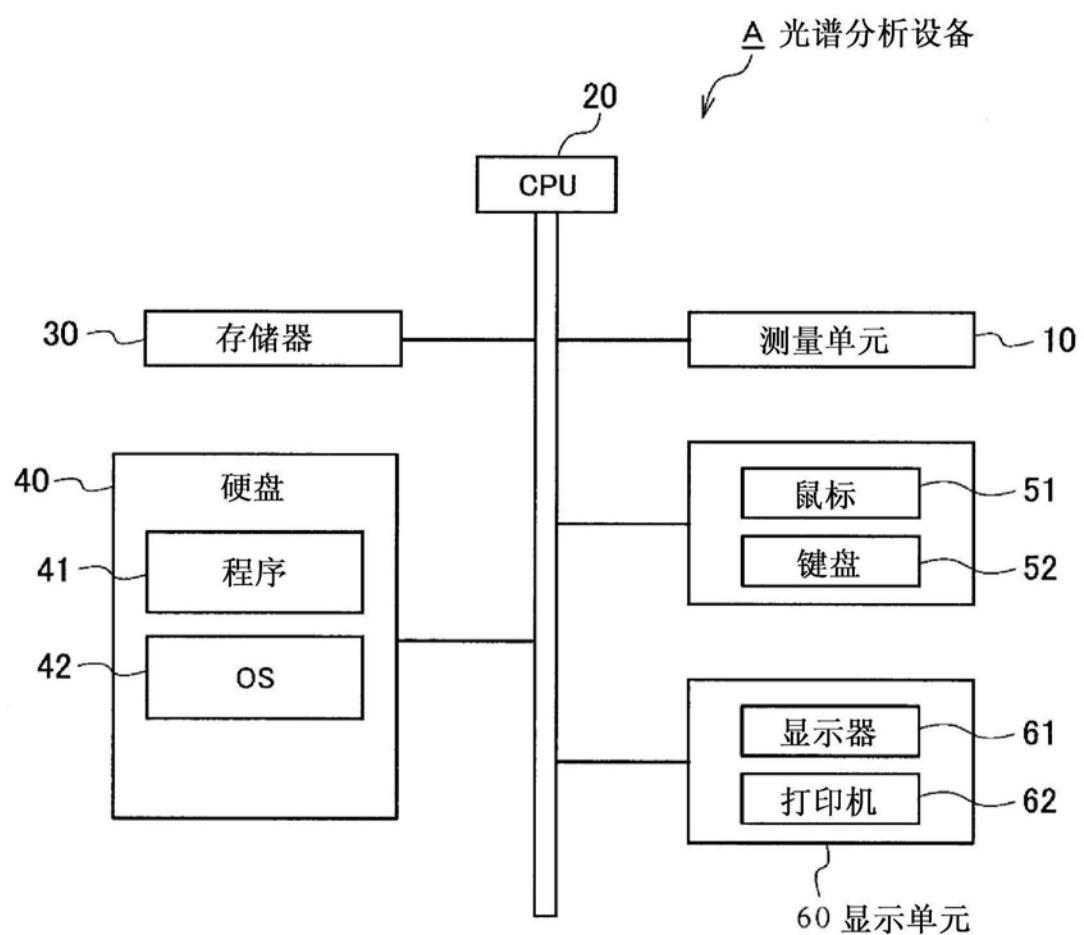


图1

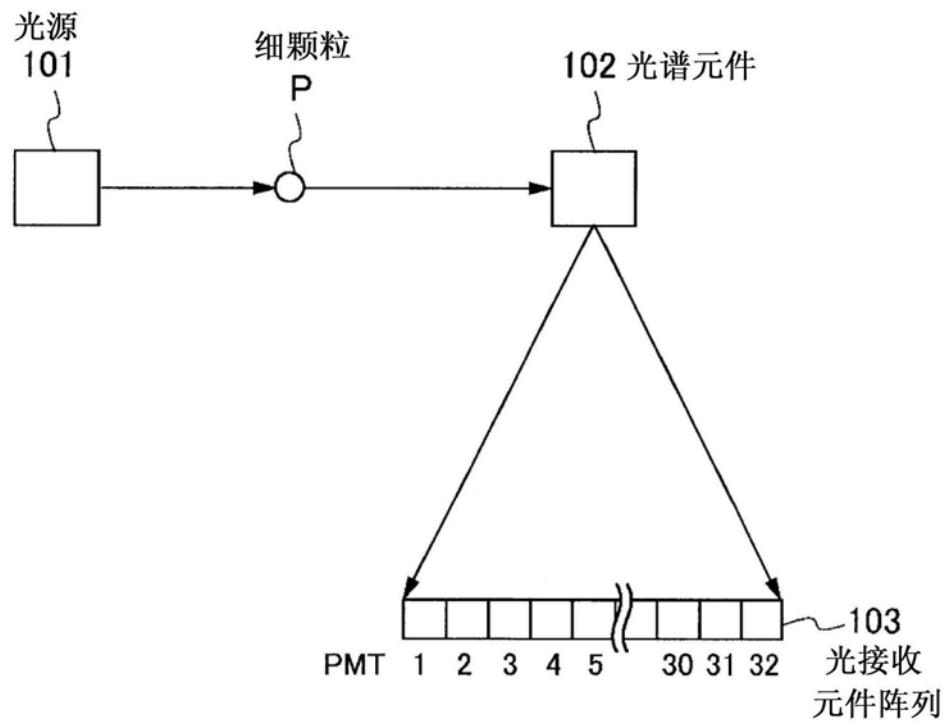


图2

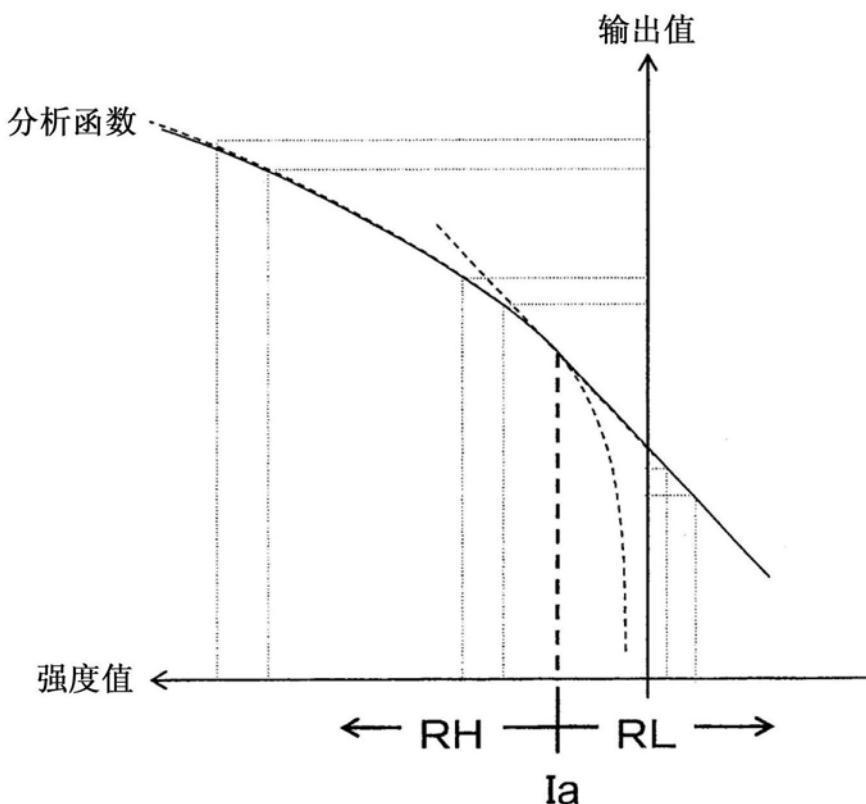


图3

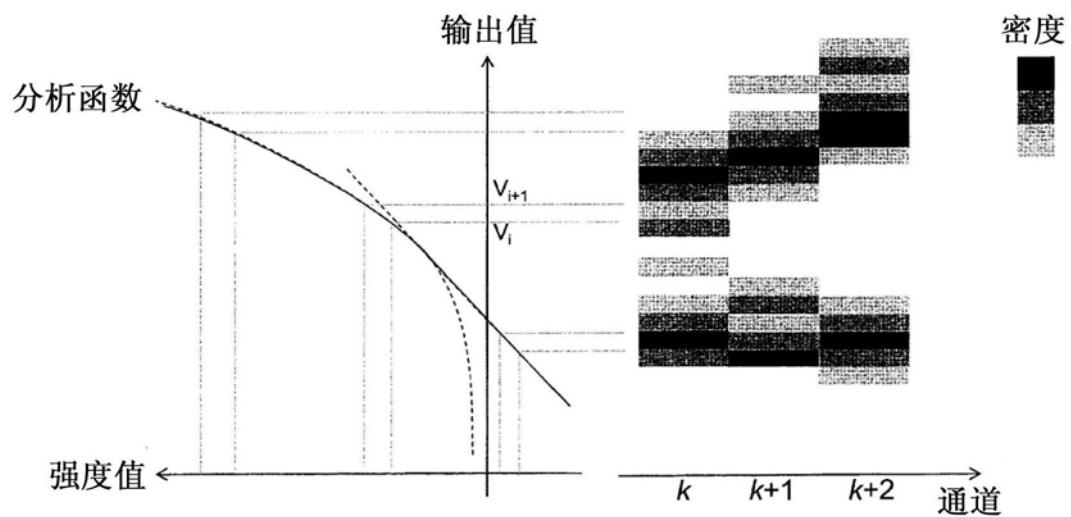


图4

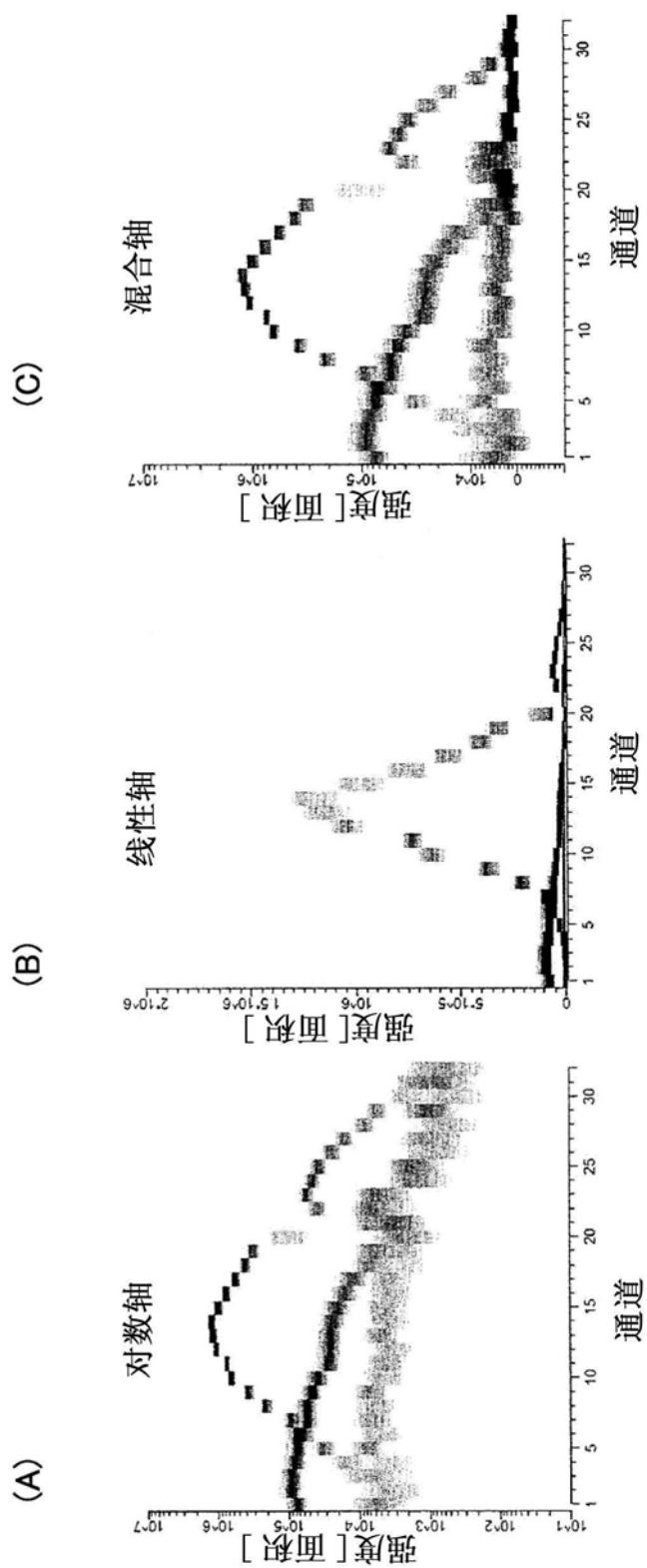


图5

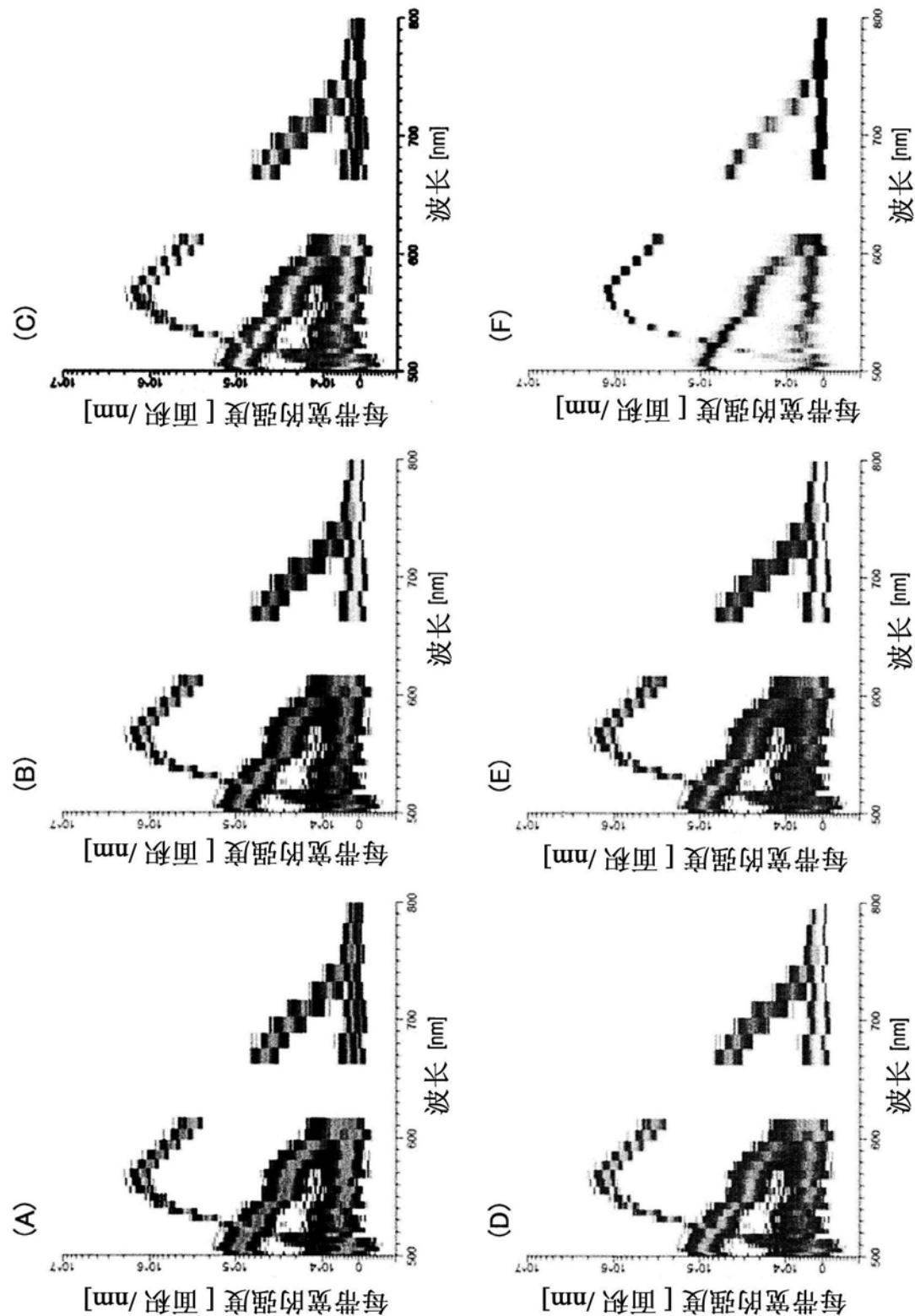


图6

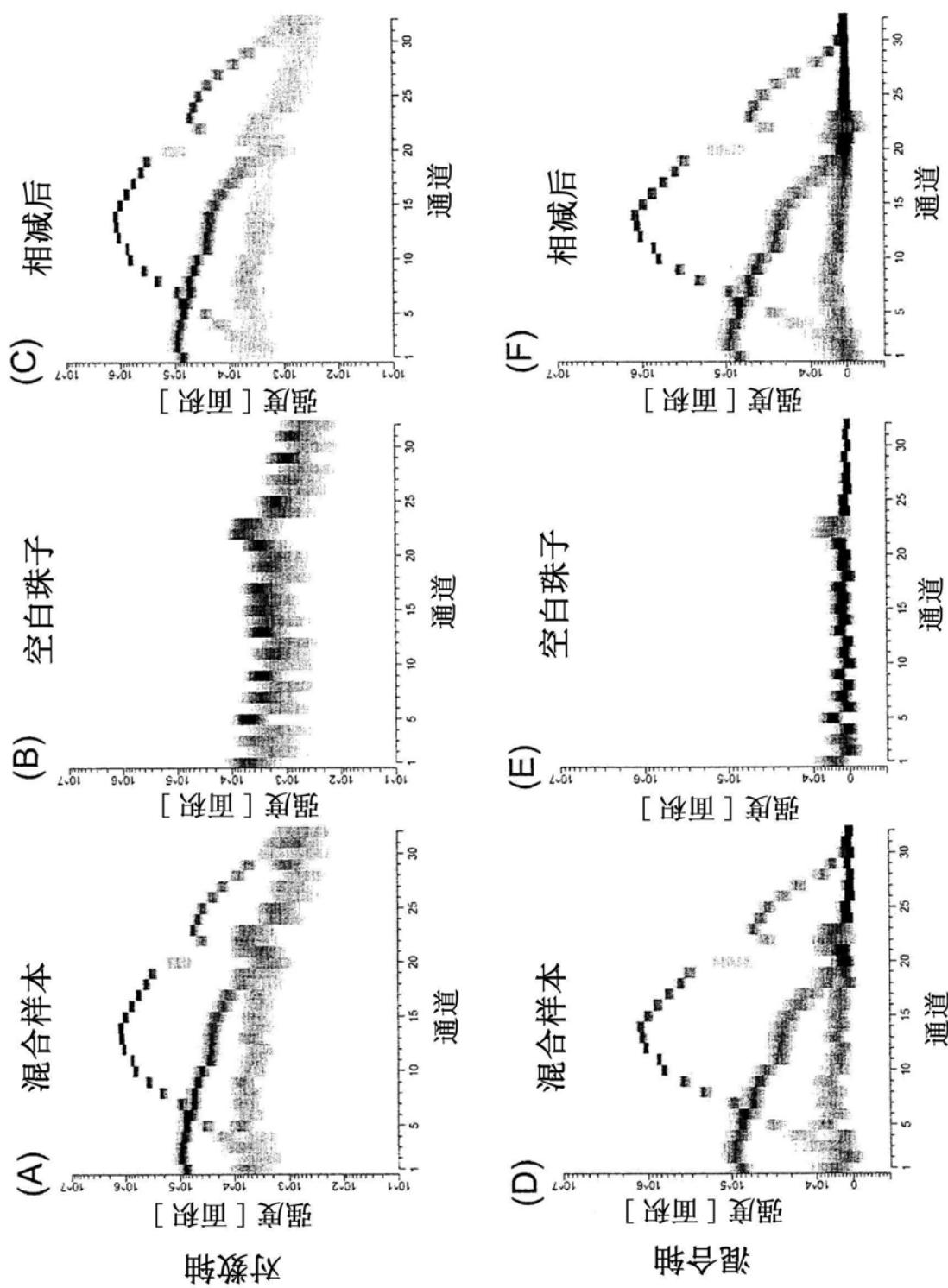


图7

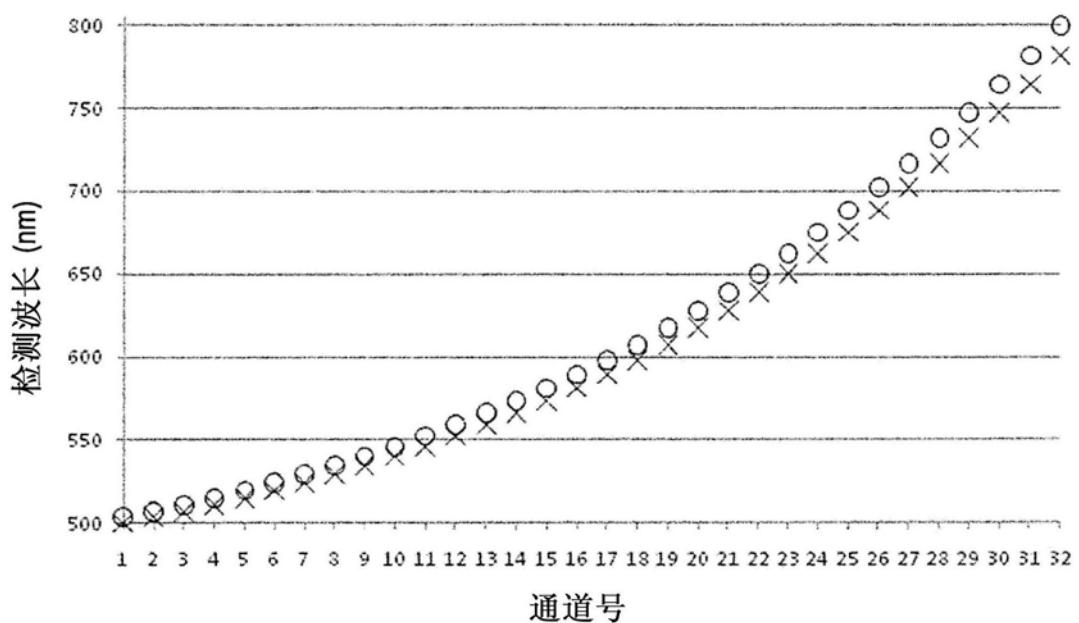


图8

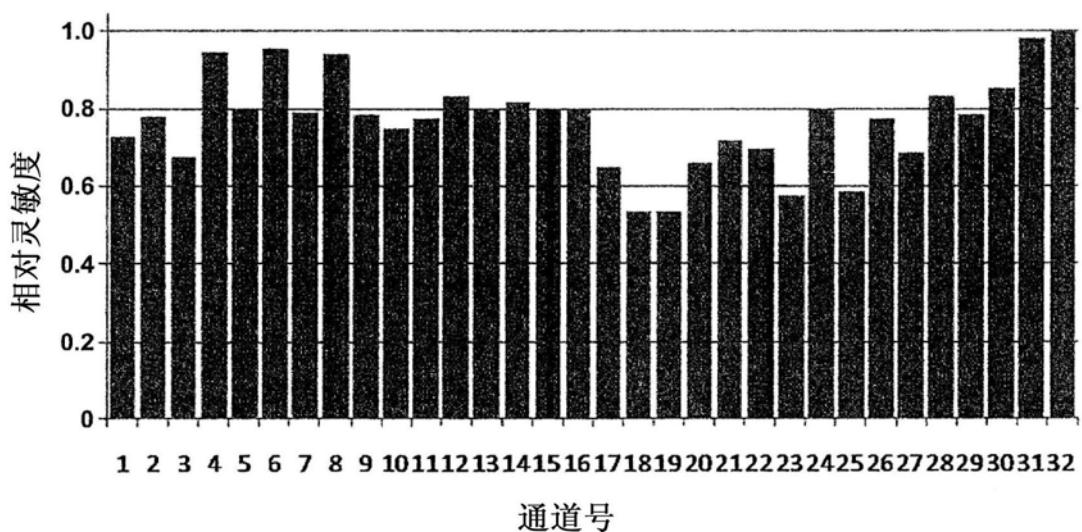


图9

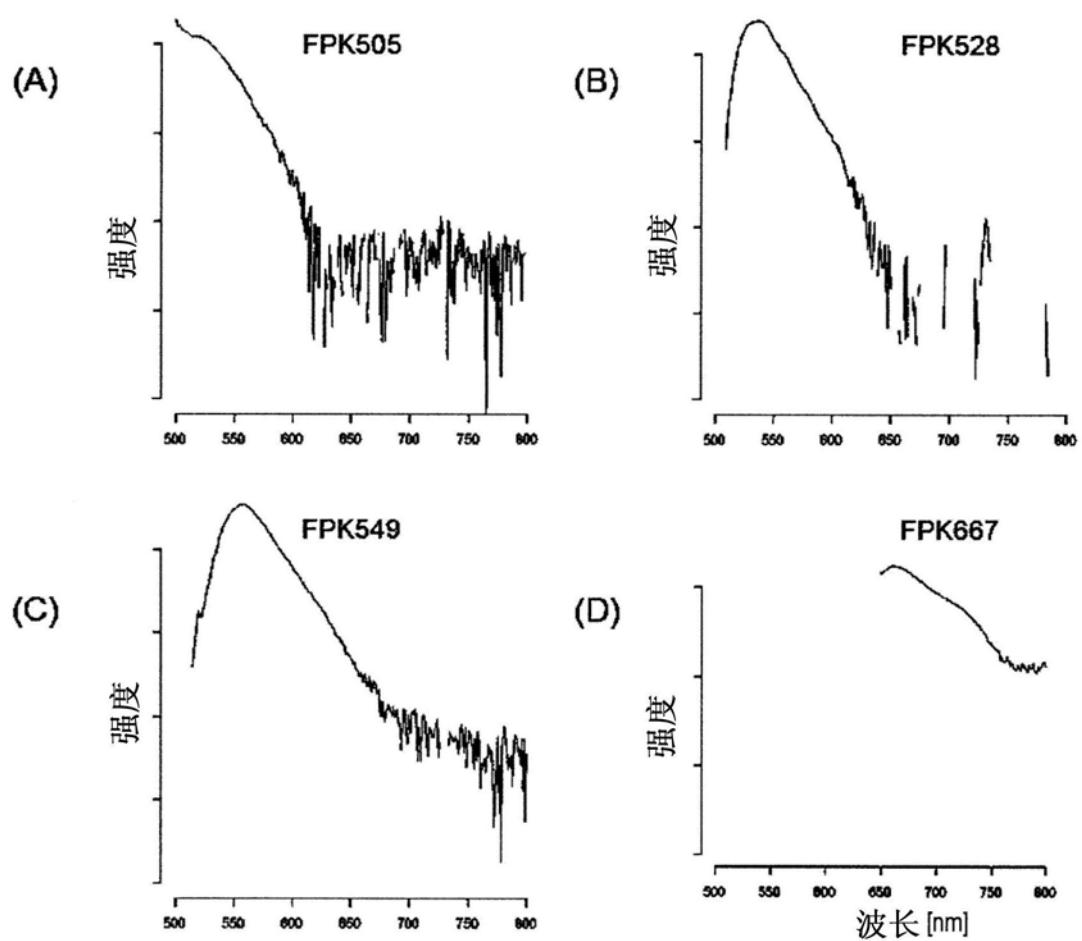


图10

FPK505

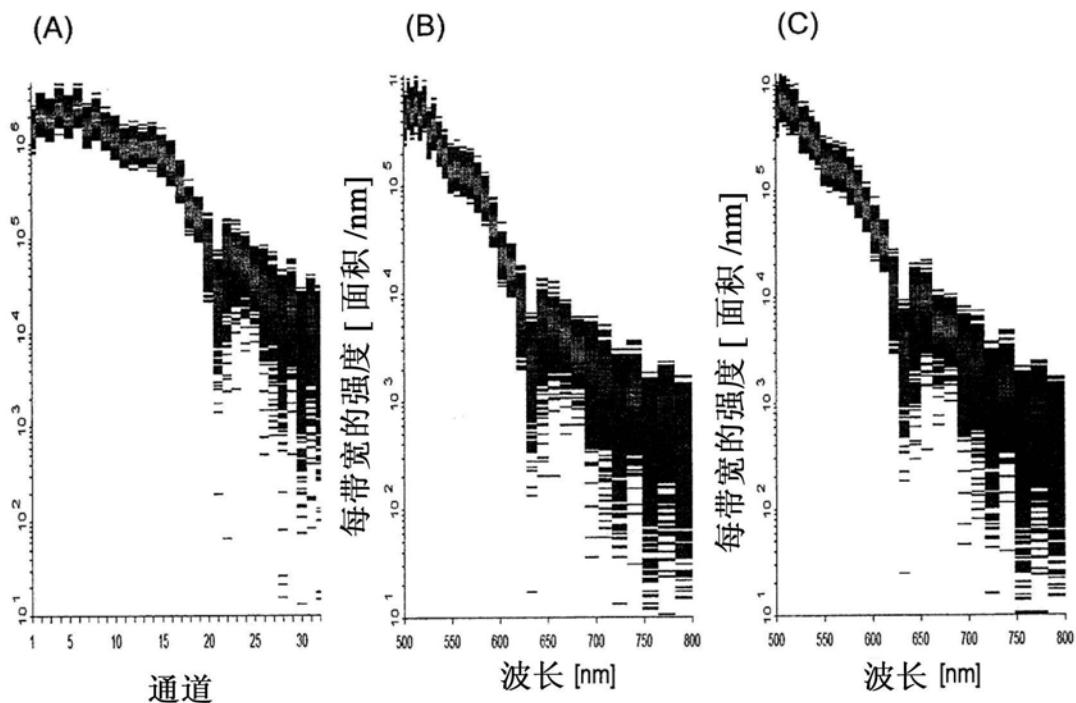


图11

FPK505

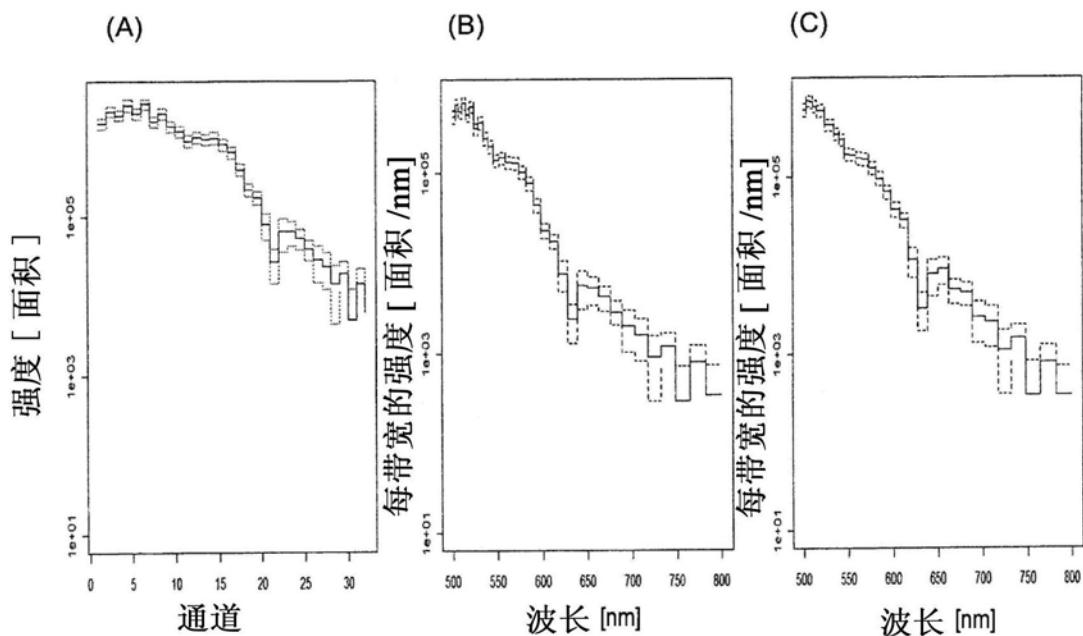


图12

FPK528

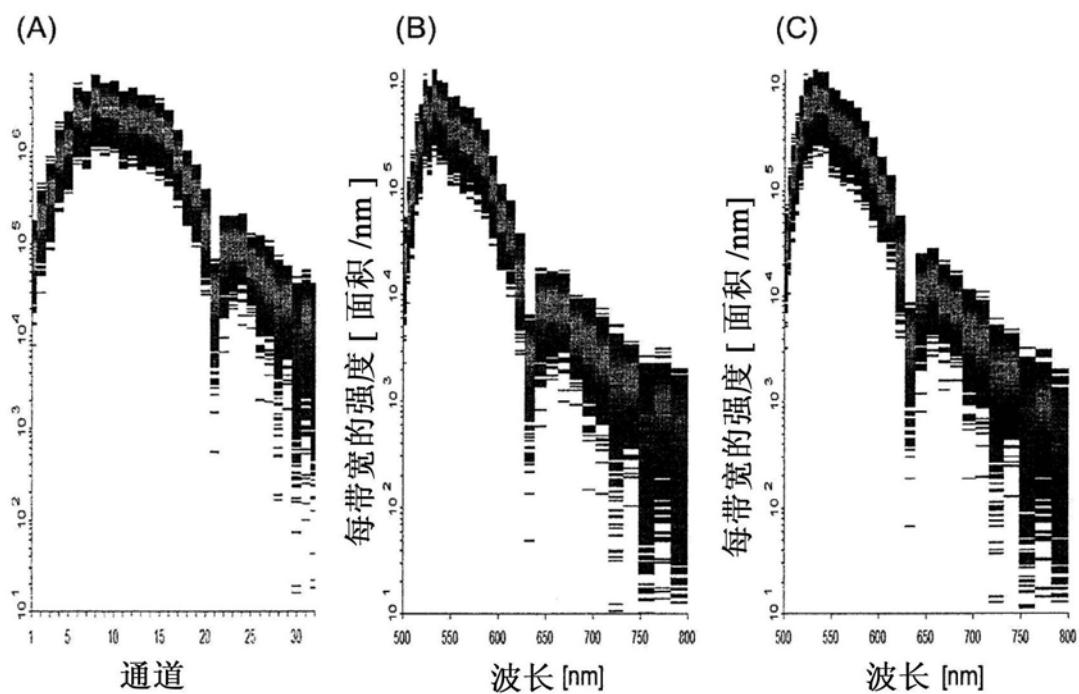


图13

FPK549

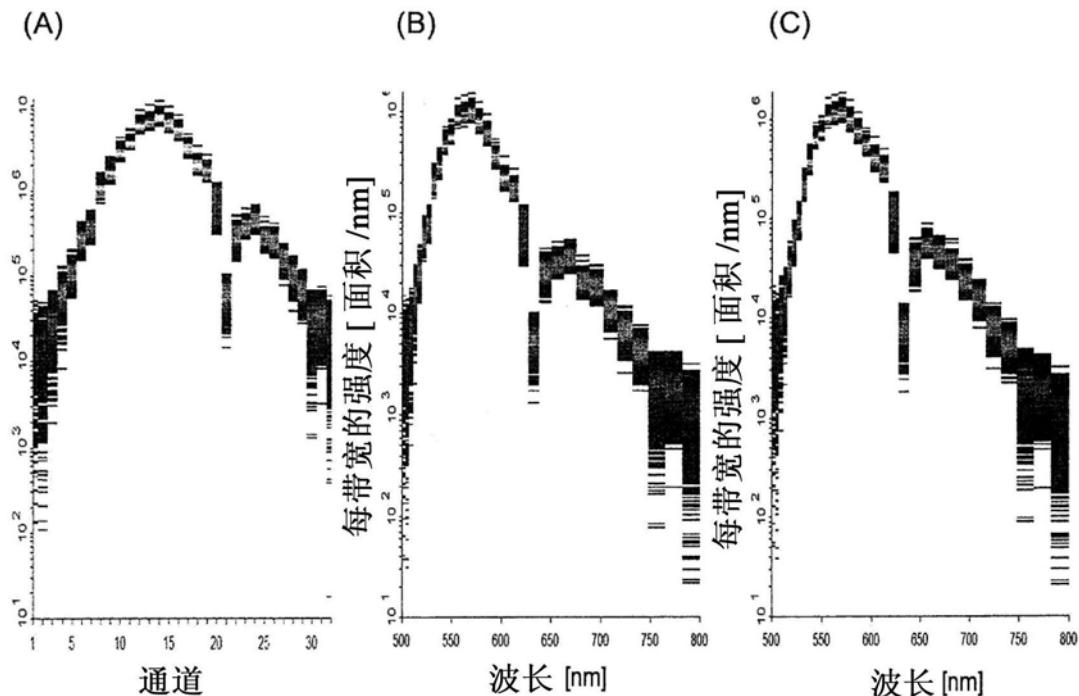


图14

FPK667

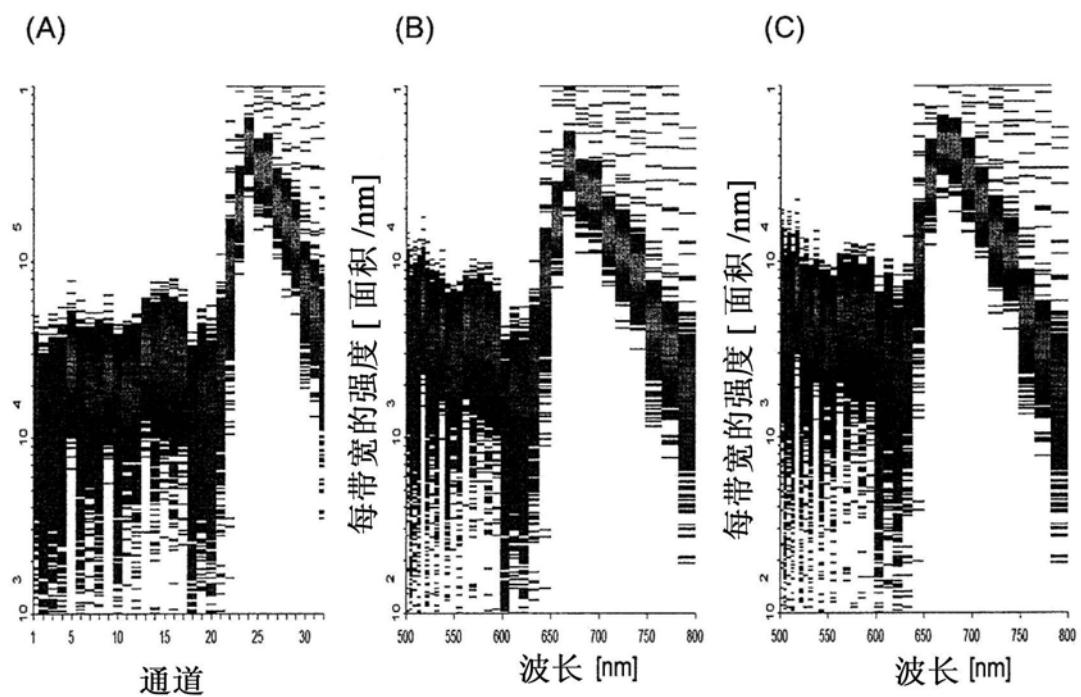


图15

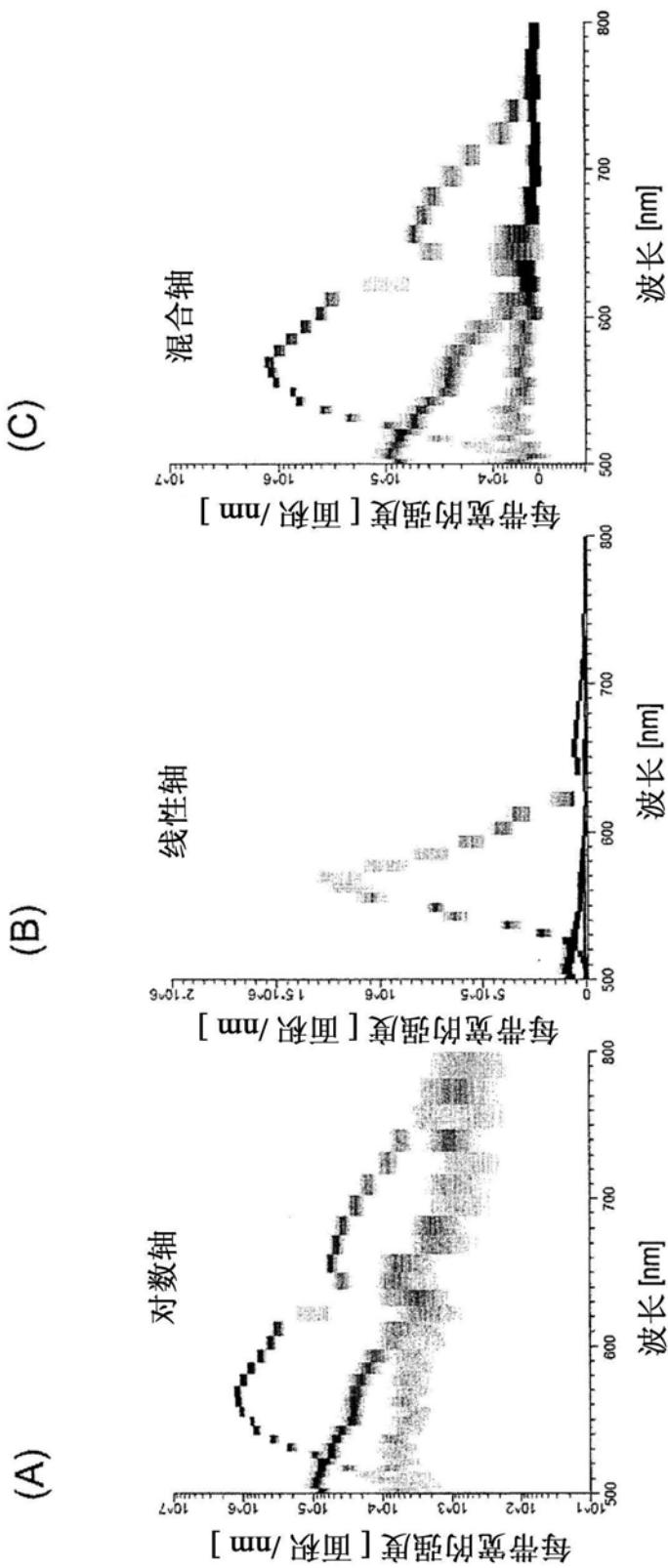


图16