

[51] Int. Cl⁷

B32B 27/04

B32B 27/12 B32B 5/02

C12M 1/34 C12M 3/00

G01N 9/30 G01N 15/06

G01N 21/00 G01N 21/75

G01N 21/76 G01N 33/53

G01N 33/567

[11] 公开号 CN 1592684A



[12] 发明专利申请公开说明书

[21] 申请号 02821386.6

[43] 公开日 2005 年 3 月 9 日

[22] 申请日 2002.8.30 [21] 申请号 02821386.6

〔30〕 優先権

[32] 2001. 8.30 [33] US [31] 60/315,937

[32] 2001. 10. 10 [33] US [31] 60/328,246

[32] 2001. 10. 19 [33] US [31] 60/386,072

[32] 2001. 10. 19 [33] US [31] 60/386,073

[32] 2001. 10. 26 [33] US [31] 60/386,071

[32] 2001.11. 7 [33] US [31] 60/344,977

[32] 2001.11.13 [33] US [31] 60/338,679

[32] 2001.11.20 [33] US [31] 09/988,728

[32] 2001.11.30 [33] US [31] 60/334,131

[32] 2002. 2. 5 [33] US [31] 60/355,644

[32] 2002. 2. 19 [33] US [31] 60/358,479

[86] 国际申请 PCT/US2002/027762 2002.8.30

[87] 国际公布 WO2003/021223 英 2003.3.13

〔85〕 进入国家阶段日期 2004.4.27

[71] 申请人 伯斯坦技术公司

地址 美国加利福尼亚州

共同申請人 長岡実業株式会社

[72] 发明人 高瑞·P·赛尔文 约翰·F·戈登

卡恩·J·布莱兹尔

约瑟夫·R·I·尔斯尔

[74] 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专利

商标事务所

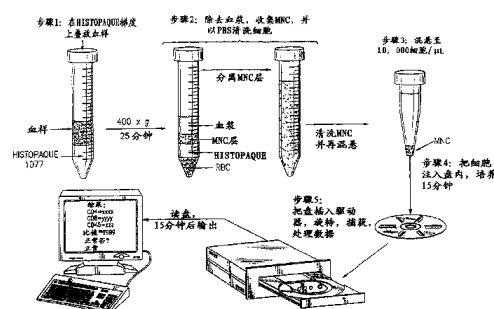
代理人 蒋世迅

权利要求书 4 页 说明书 92 页 附图 69 页

[54] 发明名称 细胞的定性和定量分析方法及相关的光学生物盘系统

[57] 摘要

一种在光学生物盘上施行并用盘驱动器读出的临床诊断测定。 本文公开的是, 用光学生物盘检测和确定生物样品中特定血细胞分析物含量的方法和设备。 确定生物样品中特定类型血细胞含量的方法, 包括: 把某种抗体与盘上某一捕获区结合、向该捕获区提供样品、除去没有与捕获区结合的样品部分、和对结合的细胞计数。 本发明还说明, 用光盘及盘驱动器施行簇指定计数的方法和设备, 以及制作实施该种簇指定计数的光学测定盘的方法。



ISSN 1008-4274

1. 一种检测生物样品中血细胞分析物的系统,所述系统包括:
有衬底的光盘;
平行于所述衬底的顶盖;
在所述衬底与顶盖之间的空腔,所述空腔包括捕获区;
捕获区上与所述衬底关联的捕获层,以便第一捕获区有第一细胞捕获剂和第二捕获区有第二细胞捕获剂;
光源,把光引至盘的捕获区上;
检测器,检测从盘的捕获区反射的光,或透过盘的捕获区的透射光,并给出信号;和
处理器,用该信号对与捕获剂结合的样品的各项目计数。
2. 一种采用光盘和盘驱动器检测生物样品中血细胞分析物的方法,所述方法包括如下步骤:
向盘的空腔中的盘表面提供细胞样品,空腔包括至少一个有捕获剂的捕获区;
把盘装入光阅读机;
旋转光盘;
把入射的电磁辐射束引向捕获区;
检测与捕获区上的盘相互作用后形成的电磁辐射束;
把检测的束转换为输出信号;和
分析输出信号,提取其上与捕获区捕获的细胞数有关的信息。
3. 按照权利要求2的方法,其中,以盘表面支承样品的空腔,是在盘内并被衬底及顶盖的相对两侧封闭。
4. 按照权利要求2的方法,其中,光盘的结构有反射层,可使引导至捕获区又不落在细胞上的光被反射。
5. 按照权利要求2的方法,其中,光盘的结构可使引导至捕获区又不落在细胞上的光,透过光源与检测器之间的光盘。
6. 按照权利要求2的方法,其中的盘表面以第一组细胞捕获

剂涂敷。

7. 按照权利要求 6 的方法，其中各细胞捕获剂定义了分立的捕获区。

8. 按照权利要求 7 的方法，其中第二组细胞捕获剂，按预定的模式定义第二组分立的捕获区。

9. 按照权利要求 8 的方法，其中第一组和第二组捕获区是在一个空腔中。

10. 按照权利要求 6 的方法，其中的细胞捕获剂用于与细胞表面抗原结合。

11. 按照权利要求 10 的方法，其中的细胞表面抗原，是从抗原的 CD 科中选择的。

12. 一种以光盘和盘驱动器施行簇指定计数的方法，所述方法包括如下步骤：

向有分离梯度的第一个管中提供血样；

按足够使血样分离成层的时间和速度，旋转第一个管；

使包含 T 细胞的 MNC 层再混悬，由此形成 MNC 混悬液；

向包括至少一个捕获区、捕获区上至少有一种捕获剂的光盘表面，提供 MNC 混悬液样品；

把光盘装入光阅读机；

旋转光盘；

把入射的电磁辐射束引向所述至少一个捕获区；

检测与捕获区上的盘相互作用后形成的电磁辐射束；

把检测的束转换为输出信号；和

分析输出信号，提取其上与捕获区捕获的细胞数有关的信息。

13. 按照权利要求 12 的方法，其中的分离梯度，由经离心后形成密度梯度的基质提供。

14. 按照权利要求 12 的方法，其中的第一个管还包含抗凝血剂。

15. 按照权利要求 14 的方法，其中的抗凝血剂是 EDTA。

16. 按照权利要求 14 的方法，其中的抗凝血剂是柠檬酸右旋糖酐。

17. 按照权利要求 14 的方法，其中的抗凝血剂是肝素。

18. 按照权利要求 12 的方法，其中的表面是在盘内，并并被衬底及顶盖的相对两侧封闭。

19. 按照权利要求 12 的方法，其中，光盘的结构有反射层，可使引导至捕获区又不落在细胞上的光被反射。

20. 按照权利要求 12 的方法，其中，光盘的结构可使引导至捕获区又不落在细胞上的光，透过光源与检测器之间的光盘。

21. 按照权利要求 12 的方法，其中的盘表面以第一组细胞捕获剂涂敷。

22. 按照权利要求 21 的方法，其中各捕获剂是抗体。

23. 按照权利要求 22 的方法，其中各抗体选自如下的一组，该组包括：单克隆、多克隆、和通过重组创建的抗体（recombinantly created antibodies）。

24. 按照权利要求 21 的方法，其中，捕获剂借助交联系统，在盘表面是固定不动的。

25. 按照权利要求 20 的方法，其中的捕获剂直接在盘表面，是固定不动的。

26. 按照权利要求 20 的方法，其中各捕获剂定义了一组或多组分立的捕获区。

27. 按照权利要求 26 的方法，其中的一组或多组捕获区，位于光盘中一个或多个空腔内。

28. 按照权利要求 20 的方法，其中的捕获剂，对细胞表面抗原具有选择性的亲和力。

29. 按照权利要求 28 的方法，其中的细胞表面抗原，是从抗原的 CD 科中选择的。

30. 按照权利要求 29 的方法，其中的细胞表面抗原，是选自包含 CD3、CD4、CD8、和 CD45 的一组。

31. 按照权利要求 12 的方法, 其中的血样包括: 正常血细胞、白血病血细胞、或淋巴瘤血细胞。

细胞的定性和定量分析方法 及相关的光学生物盘系统

技术领域

本发明一般涉及生物、化学、细胞学、和诊断测定，具体说，是涉及用光学生物盘，对从血液、血液白血病、淋巴瘤、骨髓、干细胞取得的细胞种群进行的测定。更具体说，但不是对本文后面以最佳实施模式说明的特定实施例的限制，本发明涉及用光学生物盘，检测生物抽样中细胞分析物的方法和设备。

背景技术

血细胞计数在诊断、治疗、以及随后确定病人健康状况时，常常使用。全血细胞计数（CBC），是收集测试物，包括：血红蛋白、血细胞比容、红细胞平均血红蛋白量、红细胞平均血红蛋白浓度、红细胞平均容积、血小板计数、和白细胞计数。血细胞计数是计算全血每cu. mm.的红细胞和白细胞数目。

白细胞计数（WBC，白细胞）是在标准血样中白细胞的总数。在正常的健康人中，典型的 WBC 计数是每微升（ μL ）4000 到 10800 细胞。诸如锻炼、紧张、和疾病等因素，能影响这些数值。高的 WBC 可能表示感染、白血病、或组织损伤。如果它下降至每微升 1000 细胞以下，有增加感染的危险。

白细胞分类测试，实质上是搜集超出白细胞计数本身可获得的信息以外的信息。白细胞分类计数，用于评价新的疑似感染或发烧（即使 CBC 正常）、疑似与异常有关的失调、异常白细胞计数、疑似白血病、其他如嗜曙红细胞增多、单核细胞增多、和嗜碱白细胞增多等异常。当存在严重的白细胞减少时，应反复进行白细胞或白细胞分类测试（如，仅次于药物治疗）。在治疗时，例如化学疗法和放射疗法时，血细胞计数对确定该治疗是否除癌细胞外还排除健康的血细胞，

是十分重要的。

分类白细胞计数由可计算的细胞计数装置确定。该机器确定总计数和五种主要白细胞类型的百分比。在正常的个体中，大部分是中性白细胞（50 - 60%），接着是淋巴细胞（20 - 40%），然后是单核细胞（2 - 9%），少量嗜酸性细胞（1 - 4%）和嗜碱白细胞（0.5 - 2%）。

在淋巴细胞的分类中，还有幼淋巴细胞（lymphocytes）和细胞的更多亚类。例如，淋巴细胞可以广泛地分为 T 细胞（胸腺衍化淋巴细胞）和 B 细胞（囊等同淋巴细胞），分别负责细胞中介免疫和体液的免疫。虽然已经用形态学的特征在淋巴细胞内分类，但是，已经证明，在区分淋巴细胞亚类的许多功能中，仅用形态学是不够的。为了区分具有各种功能的淋巴细胞，已经发展了各种技术，包括：红细胞形成玫瑰花结分析、免疫荧光显微镜分析、酶组织化学分析、和最近的单克隆抗体分析。T 细胞可以通过它们表面上包括的两种糖蛋白表面标记物 CD4 和 CD8（CD4+T 细胞和 CD8+细胞）的存在，加以区别。CD4+T 辅助细胞涉及抗体中介免疫。它们与 B 细胞递呈的抗原结合。结果是分泌对抗抗原物质的抗体浆细胞克隆的发育。T 细胞对细胞中介免疫是必不可少的。CD4+细胞与抗原递呈细胞（APC），如吞噬细胞的巨噬细胞和树突细胞递呈的抗原结合。然后，T 细胞释放把其他细胞吸引至该区域的淋巴因子。结果是炎症，同时，细胞和分子蓄积起来，试图把抗原物质隔开并破坏抗原物质。

CD8+，细胞毒素/抑制因子型细胞分泌破坏已经和它们结合的细胞的分子。如果靶细胞已被病毒感染，这是一种十分有用的功能，因为在细胞可以释放新鲜的一批病毒，使其他细胞感染之前，细胞通常已被破坏。

HIV 和 AIDS

人类免疫缺陷病毒，一种逆转录病毒，对 CD4+T 细胞具有高的亲和力，因而 CD4 T 细胞是该病毒的强劲靶。获得性免疫缺陷综合症（AIDS）提供 CD4+T 细胞在免疫中鲜明和悲剧性的重要例证。人类免疫缺陷病毒（HIV）与 CD4 分子结合，从而入侵并感染 CD4+T 细

胞。随着疾病的进展，CD4+T 细胞数下降至它约每微升 (μl) 1000 的正常范围以下。一种解释是，可能病人的 CD8+T 细胞不断努力破坏受感染的 CD4+T 细胞。

当血液中 CD4+T 细胞数下降至每微升 400 以下时，病人建立免疫应答的能力急剧下降。病人不但对入侵身体的病原体变得感受性过强，而且对微生物，特别是通常寄居于我们组织内不伤害我们的细菌，也变得过于敏感。最终病人死于偶然的感染，如念珠菌病、巨细胞病毒、单纯疱疹病毒、肺囊虫隆突 (*Pneumocystis carinii*)、肺炎、弓形体病、结核病、和其他。

CD4+ 和 CD8+ T 细胞数的估计，和 CD4+/CD8+ T 细胞比值，对评定患有免疫缺乏疾病的病人的免疫健康是有用的。例如，个别患有 AIDS 病的人表明 CD4+ T 细胞在免疫中的重要性。随着疾病的进展，CD4+T 细胞数下降至它每 μl 约 1000 细胞的正常范围以下。随着病人的 CD8+ T 细胞破坏受感染的 CD4+ T 细胞，未感染的 CD4+ T 细胞可能经受脱噬作用。因此，CD4+ 对 CD8+ T 的细胞比值，可以为疾病的进程提供一种诊断标记。U.S. Public Health Service 推荐每 3 - 6 个月监控所有受感染人员的 CD4+ 的水平（在美国，600 个测试实验室完成 4 千万人的测试）。

除 CD4 和 CD8 之外，还有许多其他细胞的表面抗原（如 CD3、CD16、CD19、CD45、CD56）可以用来识别淋巴细胞的亚类。用抗体技术检测这些细胞表面抗原的能力，为诊断病理学添加新的方向，同时有各种技术可用来研究血淋巴 (hemotolymphoid) 失调的免疫表型 (immunophenotypes)（如 AIDS、白血病、和淋巴瘤）。常规的微量免疫测定，如放射免疫测定 (RIA)、酶免疫测定 (EIA)、荧光免疫测定 (FIA) 使用同位素、酶、或荧光物质，检测相应分析物的存在或不存在。

治疗 AIDS 有许多治疗方法。下面的方法由方法本身或与其他方法组合，成功地用于治疗该疾病。

1. 核苷同型物逆转转录酶抑制剂 (Nucleoside analog reverse

transcriptase inhibitors) (NUKES), 第一种阻断逆转转录的抗 HIV 药物, 它通过提供中断该过程的“诱导物”积木块, 阻断从 RNA 合成病毒的 DNA 需要的逆转转录 (药物如 Zidovudine Retrovir AZT、Didanosine Videx、Zalcitabine Hivid、dideoxycytidine、Stavudine Zerit、Lamivudine Epivir、Zidovudine/Lamivudine Combivir、Abacavir Ziagen、Zidovudine/Lamivudine/Abacavir)。

2. 非核苷同型物逆转转录酶抑制剂 (Non-nucleoside analog reverse transcriptase inhibitors) (NNRTI 或 NON-NUKES), 它通过与逆转转录酶的结合, 限制其活性, 中断逆转转录 (药物如 Nevirapine Viramune、Delavirdine Rescriptor、Efavirenz Sustiva)。

3. 蛋白酶抑制剂, 阻断蛋白酶的作用, 该蛋白酶是一种酶, 它把 HIV 蛋白链切断成组装病毒新基因副本必需的特定的蛋白 (药物如 Saquinavir Invirase、Ritonavir Norvir、Indinavir Crixivan、Nelfinavir Viracept、Saquinavi Fortovase、Amprenavir Agenerase、Saquinavir Invirase 等等)。

4. 整合酶抑制剂, 阻断整合酶的作用, 整合酶是一种酶, 它把病毒 DNA 插入受感染细胞的 DNA 链。还没有整合酶抑制剂已经被批准 (Zintevir 尚在人体试验的第一阶段)。

5. 附着并融合的抑制剂, 阻止 HIV 病毒附着在细胞上。还没有融合抑制剂已经被批准 (AMD-3100, Pentafusided, T 1249, PRO 452, 和 SC351125, 尚在试验的第一和第二阶段)。

6. 抵抗意义的药物, 存在部分 HIV 遗传码的“镜像”, 它锁定病毒, 阻止病毒发生作用。一种抵抗意义的药物, 是由 Enzo 研发的 HGTV43, 尚在试验的第一阶段。

7. 免疫刺激剂, 利用人体化学信使刺激免疫应答。白细胞介素 2 (II-2, Aldesleukin、Proleukin、和 Multikine, 以及灭活病毒制剂 HIV-1 Immunogen 正处在试验的第 3 阶段)。

白血病

白血病是一种源于骨髓细胞的恶性疾病。它的特征是发育中的骨

髓细胞不受控制地生长。白血病主要分为骨髓内生成的或淋巴细胞生成的两种，每一种都可以是急性的或慢性的。急性白血病发展很快，且一般还使没有充分发育的细胞病变。这些未成熟的细胞因此不能充分施行它们的正常功能。另一方面，慢性白血病发展缓慢，并允许更多成熟和功能性细胞生长。白血病使淋巴细胞（淋巴细胞白血病）或骨髓细胞（骨髓的白血病）病变。淋巴细胞白血病使白细胞或淋巴细胞病变，而骨髓白血病则包括除淋巴细胞外的其他类型血细胞病变。骨髓的或淋巴细胞的这两个词，是指累及的细胞类型。有四种主要类型的白血病，急性的或慢性的骨髓白血病，和急性的或慢性的淋巴白血病。白血病的原因尚不清楚，但似乎与白细胞未能发育成熟有关。

通常，成熟的白细胞不能再生，而由骨髓中产生的新的细胞取代。相反，白血病细胞有能力再生，但不会充分发育，达到适当的功能。随着白血病的发展，白血病细胞置换正常的白细胞，使病人极易受感染。有若干种白血病的形式，都有急性和慢性的，它们按照病变的白细胞分类。白血病中涉及的主要白细胞类型，包括白细胞和多形核白细胞。

有两种主要的急性白血病形式，急性的成淋巴细胞白血病（ALL）和急性的成髓细胞白血病（AML）。ALL 使淋巴细胞病变，并更常见于在儿童出现。AML 使形成多形核的白细胞的细胞病变，并更常见于成人，虽然它可以出现在任何年龄。急性白血病是一种迅速发展的疾病，可导致未成熟的、无功能的细胞在骨髓和血液中蓄积。骨髓常常不能再产生足够的正常红和白细胞及血小板。贫血，一种红细胞缺乏，在实际上的所有白血病病人身上发展。正常的细胞的缺乏，损伤人体与感染斗争的能力。血小板的短缺，导致皮下出血和易出血。

慢性白血病有两种，慢性骨髓白血病（CML）和慢性淋巴白血病（CLL）。CML 使未成熟的多形核白细胞病变，常见于 35 岁以后。CLL 使淋巴组织和淋巴管细胞病变，常发生在超过 50 岁的男人身上。对那些患有慢性白血病病人的预后，很大程度上与疾病出现的年龄有关；如同 AML 一样，症状可以控制，寿命可以延长。患有 CML 的

病人比那些患有 CLL 的病人更易死于白血病，因为 CML 通常在更年轻的年龄上开始。

白血病的专门诊断要求血细胞计数和骨髓活组织检查。白血病是通过血液中存在大量异常白细胞，和在骨髓中存在典型的白血病细胞而证实的。对慢性白血病，病人可能不知道患有该疾病，而诊断往往仅当病人为另外原因，如在例行体检或在外科手术前的检查时作出的。

急性和慢性的白血病的治疗，常常是类似的，但还依赖于每一情况下涉及的各种因素。治疗的目的，是抑制白血病细胞的再生。防止细胞繁殖的细胞毒素药物，被用于此目的。快速分裂的白血病细胞，比正常白细胞对这些药物更为敏感。急性白血病的治疗，常常涉及一并使用若干种细胞毒素药物。一旦白血病细胞数量已经降下来，需用皮质类固醇和只用一种或两种细胞毒素药物维持病情的改善。对慢性白血病，也用细胞毒素药物和皮质类固醇。在某些情形下，输血可能是必要的。白血病的诊断，要求检查血液或骨髓中的细胞。治疗的目的，是促成完全的缓解。完全的缓解是指没有疾病的证据，和病人回复到良好的健康状况，具有正常的血细胞和骨髓细胞。复发表示白血病细胞的回复，和疾病其他病征和症状的回复。

绝大多数急性白血病的临床发现，是由于骨髓衰竭导致正常骨髓要素被恶性细胞代替。较少见的表现，包括直接器官浸润（皮肤、胃肠道、脑膜）。急性的成淋巴细胞白血病（ALL），儿童急性白血病占 80%。高峰发病率在 3 岁到 7 岁的年龄之间。但是，ALL 也见于成人，急性白血病中成人约占 20%。急性骨髓白血病（AML；急性骨髓白血病，“ANLL”）主要是成人的疾病。

慢性淋巴细胞白血病（CLL），是一种 B 淋巴细胞（罕见于 T 淋巴细胞）单克隆恶性肿瘤。该疾病通常是无痛的，伴随缓慢发展的长寿小淋巴细胞的蓄积。这些细胞是无免疫活性的。慢性淋巴细胞白血病的临床表现是免疫抑制、骨髓衰竭、和器官浸润淋巴细胞。

疾病的评定，是用判定支配胚细胞种群的谱系配位的主要小组完成的，接着是用依赖于主要小组结果的、表征胚细胞种群明确表型和

成熟期的 mAbs 第二小组。另外，对样品中广泛范围未成熟和成熟造血细胞的最直接的“大范围”特征，选出一预定的小组。当恶性细胞尚处在少数时，这些“大范围”特征可以增加测试的灵敏度，并且有助于表征病理学细胞的异种性，以及在其他细胞谱系成熟中伴随的干扰。此外，该对策为与染色结果的一致性提供一种更好的控制。

白血病免疫表型

白血病中的表面标记物，为诊断和预后目的，帮助识别肿瘤的谱系。了解白血病表型，从观察临床历史和形态开始，同时对每一情况选择一小组标记物。在大多数情况下，谱系能识别为 T 细胞、B 细胞、或骨髓，然后可以作出诊断或分类诊断。

白血病表型的目的，是识别瘤形成过程的细胞类型。该表型识别可以描绘细胞谱系和成熟程度的轮廓，作为白血病或淋巴瘤分类的辅助。还有，该表型识别可以帮助确定细胞种群是正常的还是异常的，并检测样品中细胞种群的以前特征，以便监控疾病的缓解、发展、或复发。

然后，进行全血细胞计数（包括白细胞计数）。血细胞计数是疾病对治疗应答的一个重要指数。这些计数对了解药物治疗或放射疗法的效果，也是重要的。血细胞计数有助于确定某一药物是否起作用。细胞的实际计数通常用昂贵的电子计数器完成，它要求技术专家使用该计数器进行测试。每一种细胞的图谱，表明是否存在白血病以及白血病类型。

平均说，每立方毫米血液约有 4000 到 11,000 个白细胞。如果总 WBC 计数超过 11,000 细胞/mm³，被称为白细胞增多，是一种身体对感染的正常应答。但是，如果存在过量的异常 WBC（白血病的胚细胞），则被称为白血病。血液中有约 5 百万红细胞/mm³。异常低的 RBC 可能是贫血的结果。贫血是白血病的征兆。

白血病免疫表型是在血液或骨髓样本中完成的，但是，也可以观察其他液体或组织。用 RBC 溶解方法，或用诸如聚蔗糖泛影钠等密度梯度分离方法，获得白细胞。只要有可能，应在处理前进行总的白

细胞计数和分类，且细胞浓度要作相应的调整。

单克隆抗体小组

许多实验室使用多色免疫荧光检测（multicolor immunofluorescence detection），但是在某些情形下，适合用单色免疫荧光检测。抗体照例包括：CD2、CD3、CD5、CD10、CD11c、CD14、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD45、CD103、FMC7、重链、Kappa、和 Lambda。如果临床的或形态学的特征提出“T”或“NK”淋巴细胞失调，那么，还需进行下面附加的抗体组合：CD3/CD4/CD8、CD7/CD5/HLA-DR、CD25/CD2/CD3、CD16/CD56/CD19、CD57/CD8/CD3、TCR alpha-beta/delta-gamma/CD3。

有许多当前的生物疗法可用于与白血病斗争。例如，对白血病，骨髓置换疗法并防止排斥捐献者骨髓，已经取得效果。干扰素也已经用于慢性骨髓白血病（CML）的治疗。

白血病胚细胞的存在也已经被骨髓的观察所证实。抽取骨髓液体并在显微镜下观察。然后可以证实白血病胚细胞。如果在骨髓样品中发现白血病细胞，那么再进行测试，以确定疾病的程度。用腰椎穿刺，检验充满脑索和脊索内及周围空间的液体中的白血病细胞，用脑脊髓液及 X 射线检验疾病向胸部的扩散。

不同的化学疗法药物，以不同的方式攻击癌细胞。因此，常常同时提供组合的化学疗法治疗，使化学疗法的效果最大化。

淋巴瘤

传统上，已经用形态学特征按功能相似性把细胞分类成组。但是，仅靠形态学来区分淋巴细胞亚类（T 细胞、B 细胞、和天然杀伤细胞，等等）的许多功能能力，已被证明是不适当的。已经发展了各种按功能区分淋巴细胞的技术，包括：玫瑰花结分析、免疫荧光显微镜分析、酶组织化学分析、和最近的以荧光标记的单克隆信号抗体的流式细胞计量术（flow cytometry）。淋巴细胞可以广义地分为 T 细胞（胸腺衍化）和 B 细胞（囊等同），它们分别负责细胞中介免疫和体液的免疫。

淋巴瘤是一组源自淋巴细胞，即一种白细胞的恶性失调的一般名称。淋巴细胞分布在整个身体，但集中在骨髓、淋巴结、脾脏、胃肠道、和皮肤。这些位点是组成淋巴系统的主要器官。

淋巴结很多，位于整个身体各部分，从头皮到脚。它们由称为淋巴管的特殊循环系统连接。这些管输送称为淋巴的液体，淋巴细胞混悬在淋巴液中随淋巴液从一个结到一个结地移动，最终进入血液。淋巴细胞的恶性转化是淋巴瘤的开始。这种情况通常出现在淋巴结，但也可能从胃、肠、皮肤、或其他器官开始。恶性淋巴细胞或淋巴瘤细胞繁殖，导致细胞蓄积，产生一个或多个增大的淋巴结，或在另一组织，如胃、皮肤、或其他位点中产生一团。在淋巴结中，正在生长的淋巴瘤细胞排除正常的细胞并产生异常的细胞图谱，该异常的细胞图谱能够被识别并在活组织检查样本中分类。某些淋巴瘤可以累及骨髓并可能干扰血细胞的发育，导致贫血，而且，在更严重的情形下，可能导致低的白细胞计数和血小板计数。

所有淋巴瘤通常都有恶性淋巴细胞的异常生长。但是，淋巴瘤的类型不同于染病的淋巴细胞类型与涉及的淋巴结图谱。淋巴瘤被分为三种主要类型：低等、中等、和高等。这些分类根据的是存在的淋巴瘤细胞类型、淋巴结破裂图谱、淋巴细胞的免疫表型（特别是B细胞对T细胞）、和染色体的异常性质。淋巴瘤归属于Hodgkin或非Hodgkin类型两者之一。Hodgkin疾病或Hodgkin淋巴瘤，是恶性细胞在淋巴系统中生长。Hodgkin疾病是淋巴瘤中较熟识的形式，而其他的淋巴瘤被归入所谓非Hodgkin的淋巴瘤。但是，1996年WHO推荐一种根据起源细胞（B对T）和分类阶段（未成熟或前体对成熟或外周）的分类。

Hodgkin疾病常常在一个或多个淋巴结上发病。一个免疫系统细胞（淋巴细胞）经历恶性转化，它繁殖，排除并减损正常淋巴细胞在结中的功能，还使淋巴结扩大。表征该疾病的恶性细胞，是Reed-Sternberg细胞，并从淋巴细胞衍化。当在表征该疾病的淋巴结内，结合其他异常细胞图谱发现Reed-Sternberg细胞，即可作出诊断。

已经确认，**Hodgkin** 疾病在一个淋巴结中开始，然后该恶性细胞通过淋巴管通道传播，淋巴管通道是连接相邻淋巴结的管网。在更进一步的 **Hodgkin** 疾病中，肺、肝、和骨髓都可能被肿瘤团累及。当恶性细胞从淋巴结通过淋巴管或血管扩散时，疾病可以使这些其他组织病变。症状包括淋巴结肿大，大多数是颈两侧的淋巴结，但偶有在腋窝、腹股沟、或腹部。一些其他的症状或病征，包括：疲劳；反复发烧；盗汗；搔痒；背、腿、或腹疼；骨疼；食欲减退；和体重下降。

淋巴瘤的诊断，由活体组织检查证实。研究组织中恶性细胞的存在、类型、和排列。还对组织上的细胞完成测试，确定它们是否是淋巴细胞，和它们是什么类型的淋巴细胞。还要完成附加的测试，以确定该疾病是否通过淋巴系统扩散至身体的其他部分。这些测试可能包括附加的活组织检查、核医学、X 射线、或磁共振成像。

淋巴瘤可能非常难以检测。存在一些非 **Hodgkin** 的症状，但它们不是特异性的。常常有淋巴结肿胀，特别在身体的上部。诊断从取组织的活组织检查开始。在显微镜下观察癌细胞。要作许多测试来评定淋巴瘤：观察淋巴结；异常血细胞计数的全血检查；血化学；异常血沉速率；胸部 X 射线，以观察淋巴结并查看是否累及其他器官；胸部、骨盘、和腹部计算机体层摄影 (CT 或 CAT) 扫描或磁共振成像 (MRI) 扫描，确定疾病可能的扩散；镓扫描放射性检查，在显示肿胀的淋巴系统中摄入镓，并最终指示疾病；骨髓抽吸和活组织检查，确定淋巴瘤是否已经使骨髓病变；提取液体骨髓和骨碎片并在显微镜下观察。非 **Hodgkin** 的淋巴瘤型属于以下类型：成淋巴细胞的淋巴瘤、小的非分裂细胞淋巴瘤 (**Burkitt** 的/非 **Burkitt** 的)、和巨细胞淋巴瘤。淋巴瘤的分类，涵盖所有淋巴组织增生的赘生物。U.S. National Cancer Institute (NCI) 说明多于 20 条临床病理学条目，对无痛的和攻击型淋巴瘤，在临床上更为有用。

淋巴瘤的诊断和治疗，依赖于细胞类型、涉及的淋巴结图谱、及疾病的扩展。在疾病的早期定位阶段，可以用放射疗法。淋巴瘤的化学疗法则是更为常见的形式，因为在诊断后，疾病往往在身体的多个

位点。高等（攻击型）淋巴瘤往往用若干不同的化学疗法药物同时治疗。

Hodgkin 的医学诊断是取一组织样品（活组织检查），并发现 **Reed-Sternberg** 细胞的存在，这是对 **Hodgkin** 疾病特异的细胞。有时用针吸组织检查，但外科活组织检查，摘除整个淋巴结，获得足够的组织，对确定的诊断是较为可取的。

疾病的评定，是用判定支配胚细胞种群的谱系配位的主要小组完成的，接着是用依赖于主要小组结果的、表征胚细胞种群明确表型和成熟期的单克隆抗体第二小组。另外，对样品中广泛范围未成熟和成熟造血细胞的最直接的“大范围”特征，选出一预定的小组。当恶性细胞尚处在少数时，这些“大范围”特征可以增加测试的灵敏度，并且有助于表征病理学细胞的异种性，以及在其他细胞谱系成熟中伴随的干扰。此外，该对策为与染色结果的一致性提供一种更好的控制。

淋巴瘤免疫表型

淋巴瘤中的表面标记物，为诊断和预后目的，帮助识别肿瘤的谱系。了解白血病/淋巴瘤表型，从观察临床历史和形态开始，同时对每一情况选择一小组标记物。在大多数情况下，谱系能识别为 T 细胞、B 细胞、或骨髓，然后可以进行诊断或分类诊断。

淋巴瘤表型的目的，是识别瘤形成过程的细胞类型。该表型识别可以描绘细胞谱系和成熟程度的轮廓，作为淋巴瘤分类的辅助。还有，该表型识别可以帮助确定细胞种群是正常的还是异常的，并检测样品中细胞种群以前的特征，以便监控疾病的缓解、发展、或复发。

执行全血细胞计数（包括白细胞计数）。血细胞计数是疾病对治疗应答的一个重要指数。这些计数对了解药物治疗或放射疗法的效果，也是重要的。正常的白细胞计数约每立方毫米血液 4000 到 11,000。如果总 WBC 计数超过 11,000 细胞/mm³，被称为白细胞增多，是一种身体对感染的正常应答。血细胞计数有助于确定某一药物是否起作用。传统上，细胞的计数通常用类似于 FACS 扫描器的昂贵的电子计数器完成，要求技术专家使用该计数器进行测试。每一种细胞图谱类型表

明，是否存在淋巴瘤以及淋巴瘤的类型。

单克隆抗体小组

许多实验室使用多色免疫荧光法（multicolor immunofluorescence），虽然在某些情形下，适合用单色免疫荧光法。抗体照例包括：CD2、CD3、CD5、CD10、CD11c、CD14、CD19、CD20、CD22、CD23、CD25、CD45、CD103、FMC7、重链、Kappa、和 Lambda。如果临床的或形态学的特征提出“T”或“NK”淋巴细胞失调，那么，还需进行下面附加的抗体组合：CD3/CD4/CD8、CD7/CD5/HLA-DR、CD25/CD2/CD3、CD16/CD56/CD19、CD57/CD8/CD3、TCR alpha-beta/delta-gamma/CD3。

近期发展的许多生物疗法被用于与淋巴瘤斗争。例如，单克隆抗体（产生的抗体清除特定的靶细胞）已经用于淋巴瘤。

淋巴瘤病人的 WBC 分类计数，通常是异常的，或者由于白细胞增加，白细胞的增加可能有两个原因：（a）反应的 - 即仅次于感染、瘤形成、或炎症，（b）瘤形成的 - 即白血病的和相关的失调，或者由于白细胞减少，白细胞的减少可能有两个原因：（a）消耗或破坏（如脾机能亢进），（b）骨髓衰竭（此时通常是各类血细胞减少症）。

与感染作斗争，中性白细胞是重要的。当中性白细胞数下降至每微升 1000 细胞以下时，这种情况称为中性白细胞减少症。淋巴瘤治疗可能导致中性白细胞减少症。肥胖症和吸烟，会增加中性白细胞的计数。淋巴细胞分为 B（骨髓成熟）和 T（胸腺成熟）淋巴细胞。当成年人的淋巴细胞计数下降至每微升 1500 细胞以下，儿童下降至每微升 300 细胞以下时，这种情况称为淋巴细胞减少症。淋巴瘤可能导致淋巴细胞减少症。血小板（学名是 thrombocyte）是类细胞粒子，它们通过在出血出现的位点聚集，阻止出血。然后，它们发生作用并凝聚成块，阻止出血并促进凝结。如果病人有包括感染、炎症、恶性肿瘤等骨髓组织增生失调，又如果脾脏已经摘除，那么病人在紧张活动时，血小板计数增加。在标准血样中的血小板数，通常是每微升 133,000 到 333,000 血小板。如果血小板计数下降至 30,000 以下，则出现血小

板减少症，会导致异常出血。计数在 5000 以下，可以认为危及生命。血小板增加可以是 (a) 反应的 - 对出血、感染、或瘤形成，和 (b) 基本的 - 骨髓组织增生失调，等等。血小板减少可以由于 (a) 破坏性的 - 如免疫血小板减少症，或 (b) 骨髓衰竭 - 通常也累及其他血细胞（即存在各类血细胞减少症）。因为化学疗法影响血细胞的制造，所以检查血液中各类细胞的数量，是重要的。

用市售的手动或电子仪器，测量血红蛋白水平、血细胞比容、总的白细胞、和红细胞计数，可以完成 CBC。一些变化可以包括：血小板计数、白细胞分类计数、和细胞指数。对细胞计数、体液如 CSF 中细胞种类、胸膜液、ascetic、心包液、胃抽液，血液学分析器完全是自动的，测量结果是精确的。

用抗体技术检测与细胞有关的抗原的能力，为诊断病理学添加一种新的手段。有各种技术可用于研究血淋巴失调免疫表型。但是，在对包括基于病毒的疾病，如获得性免疫缺损和 T 细胞白血病，以及各种癌等许多疾病的总的检测方法中，利用抗体抗原反应的免疫测定方法的向前发展，还必须开发。本领域熟练人员应当知道，本发明的测定方法和光生物盘系统，可以用于完成这种免疫测定。

常规的微量免疫测定，如放射免疫测定 (RIA)、酶免疫测定 (EIA)、荧光免疫测定 (FIA)，分别使用同位素、酶、或荧光物质，检测与这些物质有专门反应的相应抗体或抗原的存在或不存在。但是，上述方法是受限制的和有缺点的。RIA 要求特殊的装备、预防措施、受半衰期限制、及各种其他因素。使用酶或荧光物质作记号的方法，是通过确定颜色或照度来测量的，要求灵敏、复杂的仪器来检测量热计的或荧光的反应，此外还要求若干清洗步骤，去除过量的、未结合的、未反应的试剂。再有，上述检测方法的应用，对细胞，特别是淋巴细胞和癌细胞等样本，还需要改进的制备技术、高效率的检测及分析。

围绕专门用于细胞表面抗原的荧光抗体的使用，已经发展的强有力工具，是荧光活化细胞分类 (FACS) 技术。这是一种十分可靠、

快速、和灵敏的方法。流式细胞计是最实用的方法，它是自动的和定量的。流式细胞计量术分析，对样品最基本的要求是，该样品需在单分散混悬液中，并对需要的细胞以荧光标记物标记。但是，这是非常高价的测试，且整个系统要求训练有素的技术员，在临床分析实验室和昂贵的仪器中处理。单克隆抗体被用作分立的探子和流式细胞计量，对大量细胞作客观的定量的计量。

此外，根本的缺点在于，细胞一旦被分析后，不能再用于重复分析或另外的调查，比如罕见病例细胞的显微镜观察。已经发展了许多另外的技术，与流式细胞计相比，有优点也有缺点，都有它们自己特有的问题。

表面标记物分析是重要的实验室工具，特别在研究白血病、淋巴瘤、和免疫缺损等疾病中，非常有用。基于抗体的微阵列技术，对包含在血液和组织样品的样品中特定抗原的识别，特别是在临床诊断中，确实是最优良的技术。大多数诊断测试，要求确定的只是分析物的有限的一小组（如在癌、白血病、淋巴瘤、甲状腺疾病等等中）。因此，只要求非常少量的血样、又节省时间和实验室人员成本、在单次测试中同时测量所有临床上有关参数的微型化技术，因它的性能价格比、劳动效率、和它的简约性，很可能证明对医院实验室和护理中心（point-of-care）设备有极大的吸引力。

作为另一种用于细胞计数的现有技术系统和方法，我们已经研发了一种简单的、价格低廉的系统，用于分析、检测、和测定细胞数量特别是血细胞数量、包括检测感染血液和其他生物液体如 CSF 的寄生虫和病原体。已经研发了有关的信息和信号处理方法及软件，可以识别各种血细胞、寄生虫、和病原体。

与现有方法和系统比较，我们已经研发了一种简单的、微型化的、超灵敏的、价格低廉的系统，用于细胞分析。本系统使用光生物盘、有关的检测组件、以及信息和信号处理方法和软件。

发明内容

本发明的一个主要方面，是提供使用光生物盘，检测生物样品中

血细胞分析物的方法和设备。本发明还涉及定性和定量的方法，用于细胞分离和包括免疫表型的分型。本发明可以优先用于与公开在下述共同授予并共同待决的专利申请中的任何盘、测定法、和系统组合：U.S. Provisional Application Serial No. 60/302,757，标题是：“Clinical Diagnostic Optical Bio-Disc And Related Methods For Selection And Detection Of Lymphocytes Including Helper-Inducer/Suppressor-Cytotoxic Cells”，2001年7月3日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/306,035，标题是：“Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping”，2001年7月17日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/305,993，标题是：“Capture Layer Assemblies and Optical Bio-Disc for Immunophenotyping”，2001年7月17日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/306,592，标题是：“Methods for Imaging Blood Cells, Blood-Borne Parasities, and Other Biological Matter Including Related Optical Bio-Disc and Drive Assemblies”，2001年7月19日申请；和 U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,263，标题是：“Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping”，2001年7月23日申请。本文引用所有这些申请，供参考。

另一方面，本发明针对细胞的分型，包括测定的 CD 科、CD4/CD8 测定、属的同种的固态细胞捕获测定（a generic homogeneous solid phase cell capture assay），以便快速确定 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞的绝对数量，并获得血样中 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞的比值。

本发明还有一个方面，是提供针对细胞分型，包括测定的 CD 科的测定和白血病与淋巴瘤的细胞表面标记物的系统和方法。这些测定是同种的固态细胞捕获测定，以便在血样中，快速确定各种淋巴瘤或 CD 特定表面标记物的绝对数量。

本发明还针对特定细胞的捕获方法，该方法用现场外培养

(**off-site incubation**) 的样品的主抗体, 捕获特定的细胞, 随后用结合表面的副抗体捕获。光生物盘和支持的软件及处理方法, 是本发明的又一方面。

本发明还有再一方面, 是针对细胞分离和分型的系统和方法, 该系统和方法的根据, 是盘特定位置上的定位细胞捕获原理。根据单克隆或多克隆抗体对特定淋巴细胞(白细胞)抗原的捕获化学反应, 通过对这一捕获化学反应的定位应用, 在盘上建立若干特定细胞的捕获场。

测定是在生物盘上进行的, 生物盘上包括有特定抗体附着在固态上的流动空腔。用辅助诱导物/抑制剂细胞毒素(**helper-inducer/suppressor-cytotoxic**)测试, 确定捕获区中特定抗体捕获的细胞, 例如 **CD4+**、**CD8+**、**CD3+**、**CD19+**、和 **CD45+**淋巴细胞的绝对数量, 这一测试是用从全血分离的 7-15 μl (视空腔的深度而定) 单核细胞(MNC)进行的。在把 MNC (30,000 细胞/ μl) 注入空腔后, 要研究的如 **CD4+**、**CD8+**、**CD3+**、和 **CD45+**细胞的细胞递呈抗原或表面标记物, 在盘上的捕获区被专门捕获。后者, 可以用当前的细胞捕获方法, 以全血代替 MNC 直接测定。同时在分析空腔中还有确定的负控制区域。

本发明还有一个方面, 是提供与光学分析盘结合, 进行细胞检测并对细胞计数的测定方法和设备。本发明还有一个方面, 是提供与光学分析盘结合, 进行淋巴瘤检测的测定方法和设备。

按照本发明的另一个方面, 是提供一种方法, 该方法包括在盘表面内或其上提供样品, 该盘有可供光阅读机读出的编码信息。该信息能用于控制阅读机相对于盘的扫描。

本测试或测定, 至少可用两种方式进行。第一种方法, 是根据位于光生物盘上特定通道中的血细胞的光学成像原理。把约 5 到 20 微升的全血, 注入盘上特殊设计的通道。用细胞识别软件分析像, 该软件能识别各种红细胞和淋巴细胞的亚型, 并分别产生红细胞和白细胞的分类计数。第二种方法, 是根据用抗某种特定细胞的细胞特定抗体,

来捕获特定的细胞。在其中的一个特殊实施例中，抗体被向着例如淋巴细胞（CD2、CD19）、单核细胞（CD14）、和嗜酸性细胞（CD15）引导。这些淋巴细胞亚型的特定抗体，被汇集/附着于包含流动空腔的生物盘内的固体表面。在其他的实施例中，捕获抗体被向着有待研究的特定表面标记物的其他细胞引导，如 CD3、CD4、CD8、和 CD45。

样品一旦装入分析空腔，并有足够时间与它们相应的捕获剂在捕获区结合，盘便在盘驱动器或任何等同的旋转器中，按预定的速度及时间旋转，以便把未结合的细胞从捕获区中除去。旋转之后，把盘装入光阅读机，然后，来自辐射源的电磁辐射入射束被引向盘。通过盘绕中心轴旋转并通过沿轴的径向移动光束，使光束在盘上扫描。或者穿过盘透射、或者从盘反射的电磁辐射束，被检测并分析，以提取表征样品的信息。

本发明各实施例还包括有衬底和顶盖的盘，衬底和顶盖隔开，形成空腔。样品材料，如有细胞的血，放进空腔中。当盘旋转时，样品通过捕获区运动。捕获区包括捕获层，上有抗体或其他特定结合的配偶体，这些抗体或配偶体与如 CD4 和 CD8 的抗原结合，这些抗原是要研究的细胞类型的细胞表面标记物。一次测试最好能用于使 CD4 和 CD8 和血样中其他分析物成像。按照本发明的另一个方面，是提供一种盘阅读机，用于把光引向捕获区所在的靶区域，并检测透射的或反射的光，对捕获的细胞加以识别和计数。这些 CD4 和 CD8 的计数，和它们之间的比值，对监控诸如 AIDS 的状况是有用的。

测试样品最好送至盘内的空腔。单个空腔最好有多个捕获区域，每一个可以有一种或多种抗体。在一个实施例中，单一通道有多个捕获区，每一个有不同类型的抗体，并可以有用作控制区的捕获区。这些捕获区可以顺着盘的一条或多条半径排列。检测方法包括：检测特性中的变迁，或把观察窗成像并用像识别软件对捕获的细胞计数。计数可以是直接的，如对需要的细胞计数；也可以是间接的，如对需要的和不需要的细胞集合计数，对不需要的细胞计数，再用减法获得需要的细胞计数。捕获区可以有一层或多层抗体层。

当某一细胞样品已放在盘上时，盘可以按一档或多档旋转，把细胞移至捕获区，然后从捕获区移去未结合的细胞。样品也可以按其他方式处理，如，培养或用检测的光源加热。可以用显微流态学方法添加染料或其他需要处理盘上样品的任何液体。该种处理最好在盘信息存储器区域的编码信息中说明。最好采用存储的信息，使驱动器和阅读机按需要的速度旋转，并按其他中间步骤，如培养步骤旋转需要的时间。

微技术在临床诊断中，对识别细胞类型、寄生虫、病原体、和其他生物物质，特别有价值。本发明利用微技术，对光生物盘上的全血进行白细胞分类计数。此外，本发明针对成像的血液细胞，对白细胞进行分类计数，还针对相关的处理方法和软件。

按照本发明的另一种测试或测定，可以按至少两种方式进行。第一种方法，是根据位于光生物盘上特定通道中的血细胞的光学成像原理。把约 5 到 20 微升的全血，注入盘上特殊设计的通道。用细胞识别软件分析像，该软件能识别各种淋巴细胞的亚型，并产生白细胞的分类计数。第二种方法，是根据用抗某种特定细胞的细胞特定抗体，来捕获特定细胞。在本具体实施例中，抗体被向着例如淋巴细胞（CD2、CD19）、单核细胞（CD14）、和嗜酸性细胞（CD15）引导。这些淋巴细胞亚型的特定抗体，被汇集/附着于包含流动空腔的生物盘内的固体表面。

采用生物盘驱动器组件使盘旋转，读出并处理任何存储在盘上的编码信息，还分析生物盘流动空腔中的细胞捕获区。生物盘驱动器设有旋转生物盘的电动机、控制盘转速的控制器、处理从盘返回信号的处理器和分析被处理的信号的分析器。旋转速度和旋转方向是可变的，速度、旋转时间两者都可以精密控制。当流动空腔和靶区的测试材料被驱动器读出光束询问和分析器分析之前、之中、或之后，还可以利用生物盘把信息写入生物盘。生物盘可以包括：用于控制盘旋转的编码信息；提供专门用于进行免疫分型（immunotyping）测定类型的处理信息；和用于在与生物盘有关的监控器上显示结果的处理信息。

已经对 CD、CD-R、或 DVD 格式、这些格式的修改版本、和另外的格式，开发了一般的分类细胞计数设计，特别是分类白细胞计数设计。驱动器的读出或询问光束，检测分析样品中各种细胞，并产生能供分类细胞计数器软件分析的像。

显微镜方法或复杂的细胞计数器，基本上执行的是这些冗长而费力的细胞计数测定。本发明用光生物盘及相关的组件。分析空腔中各种任意淋巴细胞亚型的光学像，或者那些被特定抗体方法捕获的各种淋巴细胞亚型的光学像，是通过细胞识别软件程序产生并分析的，细胞识别软件通过血液中或其他体液中各种细胞单元的光散射性质，识别血液中或其他体液中各种细胞单元。在经过入射光束与要研究的样品间光/物质的相互作用后，检测返回的光。处理被检测的返回的光信号后，给出可辨识的信号特征波形或数字 ID。而现有技术方法，通常要求准备诸如细胞染色、RBC 去除、或其他费力的实验设计，本方法的实施例不要求任何样品的预处理。这些方法包括显微镜分析，或在 CD 型或用顶检测器、底检测器、甚至计数器、或细胞计数器的光盘阅读机的细胞检测。

下面各段按照本发明针对生物盘制作的某些特殊优选实施例，给出主要的方法步骤概述。

盘的制备：用空喷气枪清洁金反射盘或透射盘，除去任何尘埃颗粒。用旋转涂布机以异丙醇清洗盘两次。把 2% 的聚苯乙烯旋转涂布在盘上，在整个盘上给出非常厚的涂敷层。

化学淀积：一个实施例包括三步淀积实验设计，用于培养：抗生蛋白链菌素，培养 30 分钟；生物素基的第一抗体，培养 60 分钟；第二捕获抗体，培养 30 分钟。所有步骤都在室温下，在湿的箱中，在淀积之间用严格的清洗和干燥步骤完成。

简要地说，磷酸盐缓冲液盐水 (phosphate buffered saline) 中 1 μ l 的 1 mg/ml 抗生蛋白链菌素，在每一窗上形成层，并培养 30 分钟。用蒸馏水把过量的抗生蛋白链菌素清洗掉并把盘干燥。通过把等体积的生物素基 IgG (在 PBS 中 125 μ g/ml) 与醛活化 (aldehyde-activated)

右旋糖酐 (200 μ g/ml) 组合, 制备生物素基 IgG 右旋糖酐络合物。右旋糖酐醛生物素基 IgG 络合物, 在每一捕获窗的抗生蛋白链菌素上形成层, 并培养 60 分钟, 或置于冰箱中一个晚上。过量的试剂被清洗掉, 盘被旋转干燥。通过用捕获抗体在生物盘缝隙上的指定点形成层, 建立特定的条码形分区捕获模式。对分类计数, 例如, 抗中性白细胞 (CD128 或其他)、抗淋巴细胞 (CD2、CD19、CD56、及其他)、抗嗜酸性细胞 (CD15)、抗单核细胞 (CD14)、抗嗜碱白细胞 (CD63)、和抗血小板 (CD32 和 CD151) 都在每一缝隙的指定点形成层。下面列出的表 1、2、和 3, 是捕获层组合的各种捕获模式例子。培养 30 分钟, 或置于冰箱中一个晚上。盘的组装, 用 25 μ m、50 μ m、或 100 μ m (50 μ m 通道要求的样品体积, 是 25 μ m 通道空腔需要的两倍), 直的, U 型的、或其他通道格式, 加上透明的覆盖盘 (对使用顶检测器) 或反射的覆盖盘 (对使用底检测器)。

表 1

捕获层组合与变化 1

窗	1	2	3	4	5	6
第 1 层 (活性层)	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯
第 2 层		抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素
副抗体	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO
主抗体	参考标记	淋巴细胞 特定抗体	中性白细 胞特定抗 体	嗜酸性白 细胞特定 抗体	嗜碱白细 胞特定抗 体	单核细胞 特定抗体

作为无极性蛋白结构与盘表面之间疏水相互作用的结果, 蛋白 (如抗原和抗体) 被动地吸附在盘表面。蛋白吸附率及程度, 与许多因素有关, 包括: 涂敷在体积上的涂敷溶液的表面面积比、被吸附的

物质浓度、温度、和吸附时间。但是，化学性质的牢固度与蛋白本身稳定性有关。

与红细胞比较，淋巴细胞要大得多，且对有效的细胞捕获要求稳定的、牢固的化学性质。为此，在生物盘表面，我们利用生物素和卵白素的强相互作用。一种桥技术在本发明的一个实施例中使用，其中把结合生物素的抗鼠抗体 IgG（在羊中培育）与醛活化右旋糖酐偶联，作为主捕获抗体与涂敷抗生蛋白链菌素的盘表面之间的桥。此外，或作为另一种卵白素与生物素交联，可以用多功能的交联剂，如活化的醛右旋糖酐（DCHO），有利于抗体与盘表面的结合。捕获层与盘表面之间稳定的和强的键，可以增强细胞的捕获，还可以减少抗血清的使用、减少反应时间、和减少非指定的结合。

在本发明的另一个实施例中，在固态上的特定细胞捕获，是用副捕获抗体完成的，该副捕获抗体对主抗体有特殊的亲和力。该副捕获抗体与固体表面结合。样品细胞可以用主抗体在位点外培养，然后注入测定空腔，或者把主抗体在副抗体上形成层，下面还要说明。简要地说，例如，在磷酸盐缓冲液盐水中 $1\ \mu\text{l}$ 的 $1\ \text{mg/ml}$ 抗生蛋白链菌素，在每一窗上形成层，并培养 30 分钟。用蒸馏水把过量的抗生蛋白链菌素清洗掉并把盘干燥。通过把等体积的生物素基 IgG（在 PBS 中 $125\ \mu\text{g/ml}$ ）与活化的醛右旋糖酐（ $200\ \mu\text{g}\cdot\text{ml}$ ）组合，制备 IgG 右旋糖酐络合物。右旋糖酐醛生物素基 IgG 络合物，在每一捕获窗中在抗生蛋白链菌素上形成层，并培养 60 分钟，或置于冰箱中一个晚上。过量的试剂被清洗掉，盘被旋转干燥。通过用捕获抗体在生物盘缝隙上的指定点形成层，建立特定捕获区的模式。对辅助剂/诱导物及抑制剂/细胞毒素测定，按下面表 2 的指定，把抗 CD4、抗 CD8、和抗 CD3、及抗 CD45，在副抗体上形成层。培养 30 分钟，或置于冰箱中一个晚上。盘的组装，用 $25\ \mu\text{m}$ 或 $100\ \mu\text{m}$ “U”型粘附层（3M），加上在使用顶检测器情形下的透明覆盖盘，或在使用底检测器情形下的反射覆盖盘。有关双层抗体捕获方法的进一步细节，下面结合图 35A-35D、36、和 37 讨论。

表 2
捕获层组合与变化 II

窗	1	2	3	4	5	6
第 1 层	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯	聚苯乙烯
第 2 层	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素	抗生蛋白 链菌素
副捕获抗 体	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO
主捕获抗 体		抗人 CD4	抗人 CD8	抗人 CD3	抗人 CD45	抗人 CD15

另外，MNC 样品的等分样本，用抗要研究的细胞的抗体，在位点外培养。对辅助剂/诱导物及抑制剂/细胞毒素测定，MNC 用抗 CD4、抗 CD8、抗 CD3、抗 CD14、及抗 CD45 培养 15 分钟，使之充分相互作用。未结合的抗体用清洗去掉（以 1000 转/分离心 5 分钟）。然后，把已清洗的络合物，注入已用特定捕获副抗体如特定的 IgG 打底的空腔 25 - 100 μm （用 3M 粘附层或之类建立）。培养 30 分钟之后，用顶检测器（透明覆盖盘）或用底检测器（反射的金覆盖盘）使专门捕获的细胞成像。涉及该细胞捕获方法的细节，下面结合图 31A - 31E 说明。该方法能判定一种特定的要研究的抗体。因此，盘上每一缝隙或空腔，专门用于调查一种特定的要研究的细胞类型。例如，确定谱系是淋巴瘤中的 T 细胞（以 CD3 培养的细胞）还是 B 细胞（以 CD19 培养的细胞）。通过盘的设计，可以容纳需要数量的空腔/缝隙。下面表 3 所示例子，表明在 8 空腔/通道盘上附加的捕获层模式。

表 3
捕获层组合与变化 III
模式 1

通道	1	2	3	4	5	6	7	8
第 1 层	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯
第 2 层	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素
副捕获 抗体	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO
主捕获 抗体	抗人 CD4	抗人 CD4	抗人 CD8	抗人 CD8	抗人 CD45	抗人 CD45	抗人 CD19	抗人 CD19

模式 2

通道	1	2	3	4	5	6	7	8
第 1 层	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯	聚苯乙 烯
第 2 层	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素
副捕获 抗体	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG
主捕获 抗体	抗人 CD4	抗人 CD4	抗人 CD8	抗人 CD8	抗人 CD45	抗人 CD45	抗人 CD19	抗人 CD19

模式 3

空腔/缝 隙	1	2	3	4	5	6	7	8
第 1 层	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素
副捕获 抗体	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG	B 抗鼠 IgG
主捕获 抗体	抗人 CD4	抗人 CD4	抗人 CD8	抗人 CD8	抗人 CD45	抗人 CD45	抗人 CD19	抗人 CD19

模式 4

空腔/缝 隙	1	2	3	4	5	6	7	8
第 1 层	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素	抗生蛋 白链菌 素
副捕获 抗体	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO
主捕获 抗体	参考标 记	抗人 CD4	抗人 CD4	抗人 CD8	抗人 CD8	抗人 CD45	抗人 CD19	

模式 5

通道	1	2	3	4	5	6	7	8
副捕获 抗体	抗鼠 IgG + DCHO	抗鼠 IgG+ DCHO	抗鼠 IgG+ DCHO	抗鼠 IgG+ DCHO	抗鼠 IgG+ DCHO	抗鼠 IgG+ DCHO	抗鼠 IgG+ DCHO	抗鼠 IgG+ DCHO
主捕获 抗体	参考标 记	抗人 CD4	抗人 CD4	抗人 CD8	抗人 CD8	抗人 CD45	抗人 CD19	

模式 6

通道	1	2	3	4	5	6	7	8
主捕获	参考标	抗人	抗人	抗人	抗人	抗人	抗人	空
抗体	记	CD4	CD4	CD8	CD8	CD45	CD19	

盘漏的检测和阻断不需要的细胞的非指定结合：因为要分析的是血液，一种生物公害材料，所以盘要查漏，这是本发明质量控制制作的一部分，以确保在盘带着样品原地旋转时，没有任何空腔是泄漏的。每一通道最好充以 StabilGuard，这是一种市场上可以买到阻隔剂，能阻隔一小时。盘以每分钟 5000 转旋转 5 分钟，同时观察泄漏情况和盘的稳定性。检查泄漏之后，把盘置于真空室中 24 小时。抽真空后，把充有 PBS 缓冲剂或空的各空腔放进真空盒并存储在冰箱中，直至使用。

从全血分离暗黄色膜（buffy coat）层：把静脉血在离心管中以每分钟 2800 转的转速，离心脱去纤维，制备暗黄色膜。用细移液管小心移去上层的清液血浆。然后用移液管取出下面包含淋巴细胞和血小板的白色层。一种另外的不用离心而从血液获得暗黄色膜的方法是，用沉淀增强剂，如血纤维蛋白原、右旋糖酐、阿拉伯胶、Ficoll、或甲醛纤维素，使血液沉淀。Boyum 试剂（甲醛纤维素与甲泛影钠）特别适合用于制备没有任何红细胞含量的淋巴细胞。另外，淋巴细胞可以通过正的或负的选择，或溶解方法，从全血分离淋巴细胞。

盘上测定 - 基本技术描述：分类白细胞计数盘测试的一个优选实施例，包括三个个别的部分，（1）包含化学反应的基本盘，（2）通道层，和（3）覆盖盘。

最好在 PBS 中稀释了的暗黄色膜或全血，注入盘的空腔，空腔的入口和出口用胶带密封，然后最好在室温下把盘培养一段需要的时间。对第一种方法，用带有顶检测器或底检测器光驱动器中标准的 780 nm 激光，扫描盘上给定区域（如，约 1 毫米平方的面积）。有关的细胞识别软件，已由受让人研发并公开在 U.S. Provisional Application Serial No. 60/363,949 中，标题是：“Methods For Differential Cell

Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same", 2002 年 3 月 12 日申请, 和在 U.S. Provisional Application Serial No. 60/404,921 中, 标题是: **"Methods For Differential Cell Counts Including Related Apparatus and Software for Performing Same"**, 2002 年 8 月 21 日申请, 这些识别软件自动地从捕获的像, 给出分类计数, 该捕获的像例如最好等于 1 毫米平方。对第二种方法, 用标准的 780 nm 激光把捕获区成像, 该捕获区可以包括淋巴细胞, 中性白细胞、嗜碱白细胞、嗜酸性细胞、单核细胞、和血小板。由受让人研发的细胞识别软件, 自动执行如下程序: (a) 通过离心去除过量的未结合细胞, (b) 把特定区域或特定的捕获区成像, 和 (c) 数据处理, 数据处理包括每一捕获区中特定细胞的计数和导出淋巴细胞不同子集的数量。

在处理步骤, 识别软件在每一捕获区上把它遇到的细胞读出并作标记。处理从每一捕获区得到的数据之后, 软件显示每微升血液体积中淋巴细胞, 中性白细胞、嗜碱白细胞、嗜酸性细胞、单核细胞、和血小板区中的数量。整个处理, 从把盘插入光驱动器到显示要研究的结果, 约需 10 - 15 分钟。

与本发明有关的已公开的内容, 也在下面的专利申请中给出: U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,262, 标题是: **"Capture layer Assemblies and Optical Bio-Discs for Immunophenotyping"**, 2001 年 7 月 23 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,264, 标题是: **"Method for Imaging Blood Cells, Blood-Borne Parasites and Pathogens, and Other Biological Matter Including Related Optical Bio-Discs and Drive Assemblies"**, 2001 年 7 月 23 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,562, 标题是: **"Optical Analysis Discs Including Fluidic Circuits for Optical Imaging and Quantitative Evaluation of Blood Cells Including Lymphocytes"**, 2001 年 7 月 23 日申请; 和 U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,487, 标题是: **"Method for Differential Cell Counts Including**

Leukocytes and Use of Optical Bio-Discs for Performing Same”，2001年7月24日申请，本文引用所有这些专利申请，供参考。

下面各段，按照本发明一些优选的具体实施例，概括地给出盘说明的主要基本单元。

跟踪设计：在本发明的一个优选实施例中，盘是向前的 Wobble Set FDL21:13707 或 FDL21:1270，镀有 300 nm 的金。在该反射盘上，用光刻刻蚀出大小是 2×1 mm 的椭圆形数据窗。“U”形通道使用 25 μm 高的空腔建立的。它可令约 7 μl 的样品充满整个空腔，空腔有入口和出口。最好使用 4 窗/4 通道格式。但是，对透射盘，不刻蚀数据窗，整个盘都可供使用。

粘附层和结合剂：在一个优选实施例中，粘附层或通道层，包括该“U”形流体通路，是由 Fraylock 粘附层 DBL 201 Rev C 3M94661 构成的。也可以用直的通道建立空腔。

覆盖盘：透明的盘，在目前盘组件的一个特定实施例中，使用全反射的覆盖盘，在 26 mm 半径上等距离地设有 48 个 0.040 英寸直径的样品入口。

数据捕获和处理：用软件以推荐的×4 速度扫描数据盘并读出，而使用受让人的细胞识别软件，抽样速率为 2.67 MHz。

软件：本发明还包括处理方法和相关的细胞识别与成像软件。本软件针对细胞计数和分类细胞计数的执行及显示。本软件可以存储在光生物盘上、存储在光盘驱动器阅读机装置中、或只能由光阅读机从安全的服务器接入。该服务器可以在计算网络中实现，如局域网（LAN）、广域网（WAN）、或在互连网上规定的条款和条件下可用的其他服务器。该分布式方法在共同授予的下述专利申请中公开：U.S. Provisional Application Serial No. 60/246,824，标题是：“Interactive Method and System for Analyzing Biological Samples and Processing Related Medical Information Using Specially Prepared Bio-Optical Disc, Optical Disc Drive, and Internet Connections”，2000 年 11 月 8 日申请，及相关的 U.S. Patent Application Serial No. 09/986,078，标

题是：“Interactive System for Analyzing Biological Samples and Processing Related Information and the Use Thereof”，2001年11月7日申请，本文引用该两专利申请全文，供参考。

材料：在本文公开的不同优选实施例中，采用的材料包括：向前摆动的用金金属化的光刻胶盘；透射式金金属化盘；移液管和尖；旋转涂布器；离心机；摆起电动机（swing-out rotor）；带抗凝血剂，如柠檬酸钠或乙二胺四乙酸（EDTA）的 Vacutainer™ CPT 管；湿的箱；盘冲压机；粘附层；覆盖盘；透明覆盖盘；胶带之类；真空设备；金引头（yellow tips）；和真空室。

试剂：按照本发明的一些方法，在实现细胞计数中采用的试剂，包括：磷酸盐缓冲液盐水、异丙基乙醇、蒸馏水、和 StabilGuard。

本发明的一个目的，是克服已知技术中的限制。本发明的另一个目的，是使已知的光盘系统，适于在光生物盘上完成全血中的分类白细胞计数。本发明还有一个目的，是使血细胞成像并完成分类白细胞计数。

本发明的这些和其他的优点，是在完成簇指定计数（cluster designation count）的光盘和驱动器系统中取得的，该光盘和驱动器系统包括：光学测定盘、光源、光盘驱动器的光电检测器电路、和处理器。光学测定盘包括：衬底、在衬底上的活性层、和通过粘附层或通道单元整体附着在活性层上的顶盖部分。粘附单元有一部分或多部分被从其上除去，以便形成空腔，在空腔中，有一种或多种捕获剂是固定不动的。捕获剂，在活性层上是不动的，并在空腔之内，所以定义了分立的捕获区。光源把光引导至盘上的捕获区。光盘驱动器的光电检测器电路，用于检测从盘反射的光，或透过盘的光，并从光盘组件提供载有信息的信号。处理器与光电检测器电路耦合，从载有信息的信号，获得用于操作光盘系统的操作信息，并对与捕获剂结合的样品中各项目进行计数。

按照该系统的一个特定的方面，处理器包括像识别软件，用于检测细胞并使细胞成像。在一个实施例中，光电检测器与光源在盘的同

一侧，以便检测从捕获区反射的光。在另一个实施例中，光电检测器与光源在盘的两个相反侧，以便检测透过捕获区的光。

本发明还针对用光盘和盘驱动器进行簇指定计数的方法。方法包括如下步骤：把血样放进含有分离梯度（separation gradient）的第一管；按一定时间和足以把血样分离成层的速度，旋转该第一管；使含有 T 细胞的 MNC 层再混悬，形成 MNC 混悬液；把 MNC 混悬液样品放在包括至少一个捕获区的盘表面，该至少一个捕获区包含至少一种捕获剂；把盘装入光阅读机；旋转盘；引导入射的电磁辐射束到达捕获区；检测经过与盘的捕获区相互作用之后形成的电磁辐射束；把检测的电磁束转换为输出信号；和分析该输出信号，提取与捕获区上捕获的细胞数有关的信息。在该方法的一个实施例中，光盘的结构有反射层，可使引导至捕获区又不落在细胞上的光被反射。在该方法的另一个实施例中，光盘的结构可使引导至捕获区又不落在细胞上的光，透过光盘。其他属于确定样品中细胞种群浓度的有关方面，公开在下述共同授予并共同待决的专利申请中：U.S. Provisional Application Serial No. 60/384,205，标题是：“Optical Disc Systems For Determining The Concentration Of Cells or Particles In A Sample And Methods Relating Thereto”，2002 年 5 月 30 日申请。本文引用该申请全文，供参考。

按照该方法的另一个方面，盘表面以第一组细胞捕获剂涂敷。在该方面的一个实施例中，捕获剂借助交联系统，在盘表面是固定不动的。在另外的一个实施例中，捕获剂直接在盘表面，是固定不动的。

按照该方法的再一个方面，捕获剂定义一个或多个分立的捕获区。在其中的一个特定实施例中，该一个或多个分立捕获区，位于光盘内一个或多个空腔中。在该方法的又一个实施例中，捕获剂对细胞表面抗原，有选择性的亲和力。在另外的实施例中，捕获剂用于与主捕获剂结合，该主捕获剂对细胞表面抗原具有选择性的亲和力。在一个优选的实施例中，细胞表面抗原是独立地从抗原的 CD 科选择的。在一个更为可取的实施例中，细胞表面抗原选自包含 CD3、CD4、CD8、

和 CD45 的一组。

按照该方法的又一个方面，旋转包括以足够的速度旋转一段足够的时间，使细胞有机会与捕获抗原结合。在该方法该方面的一个实施例中，旋转还包括以足够的速度旋转一段足够的时间，以便把未结合的细胞移出捕获区。在该方法该方面的一个优选实施例中，旋转是以单一的速度完成的。

按照本发明这些方面的方法的实施例，最好还包括如下步骤：把 MNC 细胞样品引导至捕获剂附近、在已有的捕获剂中培养细胞、和使细胞与捕获剂进行专门的结合。该方法的一个实施例，还包括分析捕获的细胞数的步骤，据此确定样品中细胞的浓度。在该实施例的一个方面中，分析包括，检测从盘反射或透过盘的光强足够大的变化。在该实施例的另一个方面中，分析包括，用像识别对捕获的细胞计数。在该方法的一个优选实施例中，像识别可以把白细胞的一种类型从另一种类型区分开来。

该方法的另一个实施例，还包括对每一捕获区中捕获的细胞计数的步骤，和给出包含细胞计数的输出的步骤。在该实施例的一个方面，该输出包括 CD4 细胞和 CD8 细胞的计数，及 CD4 与 CD8 细胞的比值。

按照本发明的又一个主要方面，是提供另一种进行簇指定计数的方法。该另一种方法包括如下步骤：（1）在有分离梯度的管中提供血样；（2）以足够使血样分离成层的时间和速度旋转该管；（3）使包含 T 细胞的 MNC 层再混悬，形成 MNC 混悬液；（4）向 MNC 混悬液添加主抗体，形成主抗体 T 细胞络合物；（5）把主抗体 T 细胞络合物的样品放在盘表面，该盘表面包括至少一个含有至少一种捕获剂的捕获区；（6）把盘装入光阅读机；（7）把入射的电磁辐射束引向捕获区；（8）检测经过与盘的捕获区相互作用之后形成的电磁辐射束；（9）把检测的电磁束转换为输出信号；和（10）分析该输出信号，提取与捕获区上捕获的细胞数有关的信息。

类似地，在该另外的方法的一个实施例中，光盘的结构有反射层，

以便反射引导至捕获区又不落在细胞上的光。在该方法的另一个实施例中，光盘的结构可使引导至捕获区又不落在细胞上的光，透过光盘。

按照该方法的一个方面，盘表面以第一组捕获剂涂敷。在该方面的一个实施例中，捕获剂借助交联系统，在盘表面是固定不动的。在另外的实施例中，捕获剂直接在盘表面，是固定不动的。

按照该方法的又一个方面，捕获剂定义了一个或多个分立的捕获区。在该方面的一个特定的实施例中，该一个或多个分立捕获区，位于光盘内一个或多个空腔中。在该方法的另一个实施例中，捕获剂用于与细胞表面抗原结合。在另外的实施例中，捕获剂用于与第二组捕获剂结合，该第二组捕获剂对细胞表面抗原有选择性的亲和力。在一个优选的实施例中，细胞表面抗原是独立地从抗原的 CD 科选择的。在一个更为可取的实施例中，细胞表面抗原选自包含 CD3、CD4、CD8、和 CD45 的一组。

按照该方法的再一个方面，旋转包括以足够的速度旋转一段足够的时间，使细胞有机会与捕获抗原结合。在该方法该方面的一个实施例中，旋转还包括以足够的速度旋转一段足够的时间，以便把未结合的细胞移出捕获区。在该方法该方面的一个优选实施例中，旋转是以单一的速度完成的。

按照本发明这些方面的方法的实施例，最好还包括如下步骤：把主抗体 T 细胞络合物引导至捕获剂附近、在已有的捕获剂中培养该络合物、和使络合物与捕获剂进行专门的结合。该方法的一个实施例，还包括分析捕获的络合物数的步骤，据此确定样品中细胞的浓度。在该实施例的一个方面中，分析包括，检测从盘反射或透过盘的光强足够大的变化。在该实施例的另一个方面中，分析包括，用像识别对捕获的络合物计数。在该方法的一个优选实施例中，像识别可以把白细胞的一种类型从另一种类型区分开来。

该方法的另一个实施例，还包括对每一捕获区中捕获的细胞计数的步骤，和给出包含细胞计数的输出的步骤。在该实施例的一个方面，该输出包括 CD4 细胞和 CD8 细胞的计数，及 CD4 与 CD8 细胞的比

值。

在上述方法的任一个中，管还可以包括抗凝血剂。还有，在许多这些方法的特定实施方案和实施例，捕获剂在其上固定不动的表面，是在盘内的表面，并被衬底和顶盖两个相对侧封闭。

按照本发明的制作方面，是提供一种制作实施簇指定计数的光学测定盘的方法。制作光学测定盘的方法，包括如下步骤：向管中提供交联剂、向管添加捕获剂、使交联剂与捕获剂组合（形成络合物）、设置衬底、以活性层涂敷衬底、把络合物淀积在活性层上、和用粘附单元把顶盖部分附着于活性层。在本实施例中，交联剂是醛活化右旋糖酐。捕获剂用于与细胞表面抗原结合。

按照本方法的一个方面，淀积包括把络合物淀积在预定的位置，从而形成捕获区。在本方法的一个实施例中，附着包括附着有反射层的顶盖部分，以便反射引导至捕获区又不落在细胞上的光。在本方法的另外的实施例中，附着包括附着有半反射层的顶盖部分，以便使引导至捕获区又不落在细胞上的光，透过光盘。

在另外的实施例中，捕获剂包括主、副捕获抗体。副抗体与盘表面结合，并对主捕获抗体有特殊的亲和力。在本实施例中，主捕获抗体对要研究的细胞表面抗原，有选择性的亲和力。在本实施例的一个优选实施例中，细胞表面抗原，是从抗原的 CD 科中选择的。在一个更可取的优选实施例中，细胞表面抗原选自包含 CD3、CD4、CD8、和 CD45 的一组。

还是按照本发明的制作方面，在于提供一种另外的制作进行簇指定计数的光学测定盘方法。该制作光学测定盘的另外的方法，包括如下步骤：设置衬底、以活性层涂敷衬底、把捕获剂淀积在活性层上（形成捕获区）、培养衬底、旋转衬底、和用粘附单元把顶盖部分附着于活性层上。在本方法的一个特定的实施例中，培养步骤包括，在足够的温度上培养足够的一段时间，使捕获剂在活性层上固定不动。在本方法的另一个实施例中，旋转步骤包括，以足够的速度旋转一段足够的时间，以便把非固定不动的捕获剂移出捕获区。

按照本方法的另一个方面，捕获剂是从以下一组中选择的，该组包括：**lgG、生物素基的 lgG、抗 CD3 抗体、生物素基抗 CD3 抗体、抗 CD4 抗体、生物素基抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、生物素基抗 CD8 抗体、抗 CD45 抗体、和生物素基抗 CD45 抗体。**在该方面的一个实施例中，捕获剂是主捕获剂。在另外一个实施例中，捕获剂是副捕获剂。按照该另外一个实施例的一个方面，本方法还包括，在旋转步骤之后，把主捕获剂淀积在副捕获剂上的步骤。在该另外一个实施例的另一个方面中，本方法还包括，在把主捕获剂淀积在副捕获剂上面之后，培养并旋转该衬底的步骤。

按照本发明的又一个主要方面，是提供一种实施簇指定计数的光学测定盘。光学测定盘包括：**衬底、放在衬底上的活性层、通过粘附单元整体地附着在活性层上的顶盖部分（有一部分或多部分被除去，以形成一个或多个定义在其间的空腔）、和在活性层上一种或多种固定不动的捕获剂。捕获剂在一个或多个空腔内定义分立的捕获区。**在该测定盘的一个实施例中，捕获剂借助交联系统而固定不动。在该测定盘的另外的一个实施例中，捕获剂借助活性层而固定不动。

在该光学测定盘的一个特定实施例中，捕获剂是对细胞表面抗原**有选择性的亲和力的抗体。**在一个优选实施例中，捕获剂选自包含对**CD3、CD4、CD8、和 CD45 的抗体的一组。**在该光学测定盘的另一个实施例中，捕获剂是对主抗体有选择性的亲和力的抗体，该主抗体对细胞表面抗原**有选择性的亲和力。**类似地，在光学测定盘该方面的一个优选的实施例中，主抗体选自包含对**CD3、CD4、CD8、和 CD45 的抗体的一组。**在光学测定盘本实施例中，主捕获剂是在鼠中产生的抗人抗体，而副捕获剂是在羊中产生的抗鼠抗体。

涉及本发明的技术方面，也在下述专利申请中说明：**U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,489，标题是：“Optical Analysis Discs Including Microfluidic Circuits for Performing Cell Counts”，2001 年 7 月 24 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,825，标题是：“Methods for Reducing Non-Specific Binding**

of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Charged Matter Including Heparin, Plasma, or Poly-Lysine”, 2001 年 7 月 25 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,762, 标题是: “Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Blocking Agents”, 2001 年 7 月 25 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/307,764, 标题是: “Methods for Reducing Bubbles in Fluidic Chambers Using Polyvinyl Alcohol and Related Techniques for Achieving Same in Optical Bio-Discs”, 2001 年 7 月 25 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/308,214, 标题是: “Sealing Methods for Containment of Hazardous Biological Materials within Optical Analysis Disc Assemblies”, 2001 年 7 月 27 日申请; 和 U.S. Provisional Application Serial No. 60/308,197, 标题是: “Methods for Calculating Qualitative and Quantitative Ratios of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Optical Bio-Disc Platform”, 2001 年 7 月 27 日申请, 本文引用所有这些专利申请全文。

本发明的方法和设备, 与现有技术相比, 有一个或多个优点, 本发明包括, 但不限于: 简单和快速的盘上处理、无需有经验的技术人员操作测试、小的样品体积、使用廉价的材料、和使用已知光盘格式及驱动器制作技术。这些和其他的特征及优点, 在参照附图与技术例子, 阅读下面的详细说明后, 将有更好的了解。

附图说明

本发明还有的目的, 连同提供的另外的特征及由此产生的利益, 将从下面本发明优选实施例的说明中变得更明显, 附图表明这些优选的实施例, 图中自始至终以相同的参考数字指示相同的部件, 其中:

图 1 是按照本发明的生物盘系统的图形表示;

图 2 是本发明使用的反射生物盘的分解透视图;

图 3 是图 2 所示盘的顶视图;

图 4 用剖开部分, 表明图 2 所示盘不同层的透视图;

图 5 是本发明使用的透射生物盘的分解透视图；

图 6 用剖开部分，画出图 5 所示盘的透视图，说明盘的半反射层的功能方面；

图 7 是曲线，表示薄金膜的厚度与透射率之间的关系；

图 8 是图 5 所示盘的顶视图；

图 9 用剖开部分，画出图 5 所示盘的透视图，表明图 6 所示的包括半反射层的不同层；

图 10 是图 1 所示系统更详细的透视图和方框图；

图 11 是局部截面图，取自垂直于图 2、3、和 4 所示反射式光生物盘的半径，表明在其中形成的流动通道；

图 12 是局部截面图，取自垂直于图 5、8、和 9 所示透射式光生物盘的半径，表明在其中形成的流动通道和顶检测器；

图 13 是图 2、3、和 4 所示反射式光生物盘局部纵向截面图，表明在其中形成的摆动的槽；

图 14 是图 5、8、和 9 所示透射式光生物盘局部纵向截面图，表明在其中形成的摆动的槽和顶检测器；

图 15 是类似于图 11 的图，表明反射盘的整个厚度和它初始的折射性质；

图 16 是类似于图 12 的图，表明透射盘的整个厚度和它初始的折射性质；

图 17A 是用图形表示的流程图，表明用本发明的方法分析血样；

图 17B 是用图形表示的细节，表明使用图 17A 的盘，把抗体附着于白细胞上；

图 18A 是抗生蛋白链菌素的图形表示；

图 18B 是生物素的图形表示；

图 18C 是由抗生蛋白链菌素与生物素构成的交联系统的图形表示；

图 18D 是副抗体的图形表示；

图 18E 是生物素基的副抗体的图形表示；

图 18F 是主抗体的图形表示;

图 18G 是生物素基的主抗体的图形表示;

图 18H 是 $CD4^+$ 细胞的图形表示, 表明四个 $CD4$ 表面抗原;

图 18I 是 $CD8^+$ 细胞的图形表示, 表明四个 $CD8$ 表面抗原;

图 18J 是与醛活化右旋糖酐结合的副抗体的图形表示;

图 18K 是图 18J 的截面图的图形表示;

图 19A 和 19B 是细胞被主抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第一实施方案, 该主抗体借助交联系统与衬底结合;

图 19C 和 19D 是细胞被主抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第一实施方案, 该主抗体直接与衬底结合;

图 20A - 20I 是反射生物盘的截面侧视图, 表明用按照本发明的交联系统, 把捕获剂淀积在捕获区方法的第一实施方案的实施例;

图 21 是不用交联系统的图 20A - 20I 所示反射盘另外的实施例;

图 22 作为透射盘格式中实施的方案, 画出图 20A - 20I 中利用的捕获化学反应;

图 23A 和 23B 是细胞被主抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第二实施方案, 该主抗体与副抗体结合, 副抗体则借助交联系统与衬底结合;

图 23C 和 23D 是细胞被主抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第二实施方案, 该主抗体与副抗体结合, 副抗体则直接与衬底结合;

图 24A - 24L 是反射生物盘的截面侧视图, 表明用按照本发明的主和副捕获抗体及交联系统, 把捕获剂淀积在捕获区方法的第二实施方案的实施例;

图 25 是不用交联系统的图 24A - 24L 所示反射盘另外的实施例;

图 26 作为透射盘格式中实施的方案, 画出图 24A - 24L 中利用的捕获化学反应;

图 27A 和 27B 是细胞被主抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第二实施方案, 该主抗体与副抗体结合, 副抗体则通过 DCHO 链与衬底结合;

图 27C 和 27D 是细胞被主抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第二实施方案, 该主抗体通过 DCHO 链, 直接与衬底结合;

图 28A 是用图形表示的流程图, 表明抗体 DCHO 络合物的制备;

图 28B - 28J 是反射生物盘的截面侧视图, 表明用主和副抗体及 DCHO 链, 把捕获剂淀积在捕获区方法的第二实施方案的实施例;

图 29 是不用副抗体的图 28B - 28J 所示反射盘另外的实施例;

图 30 作为透射盘格式中实施的方案, 画出图 28B - 28J 中利用的捕获化学反应;

图 31A 是光生物盘的顶视图, 画出四条流体通路, 各有若干个用于特定细胞表面标记物的捕获区和负控制区;

图 31B 和 31C 是主抗体细胞络合物被副抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第三实施方案, 该副抗体借助交联系统与衬底结合;

图 31D 和 31E 是主抗体细胞络合物被副抗体捕获的图形表示, 按照本发明的第三实施方案, 该副抗体直接与衬底结合;

图 32A - 32I 是反射生物盘的截面侧视图, 表明用交联系统把捕获剂淀积在捕获区方法的第二实施方案的实施例, ;

图 33 是不用交联系统的图 32A - 32I 所示反射盘另外的实施例;

图 34 作为透射盘格式中实施的方案, 画出图 32A - 32I 中利用的捕获化学反应;

图 35A 是光生物盘的顶视图, 画出四条流体通路, 各有若干个用于不同细胞表面标记物的捕获区和负控制区;

图 35B、35C、和 35D 是反射式光生物盘的截面侧视图, 表明用交联系统分析血样方法的第一实施方案;

图 36 是不用交联系统的图 35B、35C、和 35D 所示反射盘另外的实施例;

图 37 作为透射盘格式中实施的方案, 画出图 35B、35C、和 35D 中利用的捕获化学反应;

图 38A、38B、和 38C 是反射式光生物盘的截面侧视图, 表明用主和副捕获抗体及交联系统, 分析血样方法的第二实施方案的实施例;

图 39 是不用交联系统的图 38A、38B、和 38C 所示反射盘另外的实施例；

图 40 作为透射盘格式中实施的方案，画出图 38A、38B、和 38C 中利用的捕获化学反应；

图 41A、41B、和 41C 是反射式光生物盘的截面侧视图，表明用主和副抗体及 DCHO 链，分析血样方法的第三实施方案的实施例；

图 42 是不用副抗体的图 41A、41B、和 41C 所示反射盘另外的实施例；

图 43 作为透射盘格式中实施的方案，画出图 41A、41B、和 41C 中利用的捕获化学反应；

图 44A 是制备主抗体细胞络合物的用图形表示的流程图；

图 44B、44C、和 44D 是反射式光生物盘的截面侧视图，表明用主和副捕获抗体及交联系统，分析血样方法的第四实施方案的实施例；

图 45 是不用交联系统的图 44B、44C、和 44D 所示反射盘另外的实施例；

图 46 作为透射盘格式中实施的方案，画出图 44B、44C、和 44D 中利用的捕获化学反应；

图 47 画出有空腔的光盘的示意图，表明按照本发明一个实施例的条码形分区技术；

图 48A 表明按照本发明一个实施例的条码形分区格式得到的测定结果；

图 48B 画出显微镜及盘对应的 CD4、CD8、和控制区域的像；

图 49 画出显微镜及盘对应的像的更大视图，表明本发明的方法和设备能获得的结果；

图 50 和 51 按照本发明的一个实施例，画出像识别的使用；

图 52 表明按照本发明一个实施例的条码形分区得到的期望的输出屏幕图；

图 53 按照本发明的一个实施例，画出从被捕获的细胞到可用的输出的方法；

图 54 是曲线,表示从抽样的模拟信号到对应的数字信号的变换,该数字信号作为一维阵列被存储起来;

图 55 是对标出部分以放大的详细视图表示的光盘透视图,表明被捕获的白细胞相对于生物盘轨道的位置,该被捕获的白细胞在与入射光束相互作用后,产生含有信号的光束;

图 56A 按照本发明,画出白细胞相对于生物盘轨道的位置的图形表示;

图 56B 是按照本发明,从图 56A 的白细胞得到的一系列特征波形轨迹;

图 57 是表明图 57A、57B、57C、和 57D 之间的关系的图解表示;

图 57A、57B、57C、和 57D,当把它们放在一起时,表示从图 56B 的特征波形轨迹到数字信号的变换,这些数字信号作为一维阵列存储,并组合成二维阵列作为数据输出;

图 58 按照本发明相关的处理方法和计算的算法,画出数据评价主要步骤的逻辑流程图;

图 59 是分析空腔的图形表示,该分析空腔有不同的分析白细胞的捕获区;

图 60A 和 60B 是分析空腔的图形表示,该分析空腔有不同的分析红和白细胞的捕获区;

图 61 是使用本发明的光生物盘,在 CD 标记物测定中,作为细胞浓度函数的被捕获的 CD4+细胞数曲线;

图 62A 是使用本发明的光生物盘,从被分析的血样中,得到的 CD4/CD8 比值的数据散布曲线;和

图 62B 是使用 FACS 分析,从同一血样中,得到的 CD4/CD8 比值的数据散布曲线。

具体实施方式

本发明针对盘驱动器系统、光生物盘、细胞测定及细胞计数方法、像处理技术、和相关的软件。本发明这些方面的每一个,下面更详细地说明。

本文公开的本发明各方面涉及的盘驱动器系统、光生物盘、细胞测定及细胞计数方法、像处理技术、和相关的软件，也在下面的专利申请中给出：U.S. Provisional Application Serial No. 60/338,679，标题是：“Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping”，2001年11月13日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/332,001，标题是：“Capture Layer Assemblies and Optical Bio-Discs for Immunophenotyping”，2001年11月14日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/334,131，标题是：“Methods for Calculating Qualitative and Quantitative Ratios of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Optical Bio-Disc Platform”，2001年11月30日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/349,392，标题是：“RBC Sieving Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Whole Blood and Related Optical Bio-Disc”，2002年1月17日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/349,449，标题是：“RBC Lysis Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Whole Blood and Related Optical Bio-Disc”，2002年1月18日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/353,300，标题是：“Methods For Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same”，2002年1月31日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/355,644，标题是：“Cluster Designation Assays Performed on Optical Bio-Disc Including Equi-Radial Analysis Zones”，2002年2月5日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/358,479，标题是：“Cluster Designation Assays Performed on Optical Bio-Disc Including Equi-Radial Analysis Zones and Related Systems and Methods”，2002年2月19日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/363,949，标题是：“Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes

and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same”, 2002 年 3 月 12 日申请；和 U.S. Provisional Application Serial No. 60/404,921，标题是：“Methods For Differential Cell Counts Including Related Apparatus and Software For Performing Same”，2002 年 8 月 21 日申请，本文引用所有这些专利申请，供参考。

驱动器系统及有关的盘

图 1 按照本发明，画出光生物盘 110 的透视图，作为本文公开的进行细胞计数和分类细胞计数的实施方案。该光生物盘 110 是结合光盘驱动器 112 及显示监控器 114 一起画出的。有关该类盘驱动器和盘分析系统，在共同授予并共同待决的 U.S. Patent Application Serial No. 10/008,156 中公开，标题是“Disc Drive System and Methods for Use with Bio-discs”，2001 年 11 月 9 日申请，和 U.S. Patent Application Serial No. 10/043,688，标题是“Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging”，2002 年 1 月 10 日申请，本文引用该两个专利申请，供参考。

图 2 是光生物盘 110 实施例的主要结构单元的分解透视图。图 2 是反射式区的光生物盘 110（本文此后称“反射盘”）例子，它可以在本发明中使用。主要结构单元包括顶盖部分 116、粘附单元或通道层 118、和衬底 120。顶盖部分 116 包括一个或多个入口 122 和一个或多个出口 124。顶盖部分 116 可以由聚碳酸酯形成，并最好在从图 2 透视图看去的底部镀上反射表面 146（图 4）。在该优选的实施例中，反射层 142（图 4）表面包括触发标记或记号 126。触发记号 126 可以包括：在生物盘所有三层都透明的窗、不透明区域、或用信息编码的反射或半反射区域，该触发记号把数据发送至处理器 166，如图 10 所示，该触发记号接着与询问或入射光束 152 的操作功能相互作用，见图 6 和 10。

图 2 所示第二单元是粘附单元或通道层 118，在其中形成流体通路 128 或 U 形通道。流体通路 128 是通过冲压或切割该隔膜，去除塑料薄膜，形成如图所示形状。每一流体通路 128 包括流动通道 130 和

返回通道 132。图 2 所示的一些流体通路 128，包括混合空腔 134。图中画出两种不同类型的混合空腔 134。第一种是对称的混合空腔 136，它相对于流动通道 130 是对称地形成的。第二种是偏移的混合空腔 138。偏移的混合空腔 138 形成在流动通道的一侧，如图所示。

图 2 所示第三单元是衬底 120，它包括靶或捕获区 140。衬底 120 最好用聚碳酸酯制成，并在其上部淀积反射层 142，见图 4。靶区 140 是按指定形状或按另外需要的任何形状，除去反射层 142 形成的。或者，靶区 140 可以通过掩模技术形成，掩模技术是在镀上反射层 142 之前遮盖着靶区 140 区域。反射层 142 可以用铝或金等金属形成。

图 3 是图 2 所示在其顶盖部分 116 有反射层 142 的光生物盘 110 的顶视图，图上反射层 142 是当作透明画出的，以便露出置于盘内的流体通路 128、靶区 140、和触发记号 126。

图 4 按照本发明的一个实施例，画出反射区型光生物盘 110 的放大的透视图。该图包括被剖去的各层的一部分，以便画出每一主要层、衬底、镀层、或隔膜的部分截面图。图 4 画出的衬底 120 镀有反射层 142。活性层 144 加在反射层 142 上。在本优选实施例中，活性层 144 由聚苯乙烯形成。或者，也可以用聚碳酸酯、金、活化的玻璃、改性玻璃、或改性聚苯乙烯，例如聚苯乙烯共顺丁烯二酐（polystyrene-co-maleic anhydride）。此外，也可以用水凝胶。或者，如在本实施例所示，把塑料粘附单元 118 加在活性层 144 上面。塑料粘附单元 118 的暴露部分，表明切去的或被冲压去的 U 形，用于建立流体通路 128。在本生物盘反射区实施例中最后的主要结构层，是顶盖部分 116。顶盖部分 116 包括在其底部的反射表面 146。反射表面 146 可以由金属如铝或金形成。

现在参考图 5，图上按照本发明，画出透射式光生物盘 110 的主要结构单元。透射式光生物盘 110 的主要结构单元，同样包括顶盖部分 116、粘附或通道单元 118、和衬底 120 层。顶盖部分 116 包括一个或多个入口 122 和一个或多个出口 124。顶盖部分 116 可以由聚碳酸酯形层成。可选的触发记号 126 可以包括在薄的半反射层 143 表面之

上,最好如图 6 和 9 所示。触发记号 126 可以包括在生物盘所有三层都透明的窗、不透明区域、或用信息编码的反射或半反射区域,该触发记号把数据发送至处理器 166,如图 10 所示,该触发记号接着与询问或入射光束 152 的操作功能相互作用,见图 6 和 10。

图 5 所示第二单元是粘附单元或通道层 118,在其上形成流体通路 128 或 U 形通道。流体通路 128 是通过冲压或切割该隔膜,去除塑料薄膜,形成如图所示形状。每一流体通路 128 包括流动通道 130 和返回通道 132。图 5 所示的一些流体通路 128,包括混合空腔 134。图中画出两种不同类型的混合空腔 134。第一种是对称的混合空腔 136,它相对于流动通道 130 是对称地形成的。第二种是偏移的混合空腔 138。偏移的混合空腔 138 形成在流动通道的一侧,如图所示。

图 5 所示第三单元是衬底 120,它包括靶或捕获区 140。衬底 120 最好用聚碳酸酯制成,并在其上部淀积薄的半反射层 143,见图 6。示于图 5 和 6 与盘 110 的衬底 120 相关的半反射层 143,比图 2、3、和 4 所示反射盘 110 衬底 120 上的反射层 142 薄得多。薄得多的半反射层 143,能使询问光束 152 某一透射率透过图 6 和 12 所示的透射盘的结构层。该薄的半反射层 143 可以由如铝或金等金属形成。

图 6 是图 5 所示透射式实施例的衬底 120 和半反射层 143 放大的透视图。薄的半反射层 143 可以由如铝或金等金属形成。在该优选实施例中,图 5 和 6 所示透射盘的薄的半反射层 143 厚度可以在 $10 - 300 \text{ \AA}$ 范围,且不超过 $400 \text{ \AA}$ 。该较薄的半反射层 143,能使部分入射或询问光束 152 穿透并通过半反射层 143,被顶检测器 158 检测,见图 10 和 12,同时一些光沿入射路径反射或返回。如下面所指出,表 4 给出金膜对膜厚的反射和透射特性。金膜在厚度大于 $800 \text{ \AA}$ 时全反射。而光通过金膜透射的阈值密度约为 $400 \text{ \AA}$ 。

除了表 4 之外,图 7 根据金的厚度,给出薄半反射层 143 反射和透射性质的相反关系的曲线表示。图 7 所示曲线使用的反射和透射值是绝对值。

表 4

Au 膜的反射率和透射率 (绝对值)

厚度 (Angstrom)	厚度 (nm)	反射率	透射率
0	0	0.0505	0.9495
50	5	0.1683	0.7709
100	10	0.3981	0.5169
150	15	0.5873	0.3264
200	20	0.7142	0.2057
250	25	0.7959	0.1314
300	30	0.8488	0.0851
350	35	0.8836	0.0557
400	40	0.9067	0.0368
450	45	0.9222	0.0244
500	50	0.9328	0.0163
550	55	0.9399	0.0109
600	60	0.9448	0.0073
650	65	0.9482	0.0049
700	70	0.9505	0.0033
750	75	0.9520	0.0022
800	80	0.9531	0.0015

下面参考图 8, 图上画出图 5 和 6 所示透射式光生物盘 110 顶视图, 上有透明的顶盖部分 116, 以便露出盘内的流体通道、触发记号 126、和靶区 140。

图 9 按照本发明透射盘实施例, 画出光生物盘 110 放大的透视图。图上画出的盘 110 的各层被剖去一部分, 以便画出每一主要层、衬底、镀层、或隔膜的部分截面图。图 9 画出一种透射盘格式, 它有透明的顶盖部分 116、在衬底 120 上薄的半反射层 143、和触发记号 126。在本实施例中, 触发记号 126 包括位于顶盖上部的不透明材料。或者, 触发记号 126 可以由刻蚀在盘的薄反射层 143 上透明的、不反射的窗

形成,或任何吸收或不反射来自图 10 触发检测器 160 信号的标记形成。图 9 还画出靶区 140,它是按指定形状或按另外需要的任何形状作记号形成的。指示靶区 140 的记号,可以制作在衬底 120 的薄反射层 143 上或在衬底 120 的底部(在盘下面)。或者,靶区 140 可以通过掩模技术形成,该掩模遮盖除靶区 140 外的整个薄反射层 143。在本实施例中,靶区 140 可以通过丝网印刷,把油墨印在薄反射层 143 上。在图 5、8、和 9 所示透射盘格式中,靶区 140 也可以由盘上编码的地址信息定义。在本实施例中,靶区 140 不包括物理上可辨识的边界。

继续参考图 9,活性层 144 是作为加在薄半反射层 143 上画出的。在本优选实施例中,活性层 144 是 40 至 200 μm 厚的 2%聚苯乙烯层。或者,也可以用聚碳酸酯、金、活化的玻璃、改性玻璃、或改性聚苯乙烯,例如聚苯乙烯共顺丁烯二酐。此外,也可以用水凝胶。如在本实施例所示,塑料粘附单元 118 是加在活性层 144 上的。塑料粘附单元 118 的暴露部分,表明切去的或被冲压去的 U 形,以便建立流体通路 128。

在本生物盘 110 透射式实施例中,最后的主要结构层,是透明的、不反射的顶盖部分 116,它包括入口 122 和出口 124。

现在参考图 10,图上用透视的和方框的图表示:光学部件 148、产生入射或询问光束 152 的光源 150、返回光束 154、及透射光束 156。在图 4 所示反射生物盘的情形,返回光束 154 是从光生物盘 110 顶盖部分 116 的反射表面 146 反射的。在光生物盘 110 的本反射式实施例中,返回光束 154 被底检测器 157 对信号单元的存在进行检测和分析。另一方面,按照透射生物盘的格式,透射的光束 156 由顶检测器 158 检测,并同样对信号单元的存在进行分析。在透射式实施例中,可以用光电检测器作为顶检测器 158。

图 10 还画出硬件的触发机构,它包括盘上的触发器记号 126 和触发器检测器 160。硬件触发机构被用在反射生物盘(图 4)和透射生物盘(图 9)两种情形。触发机构只当询问光束 152 落在相应的靶区 140 上时,才让处理器 166 收集数据。此外,在透射生物盘系统中,

也可以用软件触发器。软件触发器使用底检测器来发出信号,只要询问光束 152 落在相应靶区 140 的边缘,就让处理器 166 收集数据。图 10 还画出驱动电动机 162,和控制光生物盘 110 旋转的控制器 164。图 10 也画出处理器 166 和分析器 168,用于在透射式光生物盘在别的情况下处理返回光束 154 及透射光束 156。

如图 11 所示,图上按照本发明,画出光生物盘 110 反射盘实施例的局部截面图。图 11 画出衬底 120 和反射层 142。如上所述,反射层 142 可以由诸如铝、金、或其他适当的反射材料制成。在本实施例中,衬底 120 的上表面是光滑的。图 11 还画出加在反射层 142 上的活性层 144。如图 11 所示,靶区 140 是在需要的位置上,通过移去反射层 142 某一面积或部分形成的,或者,通过在加上反射层 142 之前,遮蔽需要的面积而形成。图 11 还画出加在活性层 144 上的塑料粘附单元 118。图 11 也画出顶盖部分 116 和在其内的反射表面 146。因此,当把顶盖部分 116 加到有按需要形状切掉的塑料粘附单元 118 上时,流动通道 130 便据此形成。如图 11 的箭头所示,入射光束 152 的路径,开始时从盘 110 的下面引向衬底 120。然后,入射光束会聚在靠近反射层 142 的一点。由于会聚发生在缺少一部分反射层 142 的靶区 140,所以入射光束继续沿通过活性层 144 的路径传播,并进入流动通道 130。然后,入射光束继续向上传播,通过流动通道,最后落在反射表面 146。在该点,入射光束 152 沿入射路径折回去或反射回去,并据此形成返回光束 154。

图 12 按照本发明生物盘 110 透射式实施例,画出局部截面图。图 12 画出的透射盘格式,有透明的顶盖部分 116 和衬底 120 上的薄半反射层 143。图 12 也画出加在薄半反射层 143 上的活性层 144。在本优选实施例中,透射盘的薄半反射层 143 由 $10 - 300 \text{ \AA}$ 且不超过 $400 \text{ \AA}$ 厚的诸如铝或金等金属形成。该薄半反射层 143 能使来自图 10 光源 150 的部分入射或询问光束 152 穿透并向上通过盘,被顶检测器 158 检测,同时,一些光沿与入射路径相同但方向相反的路径,反射回去。在这种安排中,返回的或被反射的光束 154,是被半反射层 143 反射

的。因此，按此方式，返回光束 154 不进入流动通道 130。可以用反射光或返回光束 154，在预先记录的、形成在半反射层 143 之内或之上的信息轨道上，跟踪入射光束 152，在结合图 13 和 14 的说明中将进一步详细说明。在图 12 所示的盘实施例 110 中，物理上限定的靶区 140，可以存在也可以不存在。可以通过在衬底 120 的薄半反射层 143 上制作的引导记号，建立靶区 140。这些记号可以用丝网印刷或任何等价方法形成。在不用物理记号限定靶区（例如，当利用编码软件寻址时）的另外实施例中，可以采用实际的流动通道 130 作为被限定的靶区域，在该靶区域中检查要调查的特性。

图 13 按照本发明生物盘 110 的反射盘实施例，画出横跨轨道的截面图。该图是顺着盘的半径和流动通道的纵向切取的。图 13 包括衬底 120 和反射层 142。在本实施例中，衬底 120 包括一系列槽 170。槽 170 以螺旋形式从靠近盘的中心向外边缘伸延。提供槽 170 是为了使询问光束 152 可以沿盘上的螺旋形槽 170 跟踪。这种类型的槽 170 被称为“摆动槽”。以起伏的或波浪形侧壁的底部，形成槽 170，而升起的或升高的部分，则把相邻的呈螺旋形的槽 170 分开。在本实施例中，加在槽 170 上的反射层 142，如图所示，事实上是共形的。图 13 还画出加在反射层 142 上的活性层 144。如图 13 所示，靶区 140 是在需要的位置上，通过移去反射层 142 某一面积或部分形成的，或者，通过在加上反射层 142 之前，遮蔽需要的面积而形成。图 13 也画出，塑料粘附单元 118 是加在活性层 144 上的。图 13 同时画出顶盖部分 116 和在其内的反射表面 146。因此，当把顶盖部分 116 加到有按需要形状切掉的塑料粘附单元 118 上时，流动通道 130 便据此形成。

图 14 按照本发明的生物盘 110 的透射盘实施例，比如图 12，画出横跨轨道的截面图。该图是顺着盘的半径和流动通道的纵向切取的。图 14 画出衬底 120 和薄半反射层 143。薄半反射层 143 能使来自光源 150 的入射或询问光束 152 穿透，并通过盘被顶检测器 158 检测，同时一些光以返回光束 154 的形式被反射回去。薄半反射层 143 的厚度，由盘阅读机保持跟踪能力需要的反射光的最小光量确定。在本实

实施例中的衬底 120，类似于图 13 所示，包括一系列槽 170。本实施例的槽 170 最好也以螺旋形式从靠近盘的中心向外边缘伸延。提供槽 170 是为了使询问光束 152 可以沿螺旋线跟踪。图 14 还画出加在薄半反射层 143 上的活性层 144。图 14 还画出，塑料粘附单元 118 是加在活性层 144 上的。图 14 也画出没有反射表面 146 的顶盖部分 116。因此，当把顶盖加到有按需要形状切掉的塑料粘附单元 118 上时，流动通道 130 便据此形成，且能使部分入射光束 152 基本上不被反射地通过。

图 15 与图 11 类似，但画出反射盘的整个厚度及其初始的折射性质。图 16 与图 12 类似，但画出透射盘的整个厚度及其初始的折射性质。图 15 和 16 中没有槽 170，因为截面是沿槽 170 切割的。图 15 和 16 表明存在窄的流动通道 130，在这些实施例中，流动通道 130 都与槽 170 垂直。图 13、14、15、和 16 画出相应的反射式和透射盘的整个厚度。在这些图中，画出的入射光束开始与衬底 120 相互作用，衬底 120 的折射性质如图所示，使入射光束改变路径，把光束 152 会聚在反射层 142 或薄半反射层 143 上。

细胞测定

利用本发明的方法，可以进行通用的同种固态细胞捕获测定，用于快速确定血样中 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T 淋巴细胞种群的绝对数量，及 $CD4^+/CD8^+$ 淋巴细胞的比值。藏在生物盘中小的流动通道内进行的测试，确定被特定抗体捕获的 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD2^+$ 、 $CD3^+$ 、 $CD19^+$ 、和 $CD45^+$ 细胞的数量，这些特定抗体在从全血分离的 7 - 15 μl 单核细胞 (MNC) 的捕获区上。该测试是根据盘特定位置上的定位细胞捕获原理。根据单克隆或多克隆抗体对特定血细胞表面抗原的捕获化学反应，通过这种捕获化学反应的定位应用，在盘的若干个位置上建立特定的细胞捕获区。在以 MNC 血 (10,000 - 30,000 细胞/ μl) 注入各 25 - 100 μl 的空腔后，表达 CD4、CD8、CD2、CD3、CD19、和 CD45 抗原的细胞，被盘内的捕获区捕获。同样，藏在捕获区内的还有确定的负控制区域。

图 17A 是用图形表示的血样分析的流程图。在步骤 1，收集血液

(4-8 ml), 直接放进 4 或 8 ml 的 Becton Dickinson CPT Vacutainer™ 及抗凝血剂内, 抗凝血剂如 EDTA、柠檬酸葡萄糖 (acid citrate dextrose)、或肝素。在本发明的另一个实施例的等价步骤中, 在抗凝血剂内的 3 ml 血液, 叠放在含有分离梯度 176 如 Histopaque® 1077 的管 172 内。不论哪种情况, 血样 174 最好在收集后两小时内使用。叠放着血样 174 的包含分离梯度 176 的管 172, 在室温下, 放在有水平电动机和摆起桶 (swing out bucket) 的生物公害离心机中, 以 400 $\times$ g 离心 25 分钟。离心后, 除去血浆层 178 (步骤 2), 留下约 2 mm 血浆在单核细胞 (MNC) 部分 180 之上。收集 MNC 层 180 并用磷酸盐缓冲液盐水 (PBS) 清洗。在室温下以 300 RCF (每分钟 1200 转) 离心 10 分钟, 使细胞成为丸状, 并除去任何残留的血小板。除去上层清液, 并把 MNC 丸 180 在 PBS 中再混悬, 轻拍管子。最后的丸 180 又再混悬 (步骤 3), 直至细胞计数达 10,000 - 30,000 细胞/ μ l, 取决于生物盘 110 流动通道 130 的高度。

生物盘 110 的流动通道 130 被注入 7 μ l 的 MNC 混悬液, 然后以粘附片 (tab) 或其他适当的密封单元, 密封入口 122 和出口 124 (图 3 和 8) (步骤 4)。生物盘 110 在室温下培养 15 分钟, 然后用光驱动器 112 的 780 nm 激光扫描, 把捕获场成像 (步骤 5)。应当指出, 如果用透射生物盘 110, 那么光驱动器 112 可选地包括使捕获场成像的顶检测器 158 (图 10)。最好在盘上把软件编码, 以便指令驱动器自动执行如下任务: (a) 以一个档或多个档使盘离心旋转, 除去过量的未结合细胞; (b) 把特定的捕获窗在显示监控器 114 上成像; 和 (c) 处理数据。处理数据包括, 但不限于, 对每一捕获区专门捕获的细胞计数, 并导出 CD4⁺/CD8⁺ 的比值或任何要确定的已编程的比值。其他需要的比值也很容易由本发明另外的实施例给出。

图 17A 还进一步表明, 本发明针对一种用光盘和盘驱动器系统, 进行簇指定计数的方法。本方法包括如下步骤: 向含有分离梯度的第一管提供血样; 用足以把血样分离成层的速度和时间旋转第一管; 再混悬包含 T 细胞的 MNC 层, 形成 MNC 混悬液; 在包括至少一个捕

获区的盘表面提供 MNC 混悬液样品，该至少一个捕获区包含至少一种捕获剂；把盘装入光阅读机；旋转盘；把入射电磁辐射束引导至捕获区；检测与盘在捕获区相互作用之后形成的电磁辐射束；把检测的电磁辐射束转换为输出信号；和分析输出信号，抽取与捕获区捕获的细胞数相关的信息。在本方法的一个实施例中，光盘的结构具有反射层，以便反射引导到捕获区又不落在细胞上的光。在本方法的另一个实施例中，光盘的结构是使引导到捕获区又不落在细胞上的光，透过光盘。

在分析/处理步骤中，软件读出每一捕获区上的像，并当软件遇到细胞的像时，对细胞的像作记号。例如，随着被捕获的 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ 细胞的计数，软件计算 $CD4^+/CD8^+$ 细胞的比值，并显示每微升全血在 $CD4^+$ 、 $CD8^+$ 、 $CD3^+$ 、和 $CD45^+$ 捕获区中细胞的绝对数量，与 $CD4^+/CD8^+$ 比值。整个过程从盘插入光学驱动器到获得数量和比值，约需 12 分钟。其他关于样品中特定细胞种群的定量测定方面，公开在下面共同授予并共同待决的专利申请中：U.S. Provisional Application Serial No. 60/382,327，标题是：“Methods For Calculating Specific Populations Of Cells Captured In An Optical Bio-Disc”，2002 年 5 月 22 日申请。本文引用该申请全文，供参考。

在一个实施例中，盘是向前的 Wobble Set FDL21:13707 或 FDL21:1270 CD-R 盘，镀有 300 nm 的金作为编码信息层。在反射盘上，用熟知的光刻技术，从反射层刻蚀出大小为 2×1 mm 的椭圆形观察窗。在一些透射盘的设计中，不刻蚀分离的观察窗，而整个盘都可供使用。在一个特定的实施例中，粘附层是 Fraylock 粘附层 DBL 201 Rev C 3M94661。顶盖是透明盘，有 48 个直径 0.040 英寸的样品入口，等距地分布在半径 26 mm 上。用软件以 $4\times$ 的速度对数据盘进行扫描和读出，而用 $CD4^+/CD8^+$ 计数软件的抽样速率是 2.67 MHz。

现在参考图 17B，在本发明的一个实施例中，厚的聚苯乙烯层 118 形成在衬底 120 上，并用（可选地）抗生蛋白链菌素 182 形成层。细胞捕获抗体通过生物素附着在抗生蛋白链菌素 182 上。这些抗体可以

包括涂敷在抗生蛋白链菌素上、附着在活化右旋糖酐醛上的生物素基抗体，以便为捕获抗体建立足够数量的结合结点。这样可以建立与白细胞（WBC）专门形成牢固的键的、强的捕获化学反应。

图 18A、18B、和 18C 是本发明一个实施例使用的交联系统的图形表示。应当指出，交联系统涉及使大分子的一部分或更多部分彼此交联的一种或多种交联剂，或结合物。交联可以是共价的或非共价的两个大分子部分间的相互作用，通常在两个大分子自由基组合时形成。为获得交联的化学改性或结合处理，包括使一个功能团与另一个功能团的发生反应，导致键的形成。具有反应或有选择反应功能团的生物结合试剂的建立，构成简单的和可重复的交联或靶分子标签的基础（“*Bioconjugate Techniques*”，Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA, (1996)）。

交联剂包括，但不限于，同型双功能联结子（homobifunctional linker）、异型双功能联结子（heterobifunctional linker）、和零长交叉联结子（zero-length cross linker）。同型双功能联结子如戊二醛，有两个同功能的反应结点。这些试剂通过两个分子相同的公共团的共价反应，把一个蛋白与另一个蛋白联结起来。异型双功能联结试剂包含两种不同的反应团，能与蛋白及其他大分子上两个不同功能的靶偶联。例如，交叉联结子的一部分可以包含一胺反应团，而另一部分可以包含一巯基反应团。结果产生向着已选择的靶分子部分引导交联反应的能力，从而对联结过程获得更好的控制。零长交叉联结子通过形成不包含附加原子的键，作为两个分子联结的媒介。从而一个分子的一个原子，共价地附着于第二个分子的一个原子上，中间不插入联结子或间隔段。本领域一般人员可以参考“*Bioconjugate Techniques*”，Greg T. Hermanson, Academic Press, San Diego, CA, (1996)，该书有交联剂的详细说明。

本发明中，交联剂与生物盘表面结合，使捕获剂在靶区内固定不动。一种可取的交联系统是包含生物素抗生蛋白链菌素的异型双功能团，即与偶联卵白素衬底结合的生物素基捕获剂。图 18A 是抗生蛋白

链菌素 182 的图形表示。不加限制地说, 抗生蛋白链菌素包括卵白素、抗生蛋白链菌素、及其改性物。如图所示, 蛋白包括四个子单元, 每一个包含一个生物素的结合结点 (Hermanson)。抗生蛋白链菌素 182 能够通过各种化学反应与塑料, 如聚苯乙烯偶联。理想的情况下, 抗生蛋白链菌素 182 附着在生物盘的活性层 144 (图 4 和 9), 与生物素基的敏感单元 (如抗体) 基本上不可逆地结合。

图 18B 是生物素 184 的图形表示。生物素 (或维他命 H) 是自然出现的生长因子, 少量地存在于每一个细胞中。生物素与蛋白卵白素和抗生蛋白链菌素的相互作用, 属于已知的最强非共价键亲和力之一。生物素分子 184 可以通过它的戊酸侧链或其他有机成分衍生物 (orderivitized with other organic components), 建立间隔段臂 (spacer arms) 和各种反应团, 直接附着在蛋白上。通过适当选择生物素衍生物, 胺、羧酸盐、巯基、和碳水化合物团可以专门作为生物素基的靶子 (Hermanson)。图 18C 是包含与抗生蛋白链菌素 182 相互作用的生物素 184 交联系统的图形表示。

本发明实施例的实施方案, 是利用捕获剂进行本文说明的测定。应当指出, 捕获剂是指用于检测分析物的任何大分子。本发明的捕获剂包括的大分子, 对要研究的分析物有优先选择性, 或有选择性的结合亲和力。捕获剂包括, 但不限于: 合成的或用生物方法产生的核酸, 以及合成的或用生物方法产生的蛋白。本发明可以采用的捕获剂例子包括, 但不限于: 脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA)、寡核苷酸、聚合酶链式反应产物、或这些核苷酸的嵌合体、抗体 (单克隆或多克隆)、细胞膜受体、和与特定抗原决定簇 (如在病毒、细胞或其他材料上) 反应的抗血清、药物、肽、辅助因子、凝集素、C 型多糖、细胞、细胞膜、和细胞器。本发明的捕获剂最好是抗体。

抗体包括, 但不限于: 多克隆、单克隆、和用重组体建立的抗体。本发明的抗体可以体内也可以体外产生。抗体的产生方法, 本领域熟练人员是熟知的。例如可见 Antibody Production, Peter Delves (Ed.), John Wiley & Son Ltd, ISBN: 0471970107 (1997), 本文引用该书全

文,供参考。另外,抗体可以从商业资源获得,如: **Research Diagnostics Inc., Pleasant Hill Road, Flanders, NJ 07836**。本发明的抗体不限于任何一种特定物种;例如,人类的、鼠的、大鼠的、和羊的抗体,全在本发明考虑之列。本发明的主抗体最好是在鼠中产生的抗人抗体,而本发明的副抗体是在羊中产生的抗鼠抗体。

“抗体”一词也包括任何类或亚类抗体,因为任何或所有抗体类型,都可用于与细胞表面抗原结合。抗体在医药诊断领域中的使用,本领域熟练人员是熟知的。例如见 **Diagnostic and Therapeutic Antibodies (Methods in Molecular Medicine)**, **Andrew J. T. George and Catherine E. Urch (Eds.)**, **Humana Press**; **ISBN: 0896037983 (2000)** 及 **Antibodies in Diagnosis and Therapy: Technologies, Mechanisms and Clinical Data (Studies in Chemistry Series)**, **Siegfried Matzku and Rolf A. Stahel(Eds.)**, **Harwood Academic Pub.**; **ISBN: 9057023105 (1999)**, 本文引用以上两书全文,供参考。

至少在本发明的一些实施例中,用多种捕获剂检测要研究的分析物。图 18D 是本发明方法中使用的 IgG 类抗体的图形表示,它们被用作副捕获剂 186。应当指出,本发明的副捕获剂包括,但不限于:对另一种捕获剂有亲和力的剂,而另一种捕获剂对要研究的分析物有亲和力。图 18E 画出与生物素分子 184 结合的副捕获剂 IgG 186,该种生物素分子 184 本文此后称为生物素基 IgG。

图 18F 是主捕获剂 188 的图形表示。应当指出,本发明的主捕获剂 188 对要研究的分析物有选择性的亲和力。主捕获剂最好是对淋巴细胞有亲和力的抗体。更具体说,这些抗体能被引向淋巴细胞(CD2、CD19)、单核细胞(CD14)、嗜酸性细胞(CD15)、及其他要研究的细胞表面标记物。图 18G 画出与生物素分子 184 结合的主捕获剂 188。除去 CD4 和 CD8,存在许多抗其他细胞表面抗原(如,CD3、CD16、CD19、CD45、CD55、)的抗体,这些抗体都可以用来识别淋巴细胞的亚型。

图 18H 是 CD4⁺T 细胞 190 的图形表示。CD4⁺T 细胞与特定的抗

原结合，该特定抗原由诸如吞噬细胞的巨噬细胞和树突状细胞等抗原递呈细胞（APC）表达， $CD4^+$ T 细胞还释放淋巴因子，淋巴因子把其他免疫系统细胞吸引至该区域。结果是炎症，同时，细胞和分子蓄积起来，试图把抗原物质隔开并破坏抗原物质。应当指出， $CD4^+$ T 细胞在整个细胞表面有许多抗原 192。但是，为图示目的，图 18H 只画出 $CD4^+$ T 细胞有四个抗原 192。

图 18I 是 $CD8^+$ T 细胞 194 的图形表示。这些 T 细胞分泌分子，破坏已经与 T 细胞结合的细胞。这对与病毒感染的斗争是重要的，因为在被感染的细胞释放新的、能感染其他细胞的病毒粒子前， $CD8^+$ T 细胞便破坏这些被感染的细胞。应当指出， $CD8^+$ T 细胞在整个细胞表面有许多抗原 196。但是，为图示目的，图 18I 只画出 $CD8^+$ T 细胞有四个抗原 196。

图 18J 画出与醛活化右旋糖酐（DCHO）198 的 3 维矩阵结合的副抗体 186，从而形成 DCHO 抗体络合物 199。右旋糖酐主要是直线的 C 型多糖，包括由糖苷键联结在一起的重复的 D 葡萄糖单元。广泛地用作交联剂的右旋糖酐，性质上是多价的，能使分子沿聚合物链附着在许多结点上（Hermanson）。只是为了图示的目的，图上附着在右旋糖酐 198 的抗体 186 被画成如图 18K 所示。

本发明有关细胞测定的各方面，也公开在下述专利申请中：U.S. Provisional Application Serial No. 60/308,176，标题是：“Quantitative and Qualitative Methods for Characterizing Cancerous Blood Cells Including Leukemic Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform”，2001 年 7 月 27 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/312,248，标题是：“Methods for Quantitative and Qualitative Characterization of Cancerous Blood Cells Including Lymphoma Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform”，2001 年 8 月 15 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/313,514，标题是：“Methods for Specific Cell Capture by Off-Site Incubation of Primary Antibodies with Sample and Subsequent Capture by Surface-Bound

Secondary Antibodies and Optical Bio-Disc Including Same”，2001 年 8 月 20 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/313,715，标题是：“RBC Lysis Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Whole Blood and Related Optical Bio-Disc”，2001 年 8 月 20 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/313,536，标题是：“RBC Sieving Protocol Evaluations of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic T-Lymphocytes Using Whole Blood and Related Optical Bio-Disc”，2001 年 8 月 20 日申请；和 U.S. Provisional Application Serial No. 60/315,937，标题是：“Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping”，2001 年 8 月 30 日申请，本文引用所有这些专利申请，供参考。

实施方案 I

图 19A - 19D 是本发明第一实施方案的分析物捕获的图形表示。图 19A 和 19B 画出 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 被生物素基主抗体捕获（图 18G）的图形表示。借助交联剂抗生蛋白链菌素 182，抗体 188 在生物盘 110（图 4 和 9）的活性层 144 上是固定不动的。图 19C 和 19D 画出本发明同一实施方案的另一个没有交联系统的实施例。在该实施例中，主抗体 188 直接在生物盘 110 的活性层 144 上，是固定不动的。

图 20A - 20I 是截面图，画出本发明第一实施方案一个实施例的结构。第一实施例包括反射盘结构，它利用交联系统使捕获剂在生物盘流动通道内固定不动。现在参考图 20A，图上画出光生物盘 110 对光透明的衬底 120、反射层 142、和活性层 144。反射层 142 的一部分被除去（或在淀积时建立的开孔），产生观察窗 200，光透过观察窗，被引导至抗体被固定的捕获区 140 位置。图 20A 画出 5 个这样的捕获区 140，第一个以捕获区 141 表示。活性层 144 最好是聚苯乙烯，它可以用旋转涂布，也可以用本领域熟知的其他方法淀积在反射层 142 上，形成光滑的表面，厚度约 40 至 300 微米。然后在每一捕获区 140

和 141 上淀积抗生蛋白链菌素 182, 并把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟(图 20B)。清洗盘 110, 除去未结合的抗生蛋白链菌素 182, 然后用旋转干燥, 完全除去盘 110 表面的水分(图 20C)。在第一捕获区 141 上淀积参考标记或校准点 202, 又把生物素基主抗体 188 淀积在每一相继的捕获区 140(图 20D 和 20E)上。然后, 把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟。用 PBS 清洗, 除去未结合的抗体 188, 之后把盘 110 旋转干燥, 除去表面的水分(图 20F)。粘附单元 118 附着于活性层 144(图 20G)上。顶盖部分 116(图 2)可用聚碳酸酯构成, 且最好在底部镀上反射表面 146, 尽量如图 4 所示。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上, 据此在盘内形成流动通道 130(图 20G)。把阻断剂 204, 如 StabilGuard®, 注入每一流动通道 130, 以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点(图 20H)。把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养预定的时间, 最好是 30 分钟, 然后经抽真空, 完全清除任何残留的溶液(图 20I)。

本发明第一实施方案第二实施例的结构, 是不用交联系统而使捕获剂在盘 110 的流动通道 130 中固定不动的反射盘 110。在本实施例中, 在第一窗 141 上淀积参考标记或校准点 202, 又把非生物素基的主抗体 188(图 18F)直接淀积在活性层 144(图 20A)的每一相继捕获区 140 上。然后, 把盘 110 在室温下放进湿的箱中最好培养 30 分钟(图 20E)。用 PBS 清洗, 除去未结合的抗体 188, 之后把盘 110 旋转干燥, 除去表面的水分(图 20F)。粘附单元 118 附着于活性层 144 上。顶盖部分 116(图 2)可用聚碳酸酯构成, 且最好在底部镀上反射表面 146, 尽量如图 4 所示。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上, 据此在盘内形成流动通道 130(图 20G)。把阻断剂 204, 如 StabilGuard®, 注入每一流动通道 130, 以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点(图 20H)。把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟, 然后经抽真空, 完全清除任何残留的溶液(图 20I)。图 21 画出不用交联系统完成的反射生物盘 110 的截面

图。

本发明第一实施方案第三实施例的结构，是利用交联系统使捕获剂在盘 110 的流动通道 130 中固定不动的透射盘 110。在本实施例中，衬底 120、没有观察窗 200（图 20A）的半反射层 143，和活性层 144 如图 5 所示。抗生蛋白链菌素 182、生物素基的主抗体 188、参考点 202、和阻断剂 204 的淀积如上所述，并示于图 20B-20H。相应的粘附单元 118 附着于活性层 144 上。光学上透明的顶盖部分 116（图 5）可用聚碳酸酯构成。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118，由此在盘内形成流动通道 130（图 20G）。图 22 画出利用交联系统完成的透射生物盘 110 的截面图。应当指出，第一实施方案的第四实施例，可以由本领域熟练人员构建。第四实施例包括的结构，是不用交联系统而使捕获剂在盘 110 的流动通道 130 中固定不动的透射盘 110（图 21 和 22）。

实施方案 II

图 23A-23D 是本发明捕获分析物第二实施方案的图形表示。图 23A 和 23B 画出 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 被主抗体 188 捕获（图 18F）。主抗体 188 与生物素基副抗体 186 结合（图 18E），副抗体 186 借助交联剂抗生蛋白链菌素 182，在生物盘 110 的活性层 144 上是固定不动的。图 23C 和 23D 画出本发明同一实施方案的另一个没有交联系统的实施例。在本实施例中，副抗体 186 直接置于生物盘 110 的活性层 144 上。

图 24A-24L 是本发明第二实施方案一个实施例的结构截面图。第一实施例包括反射盘结构，它利用交联系统使捕获剂在生物盘 110 流动通道 130 内固定不动。现在参考图 24A，图上画出光生物盘 110 的对光透明的衬底 120、反射层 142、和活性层 144。反射层 142 的一部分被除去（或在淀积时建立的开孔），产生观察窗 200，光透过观察窗，被引导至抗体被固定的捕获区 140 位置。图 24A 画出 5 个这样的捕获区 140，第一个指定为捕获区 141。活性层 144 最好是聚苯乙烯，它可以用旋转涂布在反射层 142 上，形成光滑的表面，厚度约 40 至

300 微米。然后在每一捕获区 140 和 141 上淀积抗生蛋白链菌素 182，并把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养约 30 分钟（图 24B）。清洗盘 110，以除去未结合的抗生蛋白链菌素 182，然后用旋转干燥，完全除去盘 110 表面的水分（图 24C）。在第一捕获区 141 上淀积参考标记或校准点 202，又把生物素基副抗体 186 淀积在每一相继的捕获区 140（图 24D 和 24E）。然后，把盘 110 在室温下放进湿的箱中最好培养 30 分钟（图 24E）。用 PBS 清洗，除去未结合的副抗体 186，之后把盘 110 旋转干燥，除去表面的水分（图 24F）。然后，把主抗体（图 18F）淀积在每一捕获区 140 上（图 24G）。然后，把盘 110 在室温下放进湿的箱中最好培养约 30 分钟（图 24H）。用 PBS 清洗，除去未结合的主抗体 188，之后把盘 110 旋转干燥，除去表面的水分（图 24I）。相应的粘附单元 118 附着于活性层 144。顶盖部分 116（图 2）可以类似地用聚碳酸酯形成，且最好在底部镀上反射表面 146，尽量如图 4 所示。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上，由此在盘内形成流动通道 130（图 24J）。把阻断剂 204，如 StabilGuard®，注入每一流动通道 130，以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点（图 24K）。把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟，然后经抽真空，完全清除任何残留的溶液（图 20L）。

本发明第二实施方案第二实施例的结构，是不用交联系统而使捕获剂在盘 110 的流动通道 130 中固定不动的反射盘 110。在本实施例中，在第一窗 141 上淀积参考标记或校准点 202，又把非生物素基的副抗体 186（图 18D）直接淀积在活性层 144（图 24A）的每一相继捕获区 140 上。然后，把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟（图 24E）。用 PBS 清洗，除去未结合的副抗体 186，之后把盘 110 旋转干燥，除去表面的水分（图 24F）。然后，把主抗体 188（图 18F）淀积在每一捕获区 140 上（图 24G）。然后，把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟（图 24H）。用 PBS 清洗，除去未结合的主抗体 188，并把盘 110 旋转干燥，除去表面的水分（图 24I）。粘附单元 118 附着于活性层 144 上。如前面的实施例，本实施例的顶盖部分 116 可

用聚碳酸酯构成,且最好在底部镀上反射表面 146,尽量如图 4 所示。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上,由此在盘内形成流动通道 130 (图 24J)。把阻断剂 204,如 StabilGuard®,注入每一流动通道 130,以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点(图 24K)。在本实施例中,盘 110 在室温下放进湿的箱中培养最好 30 分钟,然后经抽真空,完全清除任何残留的溶液(图 24L)。图 25 画出不用交联系统完成的反射生物盘 110 的截面图。

本发明第二实施方案第三实施例的结构,是利用交联系统使捕获剂在盘 110 的流动通道 130 中固定不动的透射盘 110。在本实施例中,衬底 120、没有观察窗 200 (图 24A) 的半反射层 143,和活性层 144 如图 5 所示。抗生蛋白链菌素 182、生物素基的副抗体 186、主抗体 188、参考点 202、和阻断剂 204 的淀积如上所述,并示于图 24B-24K。粘附单元 118 以类似方式附着于活性层 144 上。光学上透明的顶盖部分 116 (图 5) 可用聚碳酸酯构成。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上,由此在盘内形成流动通道 130 (图 24J)。图 26 画出利用交联系统完成的透射生物盘 110 的截面图。应当指出,该第二实施方案的第四实施例,可以由本领域熟练人员构建。第四实施例包括的结构,是不用交联系统而使捕获剂在盘 110 的流动通道中固定不动的透射盘 110 (图 21 和 22)。

实施方案 III

图 27A-D 是按照本发明第三实施方案的分析物捕获的图形表示。图 27A 和 27B 画出 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 被主抗体 188 (图 18F) 捕获。主抗体 188 与副抗体 186 (图 18D) 结合,副抗体则与 DCHO 链结合。DCHO 链在生物盘 110 的活性层 144 上是固定不动的(图 4 和 9)。图 27C 和 27D 画出本发明同一实施方案的另一个没有副抗体 186 的实施例。在该实施例中,主抗体 188 直接与 DCHO 结合,DCHO 则在生物盘 110 的活性层 144 上,是固定不动的。

图 28A 是用图形表示的流程图,表明抗体 DCHO 络合物的制备,而图 28B-28J 是多个视图,表明本发明第三实施方案一个实施例的

结构。该第三实施方案第一实施例的结构，是用交联剂 DCHO 使捕获剂在生物盘 110 的流动通道 130 中固定不动的反射盘。图 28A 画出 DCHO 抗体络合物 199 的制备。混合相等浓度的 DCHO 198 和副抗体 186，并使之组合，从而形成 DCHO 抗体（副）络合物 199。现在参考图 28B，图上画出光生物盘 110 的透光衬底 120、反射层 142、和活性层 144。反射层 142 的一部分被除去（或在淀积时建立的开孔），产生观察窗 200，光透过观察窗，被引导至抗体被固定的捕获区 140 位置。图 28B 画出 5 个这样的捕获区 140，第一个以捕获区 141 表示。活性层 144 最好是聚苯乙烯，它可以用旋转涂布在反射层 142 上，形成光滑的表面，厚度约 40 至 300 微米。然后，在本实施例中，在每一捕获区 140 和 141 上淀积 DCHO 抗体（副）络合物 199，并把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟（图 28C）。清洗盘 110，以除去未结合的 DCHO 抗体（副）络合物 199，然后用旋转干燥，完全除去盘 110 表面的水分（图 28D）。在第一捕获区 141 上淀积参考点 202，又把主抗体 188 淀积在每一相继的捕获区 140 上（图 28E）。然后，把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟（图 28F）。用 PBS 清洗，除去未结合的主抗体 188，之后把盘 110 旋转干燥，除去表面的水分（图 28G）。粘附单元或通道层 118 附着于活性层 144 上。与前面各实施例相似，一般示于图 2 的顶盖部分 116，可用聚碳酸酯构成，且最好在底部镀上反射表面 146，尽量如图 4 所示。在本实施例中，顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上，由此在盘内形成流动通道 130，如图 28H 所示。把阻断剂 204，如 StabilGuard®，注入每一流动通道 130，以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点。该步骤画在图 28I。在本实施例中，把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养约 30 分钟，然后经抽真空，完全清除任何残留的溶液，如图 28J 所示。

按照本发明的制作方面，图 28A - 28J 还表明一种进行簇指定计数的光学测定盘的制作方法。光学测定盘的制作方法，包括的步骤如下：在管中提供交叉联结子、向管添加捕获剂、使交叉联结子与捕获

剂组合（形成络合物）、提供衬底、以活性层涂敷衬底、在活性层上淀积络合物、和用粘附单元把顶盖部分附着在活性层上。在本实施例中，叉联结子是活化醛右旋糖酐。捕获剂用于与细胞表面抗原结合。在另外的一个实施例中，捕获剂用于与主捕获剂结合，该主捕获剂对细胞表面抗原有选择性的亲和力。在一个优选实施例中，细胞表面抗原独立地选自抗原的 CD 科。在一个更可取的实施例中，细胞表面抗原独立地选自包含 CD3、CD4、CD8、和 CD45 的一组。

本发明第三实施方案第二实施例的结构，是不用副抗体而使主捕获剂在生物盘 110 的流动通道 130 中固定不动的反射盘。在本实施例中，混合相等浓度的 DCHO 198 和主抗体 188，并使之组合，从而形成 DCHO 抗体（主）络合物 199，如图 28A 所示。在第一窗 141 上淀积参考或校准标记 202，并在每一相继的捕获区 140 把 DCHO 抗体（主）络合物 199 淀积在活性层 144 上（图 28C）。然后，把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养最好 30 分钟，并用 PBS 清洗，除去未结合的 DCHO 抗体（主）络合物 199。把盘 110 旋转干燥，除去表面的水分，如图 28D 所示。粘附单元或通道层 118 类似地附着于活性层 144 上。顶盖部分 116 可用聚碳酸酯构成，且最好在底部镀上反射表面 146，尽量如图 4 所示。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上，由此在盘内形成流动通道 130，如图 28H 所示。把阻断剂 204，如 StabilGuard®，注入每一流动通道 130，以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点（图 28I）。把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养约 30 分钟，然后经抽真空，完全清除任何残留的溶液，如图 28J 所示。图 29 画出不用副抗体完成的反射生物盘 110 的截面图。

本发明第三实施方案第三实施例的结构，是利用交叉联结子 DCHO 使捕获剂在盘 110 的流动通道 130 中固定不动的透射盘 110。在本实施例中，衬底 120、没有观察窗 200（图 28B）的半反射层 143，和活性层 144 如图 5 所示。DCHO 抗体（副）络合物 199、主抗体 188、参考标记或点 202、和阻断剂 204 的淀积如上所述，并示于图 28C -

28I。粘附单元或通道层 118 附着于活性层 144 上。光学上透明的顶盖部分 116 (图 5) 可用聚碳酸酯构成。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上,由此在盘 110 内形成流动通道 130。图 30 画出利用 DCHO 抗体(副)络合物 199 和主抗体 188 完成的透射生物盘 110 的截面图。应当指出,第三实施方案的第四实施例,可以由本领域熟练人员构建。第四实施例包括的结构,是不用副抗体使主捕获剂在盘 110 的流动通道中固定不动的透射盘 110 (图 29 和 30)。其他的实施例可以包括使用抗生蛋白链菌素 182 (图 18A) 和生物素 184 (图 18B),使主或副抗体对盘 110 的活性层 144 固定不动。之后,固定不动的抗体(主和副两者)从而可以与 DCHO 198 络合,以便增加生物盘 110 流动通道 130 中捕获剂的浓度。

实施方案 IV

图 31A 是光生物盘 110 的顶视图,画出四个流体通路 128,各有若干个针对特定细胞标记物的捕获区 140 和负控制区。如图所示,每一流体通路有专用于专门针对 CD3、CD4、CD8、和 CD45 的捕获区 140。任何其他需要的模式或细胞表面抗原的组合,例如别的 CD 标记物或细胞表面标记物,也可以采用。在本特定的实施方案中,对每个个别的流体通路,在每一捕获区 140 中,必须只有单一的共同的捕获剂。图 31A 中画出的盘,专门适合与下面图 31B - 31E、44A - 44D、45、和 46 说明的细胞捕获化学反应及方法一起使用。图 31A 中画出的盘 110,可以是反射盘,也可以是透射盘。

现在转向图 31B - 31E,图上画出分析物捕获的本发明第四实施方案的图形表示。图 31B 和 31C 画出被 CD4⁺T 细胞 190 和 CD8⁺T 细胞 194 的副抗体捕获,形成主抗体细胞络合物,这些 CD4⁺T 细胞 190 和 CD8⁺T 细胞 194 已经预先与主抗体 188 (图 18F) 组合。主抗体 188 与生物素基副抗体 186 (图 18E) 结合,副抗体 186 借助交联剂抗生蛋白链菌素 182,在生物盘 110 的活性层 114 (图 4 和 9) 上是固定不动的。图 31D 和 31E 画出本发明没有交联系统的同一实施方案另一个实施例。在该实施例中,副抗体 186 直接在生物盘 110 的活性

层 144 上，是固定不动的。

图 32A - 32I 是截面图，画出本发明第四实施方案一个实施例的结构。第一实施例包括反射盘结构，它利用交联系统使捕获剂在生物盘流动通道内固定不动。现在参考图 32A，图上画出光生物盘 110 的对光透明的衬底 120、反射层 142、和活性层 144。反射层 142 的一部分被除去（或在淀积时建立的开孔），产生观察窗 200，光透过观察窗，被引导至抗体被固定的捕获区 140 位置。图 32A 画出 5 个这样的捕获区 140，第一个指定为捕获区 141。活性层 144 最好是聚苯乙烯，它可以用旋转涂布在反射层 142 上，形成光滑的表面，厚度约 40 至 300 微米。然后在每一捕获区 140 和 141 上淀积抗生蛋白链菌素 182，并把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养约 30 分钟，如图 32B 所示。清洗盘 110，以除去未结合的抗生蛋白链菌素 182，然后用旋转干燥，完全除去盘 110 表面的水分，如图 32C 所示。在第一捕获区 141 上淀积参考标记或校准点 202，又把生物素基副抗体 186 淀积在每一相继的捕获区 140 上，如图 32D 和 32E 所示。然后，在本实施例中，把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养约 30 分钟。该步骤示于图 32E。用 PBS 清洗，除去未结合的副抗体 186，之后把盘 110 旋转干燥，除去表面的水分。本方法的这一步骤示于图 32F。粘附单元或通道层 118 被类似地加在活性层 144 上。相应的顶盖部分 116 最好用聚碳酸酯构成，并在底部镀上反射表面 146，尽量如图 4 所示。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上，由此在盘内形成流动通道 130，如图 32G 所示。把阻断剂 204，如 StabilGuard®，注入每一流动通道 130，以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点。这一步骤画在图 32H。把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养最好 30 分钟，然后经抽真空，完全清除任何残留的溶液，如图 32I 所示。

本发明第四实施方案第二实施例的结构，是不用交联系统而使捕获剂在盘 110 的流动通道 130 中固定不动的反射盘 110。在本实施例中，在第一窗 141 上淀积参考标记或校准点 202，又把一般示于图 18D 的非生物素基的副抗体 186，直接淀积在活性层 144 的每一相继捕获

区 140 上。然后,把盘 110 在室温下放进湿的箱中培养 30 分钟。用 PBS 清洗,除去未结合的副抗体 186,之后把盘 110 旋转干燥,除去表面的水分。粘附单元 118 附着于活性层 144 上。顶盖部分 116 由聚碳酸酯构成,且最好在底部镀上反射表面 146,尽量如图 4 所示。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118 上,由此在盘内形成流动通道 130。把阻断剂 204,如 StabilGuard®,注入每一流动通道 130,以便迅速地并有效地阻断活性层 144 任何残留的非指定的结合结点。把盘在室温下放进湿的箱中培养约 30 分钟,然后经抽真空,完全清除任何残留的溶液。图 33 画出不用交联系统完成的反射生物盘 110 的截面图。

本发明第四实施方案第三实施例的结构,是利用交联系统使捕获剂在生物盘 110 的流动通道 130 中固定不动的透射盘 110。在本实施例中,衬底 120、没有观察窗 200 (图 32A) 的半反射层 143,和活性层 144 示于图 5。抗生蛋白链菌素 182、生物素基的主抗体 188、参考标记 202、和阻断剂 204 的淀积如上所述,并示于图 32B-32H。粘附单元 118 附着于活性层 144 上。光学上透明的顶盖部分 116 (图 5) 可用聚碳酸酯构成。顶盖部分 116 整体地附着在粘附单元 118,由此在盘 110 内形成流动通道 130 (图 32G)。图 34 画出利用交联系统完成的透射生物盘 110 的截面图。应当指出,第四实施方案的第四实施例,可以由本领域熟练人员构建。第四实施例包括的结构,是不用交联系统而使副捕获剂在生物盘 110 的流动通道中固定不动的透射盘 110 (图 33 和 34)。

簇指定计数-实施方案 I

图 35A 是光生物盘 110 的顶视图,画出四个流体通路 128,各有若干个针对四种不同特定细胞表面标记物的捕获区 140 和负控制区。如图所示,每一流体通路专设四个捕获区 140,每一捕获区专门针对 CD4、CD8、CD3、和 CD45。任何其他需要的模式或细胞表面抗原的组合,例如别的 CD 标记物或细胞表面标记物,也可以采用。在本特定的实施方案中,对每个个别的流体通路,在每一捕获区 140 中,不限制必须只有单一的共同的捕获剂。相反,在本实施方案中,希望有

不同捕获剂的捕获区。这些捕获区，例如可以排列成阵列格式，至少是2乘2的矩阵。图35A中画出的盘，专门适合与下面图35B-35E、36、37、38A-38C、39、40、41A-41C、42、和43说明的细胞捕获化学反应及方法一起使用。图35A中画出的盘110，可以是反射盘，也可以是透射盘。

下面参考图35B-35D，图上画出用本发明第一实施方案的生物盘，分析已提纯并已清洗的MNC样品（图17A）。如图35B所示，把MNC样品注进生物盘110的流动通道130。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力（即作用在曲线运动物体上的力，它使物体远离曲率中心或旋转轴）作用在测试样品上，使之与主抗体188接触。如图35C所示，主抗体与之发生接触，然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T细胞190和 $CD8^+$ T细胞194。光驱动器电动机162（图10）使盘旋转，清除捕获区140（图20I）中未结合的T细胞。光盘驱动器112的入射光束152（图1）与被捕获的 $CD4^+$ T细胞190和 $CD8^+$ T细胞194相互作用，见图35D，并把返回光束154反射回检测器157（图10），供处理和分析。

图36画出用本发明第一实施方案第二实施例，分析图35B-35D的同一测试样品。生物盘110的流动通道130被注以MNC样品（图35B）。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力（即作用在曲线运动物体上的力，它使物体远离曲率中心或旋转轴）作用在测试样品上，使之与主抗体188接触。主抗体与之发生接触，然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T细胞190和 $CD8^+$ T细胞194（图35C）。光驱动器电动机162（图10）使盘旋转，清除捕获区140（图20I）中未结合的T细胞。光盘驱动器112的入射光束152（图1）与被捕获的 $CD4^+$ T细胞190和 $CD8^+$ T细胞194相互作用（图35D），并把返回光束154反射回检测器157（图10），供处理和分析。

图37画出用本发明第一实施方案第三实施例，分析图35B-35D的同一测试样品。生物盘110的流动通道130被注以MNC样品（图35B）。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力（即作用在

曲线运动物体上的力，它使物体远离曲率中心或旋转轴）作用在测试样品上，使之与主抗体 188 接触。主抗体与之发生接触，然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194(图 35C)。光驱动器电动机 162(图 10)使盘旋转，清除捕获区 140(图 20I)中未结合的 T 细胞。光盘驱动器 112 的入射光束 152(图 1)与被捕获的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 相互作用(图 35D)，之后，透射光束 156 传送至检测器 157(图 10)，供处理和分析。

簇指定计数-实施方案 II

现在参考图 38A - 38C，图上画出用本发明第二实施方案的生物盘，分析已提纯并已清洗的 MNC 样品(图 17A)。生物盘 110 的流动通道 130 被注以 MNC 样品，如图 38A 所示。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力（即作用在曲线运动物体上的力，它使物体远离曲率中心或旋转轴）作用在测试样品上，使之与主抗体 188 接触。主抗体与之发生接触，然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194。该步骤画在图 38B。光驱动器电动机 162(图 10)使盘旋转，清除捕获区 140(图 24L)中未结合的 T 细胞。光盘驱动器 112 的入射光束 152(图 1)与被捕获的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 相互作用，见图 38C，并把返回光束 154 反射回检测器 157(图 10)，供处理和分析。

图 39 画出用本发明第二实施方案第二实施例，分析图 38A - 38C 的同一测试样品。生物盘 110 的流动通道 130 被注以 MNC 样品(图 38A)。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力（即作用在曲线运动物体上的力，它使物体远离曲率中心或旋转轴）作用在测试样品上，使之与主抗体 188 接触。主抗体与之发生接触，然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194(图 38B)。光驱动器电动机 162(图 10)使盘旋转，清除捕获区 140(图 24L)中未结合的 T 细胞。光盘驱动器 112 的入射光束 152(图 1)与被捕获的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 相互作用(图 38C)，并把返回光束 154 反射回检测器 157(图 10)，供处理和分析。

图 40 画出用本发明第二实施方案第三实施例,分析图 38A - 38C 的同一测试样品。生物盘 110 的流动通道 130 被注以 MNC 样品 (图 38A)。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力 (即作用在曲线运动物体上的力,它使物体远离曲率中心或旋转轴)作用在测试样品上,使之与主抗体 188 接触。主抗体与之发生接触,然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 (图 38B)。光驱动器电动机 162 (图 10) 使盘旋转,清除捕获区 140 (图 24L) 中未结合的 T 细胞。光盘驱动器 112 的入射光束 152 (图 1) 与被捕获的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 相互作用 (图 38C),之后,透射光束 156 传送至检测器 157 (图 10),供处理和分析。

簇指定计数-实施方案 III

下面转到图 41A - 41C,图上画出用本发明第三实施方案的生物盘,分析已提纯并已清洗的 MNC 样品 (图 17A)。如图 41A 所示,把 MNC 样品注进生物盘 110 的流动通道 130。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力 (即作用在曲线运动物体上的力,它使物体远离曲率中心或旋转轴)作用在测试样品上,使之与主抗体 188 接触。主抗体与之发生接触,然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194。本方法的这一步骤画在图 41B。光驱动器电动机 162 (图 10) 使盘旋转,清除捕获区 140 (图 28J) 中未结合的 T 细胞。光盘驱动器 112 的入射光束 152 (图 1) 与被捕获的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 相互作用,见图 41C,并把返回光束 154 反射回检测器 157 (图 10),供处理和分析。

图 42 画出用本发明第三实施方案第二实施例,分析图 41A - 41C 的同一测试样品。生物盘 110 的流动通道 130 被注以 MNC 样品 (图 41A)。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力 (即作用在曲线运动物体上的力,它使物体远离曲率中心或旋转轴)作用在测试样品上,使之与主抗体 188 接触。主抗体与之发生接触,然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 (图 41B)。光驱动器电动机 162 (图 10) 使盘旋转,清除捕获区 140 (图 28J) 中

未结合的 T 细胞。光盘驱动器 112 的入射光束 152 (图 1) 与被捕获的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 相互作用 (图 41C), 并把返回光束 154 反射回检测器 157 (图 10), 供处理和分析。

图 43 画出用本发明第三实施方案第三实施例, 分析图 41A - 41C 的同一测试样品。生物盘 110 的流动通道 130 被注以 MNC 样品 (图 41A)。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力 (即作用在曲线运动物体上的力, 它使物体远离曲率中心或旋转轴) 作用在测试样品上, 使之与主抗体 188 接触。主抗体与之发生接触, 然后捕获任何存在于测试样品中的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 (图 41B)。光驱动器电动机 162 (图 10) 使盘旋转, 清除捕获区 140 (图 28J) 中未结合的 T 细胞。光盘驱动器 112 的入射光束 152 (图 1) 与被捕获的 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 相互作用 (图 41C), 之后, 透射光束 156 传送至检测器 157 (图 10), 供处理和分析。

簇指定计数-实施方案 IV

现在参考图 44A - 44D, 图上画出用本发明第四实施方案的生物盘, 分析已提纯并已清洗的 MNC 样品 (图 17A)。图 44A 是用图形表示的制备主抗体 T 细胞络合物的流程图。包含 $CD4^+$ T 细胞 190 和 $CD8^+$ T 细胞 194 两种细胞的 MNC 混悬液, 与主抗体 188 混合, 并使它们结合, 从而形成主抗体 T 细胞络合物。正如本领域熟练人员所知, 其他有不同表面标记物的细胞, 也可以用本实施方案加标记。如图 44B 所示, 生物盘 110 的流动通道 130 被注以主抗体 T 细胞络合物。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力 (即作用在曲线运动物体上的力, 它使物体远离曲率中心或旋转轴) 作用在测试样品上, 使之与副抗体 188 接触, 该副抗体在生物盘 110 的活性层 144 上是固定不动的。对主抗体 T 细胞络合物有亲和力的副抗体 186, 捕获该络合物, 如图 44C 所示。光驱动器电动机 162 (图 10) 使盘旋转, 清除捕获区 140 (图 32I) 中未结合的络合物。光盘驱动器 112 的入射光束 152 (图 1) 与被捕获的络合物相互作用, 见图 44D, 并把返回光束 154 反射回检测器 157 (图 10), 供处理和分析。

图 44A - 44D 还表明本发明方法另一个主要方面。与图 17A 结合，可以提供另一种进行簇指定计数的方法。该方法包括步骤：（1）向包含分离梯度的管中提供血样；（2）以足够使血样分离成层的时间和速度旋转该管；（3）使包含 T 细胞的 MNC 层再混悬，形成 MNC 混悬液；（4）向 MNC 混悬液添加主抗体，形成主抗体 T 细胞络合物；（5）把主抗体 T 细胞络合物的样品放在盘表面，该盘表面包括至少一个含有至少一种捕获剂的捕获区；（6）把盘装入光阅读机；（7）把入射的电磁辐射束引向捕获区；（8）检测经过与盘捕获区相互作用之后形成的电磁辐射束；（9）把检测的电磁束转换为输出信号；和（10）分析该输出信号，提取与捕获区上捕获的细胞数有关的信息。在该方法的一个实施例中，光盘的结构有反射层，可使引导至捕获区又不落在细胞上的光被反射。在该方法的另一个实施例中，光盘的结构可使引导至捕获区又不落在细胞上的光，透过光盘。

图 45 画出用本发明第四实施方案第二实施例，分析图 44A - 44D 的同一测试样品。生物盘 110 的流动通道 130 被注以主抗体 T 细胞络合物（图 44B）。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力（即作用在曲线运动物体上的力，它使物体远离曲率中心或旋转轴）作用在测试样品上，使之与生物盘 110 活性层 144 上固定不动的副抗体 188 接触。对主抗体 T 细胞络合物有亲和力的副抗体 186，捕获该络合物（图 44C）。光驱动器电动机 162（图 10）使盘旋转，清除捕获区 140（图 32I）中未结合的络合物。光盘驱动器 112 的入射光束 152（图 1）与被捕获的络合物相互作用（图 44D），并把返回光束 154 反射回检测器 157（图 10），供处理和分析。

图 46 画出用本发明第四实施方案第三实施例，分析图 44A - 44D 的同一测试样品。生物盘 110 的流动通道 130 被注以主抗体 T 细胞络合物（图 44B）。毛细作用、外部点样器施加的压力、和/或离心力（即作用在曲线运动物体上的力，它使物体远离曲率中心或旋转轴）作用在测试样品上，使之与生物盘 110 活性层 144 上固定不动的副抗体 188 接触。对主抗体 T 细胞络合物有亲和力的副抗体 186，捕获该络合物

(图 44C)。光驱动器电动机 162 (图 10) 使盘旋转, 清除捕获区 140 (图 32I) 中未结合的络合物。光盘驱动器 112 的入射光束 152 (图 1) 与被捕获的络合物相互作用 (图 44D), 之后, 透射光束 156 传送至检测器 157 (图 10), 供处理和分析。

本领域的熟练人员显然知道, 借助上述教导, 可以组合本发明方法的一个或多个实施方案的一个或多个实施例, 而不违背本发明的范围和精神。

细胞检测和有关的软件

现在参考图 47, 图上画出的光生物盘, 包括保持样品的流体通路 128。图 47 还画出放大的流体通路 47, 表明不同的捕获或靶区 140 和包括参考标记或校准点 202 的靶区 141。在本特定的实施例中, 采用 5 个捕获区 140, 分别实施对 CD4+细胞、CD8+细胞、CD3+细胞、CD45+细胞、和作为负控制的肌红蛋白的捕获。

图 48A 是从不同实施例获得的像, 该实施例包括 6 个捕获区 140, 各捕获区分别实施对 CD45+细胞、CD15+细胞、CD4+细胞、CD8+细胞、CD15+细胞的第二捕获区、和 CD45+细胞的第二捕获区的捕获。在该实施例中, 用两个 CD45+细胞和 CD15+细胞捕获区作为验证控制或检验捕获效率与期望的计数结果是否一致。图 48A 还以放大图表明 CD4、CD8、和控制的一系列细胞表面抗原。如图所示, 该像是在背景视场中的许多细胞。图 48B 代表从实际显微镜得到的控制、CD4、和 CD8 捕获区像的近摄图, 并与从本发明生物盘得到的像比较。图 49 表明实际显微镜的像与本发明生物盘相应的像另一个更细致的比较。如图 48B 和 49 给出的, 本发明人已经发现, 生物盘的像, 与从显微镜得到的像比较, 有相等的质量和分辨率。因此, 这些像表明, 用本发明的设备和方法的背景映衬下, 能使个别细胞成为可见的。用于检测要调查的特性的方法, 在下面共同授予的专利申请中有更详细的说明: U.S. Provisional Application Serial No. 60/270,095 和 60/292,108, 标题都是: “Signal Processing Apparatus and Methods for Obtaining Signal Signature of Investigation Features Detected on a

Surface of an Optical Disc Assembly”，分别在 2001 年 2 月 2 日和 2001 年 5 月 18 日申请，和共同授予的专利申请：U.S. Patent Application Serial No. 10/043,688，标题是“Optical Disc Analysis System Including Related Methods For Biological and Medical Imaging”，2002 年 1 月 10 日申请，本文引用全部这些专利申请，供参考。

这些细胞能够通过各种不同方法之一检测，这些方法包括，例如使用刀口检测硬件或软件，对透射或反射光强足够大的变化进行检测和计数，从而对其变迁亦即对细胞计数。另一种下面还要更详细说明的方法，是使用像或模式识别软件，识别背景上的细胞。像识别能区分 WBC 和 RBC，还能区分中性白细胞、单核细胞、嗜碱白细胞、嗜酸性细胞、粒性白细胞、和淋巴细胞。

可以用具有相隔 1.6 微米量级的轨道的光盘，使盘上的细胞或凝集物成像。例如，一个白细胞通常的直径，至少占 5 条轨道，最大占 12 条轨道，因此可以获得该白细胞的像。

为了获得这样的像，可以用如图 2、3、和 4 所示类型的透射盘（虽然也可用反射盘），和图 10 所示类型的包括触发器传感器 160 及顶检测器 158 的盘驱动器系统。触发器检测器 158 检测透射盘中的触发标记 126，并当检测到该标记时，向计算机提供信号，指示开始收集和/或处理数据。随着光源在观察窗中的轨道上通过，从接收的透射光中可以获得像。在这种情形下的顶检测器，可以是单个的检测器，也可以是沿径向和/或圆周方向排列的多个检测器单元的阵列。该类检测器和检测方法，例如在下述共同授予的专利申请中有说明：U.S. Provisional Application Serial No. 60/247,465，标题是：“Optical Disc Drive For Bio-Optical Disc”，2000 年 11 月 9 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/293,093，标题是：“Disc Drive Assembly For Optical Bio-Discs”，2001 年 5 月 22 日申请；和 U.S. Patent Application Serial No. 10/008,156，标题是：“Disc Drive System and Methods for Use with Bio-Discs”，2001 年 11 月 9 日申请，本文引用以上各专利申请全文，供参考。

获得诸如图 48A、48B、和 49 的像之后，可以用像识别软件进一步处理像的数据，该软件可用于识别需要的特性。还要求该像识别软件不仅有能力区别细胞和背景，而且有能力区分细胞的各种类型。

现在参考图 50，图上画出从要调查的数据中导出的像，该数据包括红细胞和白细胞两种细胞。如在放大的视图中所示，这些白细胞和红细胞，有鲜明的区分特征，因此能够从背景中检测，还能用像识别把它们彼此区分。此外，还有可能区分各种白细胞类型，包括淋巴细胞、单核细胞、中性白细胞、嗜酸性细胞、粒性白细胞、和嗜碱白细胞。

图 51 画出有许多细胞的样品视场，其中带加号的表示已被识别为细胞的对象。在已经对每一区或需要的任何数量的区检测细胞数量后，得到细胞计数数据，这些数据可以显示在单个屏上，给出易于观察的数据表示，例如如图 52 所示。如在图 52 中画出的，与特定的细胞计数一起提供的是直方图，表明细胞的相对数量。在 CD4/CD8 分析中，系统还可以产生 CD4/CD8 比值，以及任何其他需要的数学计算或比较。图 53 提供一种不同的处理视，表明在像场中的细胞，被转换为 CD4 计数、CD8 计数、和比值，还有指示该比值在正常范围的输出。

本发明涉及细胞检测和相关处理方法的各个方面，也公开在下述专利申请中：U.S. Provisional Application Serial No. 60/316,273，标题是：“Capture Layer Assemblies and Optical Bio-Disc for Immunophenotyping”，2001 年 8 月 31 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/318,026，标题是：“Methods for Imaging Blood Cells, Blood-Borne Parasites and Pathogens, and Other Biological Matter Including Related Optical Bio-Disc and Drive Assemblies”，2001 年 9 月 7 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/322,527，标题是：“Optical Analysis Discs Including Microfluidic Circuits for Performing Cell Counts”，2001 年 9 月 14 日申请；U.S. Provisional Application Serial No. 60/322,040，标题是：

“Optical Analysis Discs Including Fluidic Circuits for Optical Imaging and Quantitative Evaluation of Blood Cells Including Lymphocytes”, 2001 年 9 月 11 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/322,863, 标题是: “Methods for Differential Cell Counts Including Leukocytes and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same”, 2001 年 9 月 12 日申请; 和 U.S. Provisional Application Serial No. 60/322,793, 标题是: “Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Charged Matter Including Heparin, Plasma, or Poly-Lysine”, 2001 年 9 月 17 日申请, 本文引用以上所有专利申请, 供参考。

分类细胞计数方法和有关的软件

用光盘数据对白细胞进行计数的许多方法和相关算法, 在这里作更详细的讨论。这些方法和有关的算法, 不限于对白细胞计数, 也可以容易用于对任何类型细胞物质计数, 包括, 但不限于: 红细胞、白细胞、珠、及任何其他对象, 不论是生物的或非生物的, 只要产生能被光阅读机检测的类似的光学特征波形。

为说明的目的, 下面与本发明有关的方法和算法的说明, 将参照图 54-58, 是针对白细胞计数的。稍加修改, 这些方法和算法可以用于对其他类型的细胞、或与白细胞大小相似对象的计数。本文一般地说明细胞计数方法和算法的数据评价方面, 以便为本发明的方法和设备提供相关的背景。捕获和处理来自光生物盘的调查数据的方法和算法, 具有广泛的可用性, 并已经更详细地公开在下述共同授予的专利申请中: U.S. Provisional Application Serial No. 60/291,233, 标题是: **“Variable Sampling Control For Rendering Pixelation of Analysis Results In Optical Bio-Disc Assembly And Apparatus Relating Thereto”, 2001 年 5 月 16 日申请, 本文引用, 供参考, 还有上面已引用的 U.S. Provisional Application Serial No. 60/404,921, 标题是: “Methods For Differential Cell Counts Including Related Apparatus And Software For Performing Same”。**

下面的讨论，简要地解释这些方法和算法的基本纲要。如图 10 所示，关于生物测试样品属性的信息，是以电磁辐射束的形式，从光生物盘 110 提取的，该电磁辐射束因与测试样品的相互作用而被改变或被调制。在与图 2、3、4、11、13、和 15 结合讨论的反射式光生物盘情形中，返回光束 154 载有生物样品的信息。如上面讨论那样，实际上只有当入射光束在流动通道 130 内，或在靶区 140 内，从而与样品接触时，返回光束中才包含关于生物样品的该种信息。在生物盘 110 的反射式实施例 1 中，返回光束 154 也可以载有在反射层之内或之上已编码的信息，要不然就是在图 13 和 14 所示的摆动槽 170 中已编码的信息。本领域熟练人员应当知道，只当相应的入射光束与反射层 142 接触时，有靶区的反射盘的返回光束 154 中，才包含预先记录的信息。当入射光束 152 所在的区域，承载信息的反射层 142 已经被除去或因其他原因缺失，那么，返回光束就不包含该种信息。在与图 5、6、8、9、12、14、和 16 结合讨论的透射式光生物盘情形中，透射光束 156 载有生物样品的信息。

继续参考图 10，有关生物测试样品的信息，不论是从反射盘的返回光束 154 获得，还是从透射盘的透射光束 156 获得，都被引导到信号处理的处理器 166。这种处理包括：把被底检测器 157（反射盘）检测的，或被顶检测器 158（透射盘）检测的模拟信号，转换为离散的数字信号形式。

下面参考图 54，信号变换包括：对模拟信号 210 按固定的时间间隔 212 抽样，并对信号相应的即时模拟幅度 214 编码，成为离散的二进制整数 216。抽样开始于某一开始时间 218，并在某一结束时间 220 结束。与任何模数转换过程相关的两个共通的值，是抽样频率和比特深度。抽样频率，也称为抽样速率，是每单位时间的抽样数。较高的抽样频率要求相继抽样之间较短的时间间隔 212，导致数字信号 222 与原来的模拟信号 210 比较，有较高的保真度。比特深度是在每一抽样点上，对模拟信号 210 的抽样幅度 214 进行编码的比特数。比特深度越大，二进制整数 216 越接近原来的模拟幅度 214。在本实施例中，

抽样速率是 8 MHz，比特深度是每抽样 12 比特，允许的整数抽样范围是 0 到 4095 (0 到 $(2^n - 1)$)，这里 n 是比特深度。这一组合可以改变，以容纳其他实施例中特定的精度需求。仅作例子而非限制，可以在涉及对珠计数的实施例中，要求增加抽样频率，因为珠一般比细胞更小。然后，把抽样数据发送至处理器 166，供模数变换。

在进行模数变换时，沿激光路径每一相继的抽样点 224，作为一维阵列 226，相继地存储在盘或存储器中。每一相继的轨道给出一独立的一维阵列，于是产生两维的阵列 228 (图 57A)，它类似于一个像。

图 55 是本发明光生物盘 110 的透视图，它把位于光生物盘轨道 232 上被捕获的白细胞 230 局部放大画出。如图所示，入射光束 152 与白细胞 230 的相互作用，产生包含信号的光束，不论该光束是以反射盘返回光束 154 的形式，还是以透射盘透射光束 156 的形式，它不是被检测器 157 检测，就是被检测器 158 检测。

图 56A 是图 55 所示被捕获的白细胞 230 的另一个图形表示，该白细胞 230 位于光生物盘轨道 232 上。如图 55 和 56A 所示，白细胞 230 覆盖约 4 条轨道 A、B、C、和 D。图 56B 画出从图 55 和 56A 的白细胞 210 导出的一系列特征波形轨迹。如图 56B 所指出，检测系统提供 4 个与轨迹 A、B、C、和 D 对应的模拟信号 A、B、C、和 D。图 56B 还进一步表明，模拟信号 A、B、C、和 D 的每一个，都载有白细胞 230 的特定信息。因此，如图所示，在白细胞 230 上的扫描，产生对入射光束清楚的扰动，该扰动能够被检测和处理。然后，模拟的特征波形轨迹 (信号) 210 被引送至处理器 166，以便变换为类似的数字信号 222，如图 57A 和 57C 所示，下面还要更详细讨论。

图 57 是图形表示，表明图 57A、57B、57C、和 57D 之间的关系。图 57A、57B、57C、和 57D，是图 56B 的特征波形轨迹变换为数字信号 222 的图形表示，这些数字信号 222，作为一维阵列 226 存储，并组合成数据输入 244 的两维阵列 228。

现在具体参考图 57A，图上画出从图 55 和 56A 所示光生物盘轨

道 A 和 B 抽样的模拟信号 210。处理器 166 然后对模拟信号 210 相应的即时模拟幅度 214 编码，成为离散的二进制整数 216（见图 54）。产生的一系列数据点，是相似于被抽样的模拟信号 210 的数字信号 222。

下面参考图 57B，来自轨道 A 和 B（图 57A）的数字信号 222，作为独立的一维存储阵列 226 存储。每一相继的轨道给出相应的一维阵列，当与先前的一维阵列组合时，产生类似于一个像的两维阵列 228。然后，数字数据作为抽样点 224（图 54）的两维阵列 228，存储在存储器或盘，这些抽样点，代表样品区域特定点上返回光束 154 或透射光束 156（图 55）的相对强度。然后，两维阵列以原始文件或图像文件 240 的形式，存储在存储器中或盘上，如图 57B 所示。之后，从存储器检索 242 以图像文件 240 存储的数据，并作为图 10 所示分析器 168 的数据输入 244。

图 57C 画出从图 55 和 56A 所示光生物盘轨道 C 和 D 抽样的模拟信号 210。处理器 166 然后对模拟信号 210 相应的即时模拟幅度 214 编码，成为离散的二进制整数 216（图 54）。产生的一系列数据点，是相似于被抽样的模拟信号 210 的数字信号 222。

现在参考图 57D，来自轨道 C 和 D 的数字信号 222，作为独立的一维存储阵列 226 存储。每一相继的轨道给出相应的一维阵列，当与先前的一维阵列组合时，产生类似于一个像的两维阵列 228。然后，如上所述，数字数据作为抽样点 224（图 54）的两维阵列 228，存储在存储器或盘，这些抽样点，代表样品区域特定点上返回光束 154 或透射光束 156（图 55）的相对强度。然后，两维阵列以原始文件或图像文件 240 的形式存储在存储器中或盘上，如图 57B 所示。之后，如上所述，从存储器检索 242 以图像文件 240 存储的数据，并作为图 10 分析器 168 的数据输入 244。

本发明的计算和处理算法，存储在分析器 168（图 10）中，并运用于输入数据 244，产生可以显示在显示监控器 114（图 10）上的有用的输出结果 262（图 58）。现在参考图 58，图上按照本发明的处理

方法和计算算法，画出数据评价主要步骤的逻辑流程图。本处理方法的第一主要步骤，包括接收输入数据 244。如上所述，数据评价以范围 0 到 4095 的整数阵列开始。

下一个主要步骤 246，是选择盘的计数区域。该区域一旦确定，目标就变成对包含在所确定区域内所有白细胞，进行实际计数。步骤 246 的实施方案，依赖于盘的配置和用户的选项。只作例子而不是限制，本发明的实施例使用的盘有窗，如图 2 和 5 所示的靶区 140，软件识别这些窗，并圈出其上的一部分供分析和计数。在一个优选的实施例中，例如在图 2 的实施例中，靶区或窗是 1×2 mm 的两端有半圆形部分的矩形。在该实施例中，软件在相应窗内圈出标准的 1×2 mm 矩形面积。在该实施例的一个方面中，阅读机可以取若干个相继的样品值，以比较若干不同窗中的细胞数。

在本发明使用没有窗的透射盘的实施例中，如图 5、6、8、和 9 中，步骤 246 可按一种或两种不同的方式进行。标准矩形位置的选择，或者通过把标准矩形的中心相对于固定坐标的一点定位，或者通过找出参考标记 202（例如见图 24L、25、和 26），这是黑色染料的一点。在采用参考标记 202 的情况中，把具有需要反差的染料，淀积在盘上相对于两簇细胞的指定位置 141（例如图 20E）。然后，引导光盘阅读机跳到细胞簇之一的中心，并使标准的矩形对准选择的簇。

至于上述步骤 246 中用户的选项，用户可以通过用鼠标选择或其他方式的直接对话形式，为细胞计数指定样品区域需要的形状，例如矩形区域。在软件的本实施例中，这样做涉及使用鼠标点击，并在监控器 114 上显示的、由光生物盘导出的像的需要部分，拖出一矩形。不论评价区域的选择方法如何，在下一步骤 248 中，是对用于计数的相应的矩形区域进行评价。

图 58 的第三主要步骤是步骤 248，该步骤针对背景照明的均匀化。通过该过程，校正某些硬件配置可能产生的背景均匀性起伏。背景照明均匀化把每一样品点的强度水平偏移，以便整个背景，或没有细胞的部分，接近有任意背景值 $V_{\text{background}}$ 的水平。而 $V_{\text{background}}$ 可以

用许多方式决定,例如取标准矩形样品区域的平均值,在本实施例中,该值设为 2000。选出的矩形样品区域每一点 P 的值 V ,用数($V_{\text{background}} + (V - P \text{ 邻域的平均值})$)取代,并在必要时截断,以适应实际可能的值范围,该范围在本发明的优选实施例中是 0 到 4095。邻域大小的选择,要比细胞的大小大得多,又比标准矩形小得多。

图 58 流程图的下一步骤,是规一化步骤 250。执行规一化步骤 250 时,用标准矩形样品区域中的数据施行线性变换,使平均值变成 2000 且标准偏差为 600。如有必要,截断该值,以适应 0 到 4095 的范围。该步骤 250,以及背景照明均匀化步骤 248,使软件对硬件的改变及调节更不敏感。只作例子而非限制,可以改变检测电路如顶检测器 158 的信号增益,对最后的细胞计数不会有明显影响。

如图 58 所示,下一步是执行滤波步骤 252。对标准矩形中的每一点 P,在比步骤 248 指出的大小更小的 P 点邻域,按与 $V_{\text{background}}$ 有充分差别的值来计算该邻域的点数。被计算的点应接近像中细胞的大小。如果该数足够大, P 点的值保留;否则把它指定为 $V_{\text{background}}$ 。执行这一滤波操作,是为了消除噪声,且在最佳的情况下,只有细胞被保留在像中,而背景则一致地等于 $V_{\text{background}}$ 。

可选的步骤 254,是针对不良成分的消除,该步骤可按图 58 所示进行。诸如划痕、气泡、污物、或其他类似的不合规则的疵点,可能被滤波步骤 252 放过。这些疵点可能直接地,或通过影响像的直方图的整个分布,使细胞计数产生误差。通常,这些疵点的大小比细胞大得多,并能够在步骤 254 中去除,办法如下。首先,形成与选择的区域尺寸相同的二进制像。如果在原来的像某一点的值等于 $V_{\text{background}}$,则在该二进制像中相应点定义为白,否则定义为黑。其次,连接的黑点成分被抽去。然后,接着是施行侵蚀和展开,使成分的视图规则化。最后,大于已规定阈值的成分,从原来的像中除去。在本可选步骤的一个实施例中,通过向原来像中对应的样品点赋值 $V_{\text{background}}$,从原来的像中除去这种成分。决定哪些成分构成可计数的对象,而哪些成分必须消除的阈值,是用户定义的值。该阈值也可以随要计数的调查特

性，即白细胞、红细胞、或其他生物物质而改变。在可选步骤 254 之后，最好再重复步骤 248、250、和 252。

图 58 的下一个主要步骤是步骤 256，该步骤是按明亮的中心对细胞计数。计数步骤 256 包括若干子步骤。第一子步骤包括施行卷积。在该卷积的子步骤中，形成称为卷积图的辅助阵列。卷积图中点 P 的值，是对 P 的圆形邻域进行滤波之后的图进行积分得到的。更准确地说，对某一特定实施例，被积分的函数，是当 v 大于 2000 时等于 $v - 2000$ ，当 v 小于或等于 2000 时等于 0 的函数。计数步骤 256 要执行的下一个子步骤，是找出卷积图在细胞大小的半径邻域中的局部极大。再下一步，是避免在彼此紧密连接的邻域中有成对的相同局部极大。计数步骤 256 的最后一个子步骤，是把剩余的局部极大视为标记的细胞。

在某些硬件配置中，一些细胞可能呈现出没有明亮的中心。在这些情况中，只有暗的边缘是可见的，那么下面的两个可选步骤 258 和 260 是有用的。

步骤 258 用于从该图中消除发现的细胞。在步骤 258，环绕每一个发现的细胞中心的圆形区域，用值 2000 填充，使既有明亮中心又有暗边缘的细胞，不会被发现两次。

步骤 260 是针对用暗的边缘对附加的细胞计数。在步骤 258 之后，要对该像进行两种变换。该程序的第一子步骤，即子步骤(a)，用 $(2000 - v)$ 取代每一点的值 v ，又如果结果是负的，则以 0 代替。然后，在子步骤(b)，对得到的图，以内径 $R1$ 和外径 $R2$ 的环作卷积。 $R1$ 和 $R2$ 分别是细胞的最小和最大期望半径，随后，该环在子步骤(d)中，要向左、向右、向上、和向下移动。在子步骤(c)，把经过 4 种移动得到的结果加起来。在这样变换之后，暗边缘细胞的像，看起来仿佛是一朵四瓣的花。最后在子步骤(b)，按计数步骤 256 采用的方式，找出子步骤(c)得到的函数的极大。找出的极大就是在步骤 256 中被忽略的标记的细胞。

在计数步骤 256 之后，或在可选地采用计数步骤 260 之后，图 58

最后一个主要步骤是结果输出步骤 262。在标准矩形中发现的细胞数，显示在图 1 和 5 的监控器 114 上，且对每一个已识别的细胞，用红十字在显示的光生物盘导出的像上作标记。

现在参考图 59，该图画出的分析空腔，有分析白细胞的不同的捕获区。暗黄色膜或白细胞样品，是用各种方法从全血分离的，这些方法包括溶解、正的或负的选择、和梯度离心或任何这些方法的组合。涉及样品制备的进一步细节，在下面的例子 1、2、和 3 中说明，也公开在例如下面共同授予和共同待决的专利申请中：U.S. Provisional Application Serial No. 60/382,319，标题是：“Methods For Isolation Of T-Lymphocytes For Use In Differential Cell Counting And Use Of Optical Bio-Disc For Performing Same”，2002 年 5 月 22 日申请。本文引用该申请全文，供参考。一旦 MNC 或暗黄色膜被分离，则把 MNC 引进分析空腔，在分析空腔中，要研究的细胞与它们各自的捕获剂结合，并执行下面例如例子 7 列出的过程。

现在参考图 60A 和 60B，图上画出的分析空腔，有分析红与白细胞的不同的捕获区。图 60A 画出红细胞 ABO 分析，及暗黄色膜 CD Marker 测定，后者有助于 CD 标记物 2、19、44、4、和 8 的捕获区。图 60B 画出另一种红细胞进行分析，它使用对 A、B、O、和 Rh 表面标记物有特定亲和力的 IgM 捕获抗体。图 60B 还画出用全血作样品的白细胞分析。在该测定中，白细胞（T 细胞、B 细胞、嗜酸性细胞、嗜碱白细胞、中性白细胞、单核细胞、和淋巴细胞）在特定捕获区中被捕获，并用第二筛选门（secondary gate）来识别和确定捕获的细胞数量。用于识别要研究的细胞的第二筛选门，是多组珠子；每一组珠子有唯一的物理特征，并有专门用于某种细胞的信号剂且附着在珠子上。物理特征可以包括大小、形状、纹理、颜色、荧光、和磷光。例如，A 组珠子可以是 1 μm 的黄绿色（YG）荧光珠子，有抗 T 细胞的信号抗原附着在珠子上。那么，A 组细胞专门与捕获的 T 细胞结合，从而以 1 μm 的 YG 荧光珠子对 T 细胞作标记。另一组珠子，例如 B 组珠子，是 2 μm 的红荧光珠子，有附着在其上的抗单核细胞的抗体，

该组珠子可用来标记单核细胞。第二筛选门能更精确判定捕获的细胞数，因为它在捕获区内只标记特定要研究的细胞，而不标记非指定结合的细胞。关于使用珠子或微球来标记要研究的细胞的进一步细节，例如公开在共同授予、共同待决的下述专利申请中：U.S. Provisional Application Serial No. 60/382,944，标题是：“Methods and Apparatus for Use in Detection and Quantitation of Cell Populations and Use of Optical Bio-Disc for Performing Same”，2002年5月24日申请。本文引用该申请全文，供参考。

下面参考图 61，图上画出从血样中获得的 CD4+细胞数的曲线，细胞是用光生物盘，在 CD 标记物测定中，在捕获区内作为细胞浓度函数捕获的。曲线表明细胞捕获的增加与样品中细胞数增加的关系。细胞是用两个来源（抗体 A 来自 DAKO，而抗体 B 来自 Serotech）的 CD4 抗体捕获的。曲线还表明，用两种捕获抗体的捕获效率有类似趋势。关于完成该实验的实验过程的进一步细节，在下面的例子 7 中说明。

现在参考图 62A 和 62B，图上画出用本发明的光生物盘及用 FACS 分析，分析血样得到的 CD4/CD8 比值数据的散布曲线。用于产生这些曲线的数据，列在下面表 8。关于收集所示数据的实验过程的细节，在下面的例 8 中说明。

实验细节

虽然本发明已经参照附图详细说明，但下面还要给出一些例子和进一步的说明。

例 1

图 17A 画出用图形表示的流程图，说明使用生物盘时样品的制备，以及提供的示于图 52 和 53 更详细的结果。后面例子的细节，如各个处理步骤的持续时间、旋转速率、及其他细节，比上面参照图 17A、52、和 53 更为具体。尽管本例提供的基本步骤与上述的那些步骤类似。

A. 包括衬底制备和化学淀积的盘的制作

在本例中，用喷气枪清洁反射盘或透射盘的衬底 120（分别对应

于图 2 和 5)，清除任何尘埃颗粒。用旋转涂布器以异丙醇清洗盘两次。把 2%的聚苯乙烯旋转涂布在盘上，在整个盘上得到非常厚的涂层。

然后是淀积化学物品。一个实施例包括三步骤的淀积设计，培养：抗生蛋白链菌素，培养 30 分钟；生物素基第一抗体，培养 60 分钟；和第二捕获抗体，培养 30 分钟。第一抗体可以在第一物种（如羊）中，按照抗第二物种（如鼠）的某种免疫球蛋白（如 IgG、IgE、IgM）培育。第二捕获抗体在第二物种中按照抗某种特定细胞表面抗原（如 CD4、CD8）培养。这些步骤是在室温下的湿的箱中完成的，在淀积之间需用清洗和干燥步骤。

1 μ l 比值为 1 mg/ml 在磷酸盐缓冲液盐水中的抗生蛋白链菌素，在每一窗上形成层，并培养 30 分钟。过量的抗生蛋白链菌素用蒸馏水清洗干净，然后使盘干燥。等体积的生物素基抗鼠 IgG 抗体（在 PBS 中的 125 μ g/ml）与活化的右旋糖酐醛（200 μ g/ml）组合。右旋糖酐醛（DCHO）生物素基抗鼠 IgG，在每一捕获窗的抗生蛋白链菌素上形成层，并培养 60 分钟或放在冰箱中一整夜。过量的试剂被清洗干净，并用旋转使盘干燥。

如在图 47 所示，可以有許多沿径向取向的观察窗，用于不同的测试，如 CD4（窗 2）、CD8（窗 3）、CD3（窗 4）、和 CD45（窗 5），及负控制（窗 6），使用抗人的这些细胞表面抗原的鼠 IgG 抗体。把如此制备的衬底培养 30 分钟，或放在冰箱中一整夜。

化学淀积的模式，提供在下面的表 5 中。

表 5

窗	1 - 2	3 - 4	5 - 6	7 - 8
第 1 层	抗生蛋白链菌素	抗生蛋白链菌素	抗生蛋白链菌素	抗生蛋白链菌素
副抗体	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO	B 抗鼠 IgG+ DCHO
主抗体	鼠抗人 CD4	鼠抗人 CD8	鼠抗人 CD3	鼠抗人 CD45

B. 盘的组装

盘是用粘附层和顶盖 116 组装的, 粘附层例如是 25、50、或 100 微米厚(图 2 和 5 中的通道层 118), 有 U 形的或“e-rad”的冲压通道, 用于建立流体通道, 而顶盖 116 是透明顶盖 116(图 5, 与带顶检测器的透射盘一起使用)或在捕获区上有反射层 142 的顶盖 116(图 2, 与带底检测器的反射盘一起使用)。

在一个实施例中, 盘是前向 Wobble Set FDL21:13707 或 FDL21:1270 CD-R 盘, 镀有 300 nm 的金作为编码信息层。在反射盘上, 用熟知的光刻技术, 从反射层刻蚀出大小为 2×1 mm 的椭圆形观察窗。在一些透射盘的设计中, 不刻蚀分离的观察窗, 而整个盘都可供使用。在该特定的实施例中, 通道层是 Fraylock 粘附层 DBL 201 Rev C 3M94661。盖是透明盘, 有 48 个直径 0.040 英寸的样品入口, 等距地分布在半径 26 mm 上。用软件以 4x 的速度对数据盘进行扫描和读出, 而用 CD4⁺/CD8⁺ 计数软件的抽样速率是 2.67 MHz。

C. 盘漏的检测

因为分析的是血, 盘必须首先检漏, 以确保盘带着样品在现场旋转时, 不会有空腔泄漏。每一通道以阻断剂, 如 StabilGuard 和 PBS-Tween 填充。阻断至少持续 1 小时。盘以每分钟 5000 转旋转 5 分钟, 检测盘的泄漏和盘的稳定性。在泄漏检测之后, 盘放在真空中 24 小时。在抽真空 24 小时后, 盘放进真空盒并存储在冰箱中, 直至使用。

D. 样品的收集、制备、和加到盘上

下面的一节是针对样品处理的步骤, 该步骤已经在图 17A 中一般地画出。通过密度梯度离心方法, 如使用 Becton Dickinson CPT Vacutainer, 提纯单核细胞(MNC)。血液(4-8 ml)直接收集进 4 或 8 ml 包含 CPT Vacutainer 的 EDTA 中。在室温下, 把该管放在有水平电动机和摆起桶(swing out bucket)的生物公害离心机中, 以 1500 至 1800×g 离心 25 分钟。血液最好在收集后两小时内使用。离心后, 除去叠在单核细胞(MNC)部分之上的血浆, 留下约 2 mm 血浆在单核细胞(MNC)层之上。收集 MNC 并用 PBS 清洗。在室温下以 300×g

离心 10 分钟，使细胞成为丸状。除去上层清液，并把包含 MNC 的丸在 PBS 中再混悬，轻拍管子。再以 $300\times g$ 清洗 10 分钟多次，各在室温下进行，以除去血小板。最后的丸又再混悬，直至细胞计数达 10,000 细胞/ μl 。把 18 μl 体积的 MNC 引入一个或多个分析空腔或通道，把盘不动地在室温下培养 15 分钟。密封通道。然后，用盘驱动器使盘以每分钟 3000 转旋转 3 至 4 分钟。盘最好用软件以速度 $4\times$ 及抽样速率 2.67 MHz 扫描和读出。

如果血样不能立即处理，单核细胞在第一次离心后，可以再混悬在血浆中轻轻颠倒 CPT 管若干次，并在室温下可存储最多 24 小时。在 24 小时内，血浆中的细胞可以如前所述收集并清洗。

E. CD4/CD8 测定格式

在本例中的测定，是属的同种的固态细胞捕获测定，以便快速确定血样中 CD4⁺和 CD8⁺ T 淋巴细胞种群的绝对数量，和 CD4⁺/CD8⁺ 淋巴细胞的比值。这一测定是在藏进 CD-ROM 中的小空腔内进行的，通过捕获区上从全血分离的 7 μl 单核细胞 (MNC)，确定特定抗体捕获的 CD4⁺、CD8⁺、CD2⁺、CD3⁺、和 CD45⁺ 细胞数。测试的根据，是在盘特定位置上的定位细胞捕获原理。根据单克隆和多克隆抗体对特定血细胞表面抗原的捕获化学反应，通过定位应用该捕获化学反应，在盘上建立若干个特定细胞捕获区。在把 MNC 血 (30,000 细胞/ μl) 注进空腔后，细胞表达抗原 CD4、CD8、CD2、CD3、和 CD45 在盘的捕获区中被捕获。同时藏在条码形分区内的还有规定的负控制区域。

F. 在盘分析

在上面步骤 D 中制备的 MNC 细胞 (PBS 中 18 μl)，被注入盘的空腔，然后密封空腔的入口和出口。盘在室温下培养 15 分钟，之后用光驱动器的 780 nm 激光扫描，用顶检测器把捕获场成像，如前所述。

软件是在盘上编码的，用于指令驱动器自动执行如下操作：(a) 使盘按一档或多档离心旋转，去掉过量的未结合的细胞，(b) 使特定的捕获窗成像，和 (c) 处理数据，包括在每一捕获区中对专门捕获

的细胞计数，并导出 CD4/CD8 比值（或不不论哪一种已编程要确定的比值）。

在处理步骤中，软件读出每一捕获区的像，并对遇到的细胞加上标记。例如，在估算 CD4+和 CD8+细胞数之后，软件计算 CD4+/CD8+细胞比值，还显示 CD4+、CD8+、CD3+、及 CD45+捕获区每微升全血中细胞的绝对数，而且也显示 CD4+/CD8+比值。从插入光盘到获得数量和比值，整个过程约需 12 分钟。

G. 使用的试剂

抗生蛋白链菌素（Sigma, cat. # S-4762）：添加去离子水，得到 5 mg/ml 的溶液，等分样本并保存在 -30°C 中。使用时，添加 Tris 缓冲液，直至最后的浓度为 1 mg/ml。

正控制：CD45（Sigma, Lot # 038H4892, cat. # C7556）。存储在在 2-8°C 中。

副捕获抗体：生物素基抗鼠 IgG（在羊中培育，Vector 实验室，Lot # L0602, Catalog # BA-9200）在蒸馏水制成原液 1.5 mg/ml。在 0.1 MPBS 中的工作 b-IgG 溶液 125 µg/ml。存储在在 2-8°C 中。若要长期存储，可以保存在 -30°C 中。

醛活化右旋糖酐（Pierce, lot # 97111761, cat. # 1856167）。在 PBS 中的原液 5 mg/ml，存储在在 2-8°C 中。

主捕获抗体：CD4（DAKO, cat. # M0716），CD8（DAKO, cat. # M0707），CD2（DAKO, cat. # M720），CD45（DAKO, cat. # M0701），CD14（DAKO, cat. # M825），和 CD3（DAKO, cat. # M7193）。存储在在 2-8°C 中。

负控制：鼠 IgG1（DAKO, cat. # X0931）。存储在在 2-8°C 中。

磷酸盐缓冲液盐水（PBS），pH 7.4（Life Technologies/GIBCO BRL, cat. # 10010-023）或等价物。室温保存。

异丙基醇，90-100%

H. RBC 溶解设计

氯化铵溶解缓冲液

1×氯化铵溶解缓冲液原液，应保存在 2 - 8°C 中。内含 0.155 M NH_4Cl 、10 mM KHCO_3 、和 0.1 mM 乙二胺四乙酸钠；pH 7.3 到 7.4。保存在 2 - 8°C 中。使用前置于室温中。

过程

1. 对每 100 μl 血，添加 2 ml 溶解缓冲液。（该过程最好在生物公害防护罩中完成）。
2. 在室温下搅拌并培养 15 分钟。
3. 在室温下，在生物公害防护罩离心机中，以 500×g 使血液离心 5 分钟。
4. 除去上层清液，并用 PBS 中 2% 的 FCS 或 FBS 清洗细胞。把细胞离心。
5. 计算 WBC 总数，并使注入样品的最后浓度为 10,000 WBC 细胞/ μl 。

例 2

单核细胞分离过程

使用有柠檬酸钠的 Becton and Dickinson CPT Vacutainer (4ml 是 BD catalog # 362760, 8ml 是 # 362761) 细胞制备管。步骤:

1. 血液直接收集进 4 或 8 ml 包含 CPT Vacutainer 的 EDTA 中。如果血样已经在抗凝血剂中，则首先倒出 Vacutainer 中的 EDTA，然后把 6 - 8 ml 血样倒进 CPT 管。

2. 在室温下，把管放在有水平电动机和摆起桶 (swing out bucket) 的生物公害离心机中，以 1500 至 1800×g 离心 25 分钟。要得到最佳结果，血液应在收集的两小时之内离心。但是，超过两小时的旧血液也可以离心，但会降低 MNC 数和增加 RBC 污染。

3. 离心后，除了在 MNC 层上留下约 2 mm 血浆外，除去其余血浆。收集并转移稍带白色的单核细胞层，放进 15 ml 的锥形离心管中。

4. 把 10 - 15 ml 的 PBS 添加到 MNC 层，轻轻颠倒离心管若干次，使细胞混合。

5. 在室温下, 通过把管放在生物公害离心机中, 以 $200\times g$ 离心 10 分钟, 清洗细胞。

6. 除去上层清液。轻轻拍打管, 使细胞再混悬。

7. 在 10 ml 的 PBS 中再次清洗。在室温下, 以 $200 - 300\times g$ 离心 10 分钟, 除去血小板。

8. 除去上层清液, 并在 50 μ l 的 PBS 中再混悬小丸。

9. 估算样品中的细胞计数。运行 CBC 或把 2 μ l 细胞稀释在 18 μ l 的台盼蓝中, 轻轻混合并用血细胞计数器对细胞计数。把样品配制成最后的细胞计数为 10,000 细胞/ μ l, 供分析。

10. 如果细胞不能立即处理, 单核细胞在第一次离心(上面步骤 2)后, 可以通过轻轻颠倒 CPT 管若干次, 使单核细胞再混悬在分离的血浆中, 这样在室温下可存储最多 24 小时。在 24 小时内, 血浆中的细胞可以如前所述收集并继续清洗。

每 μ l 总的细胞计数 = 25 个小方格中细胞数 $\times$ (乘) 100。

例 3

用 Histopaque-1077 从全血分离 MNC

把 1 ml 的 Histopaque-1077 放进 15 ml 的离心管, 再把 1 ml 的全血轻轻放在 Histopaque-1077 上面。然后, 在室温下, 以 $400\times g$ 离心 30 分钟。小心地用巴斯德移液管抽吸混合液, 并把不透明交界面转移至离心管。然后在离心管中添加 10 ml 的 PBS。然后把溶液以 $300\times g$ 离心 10 分钟。轻轻倒出上层清液, 再把细胞丸在 10.0 ml 的 PBS 中再混悬, 并以 $250\times g$ 离心 10 分钟。再次在 10.0 ml 的 PBS 中再混悬细胞丸并以 $250\times g$ 旋转继续清洗。最后的细胞丸在 0.5 ml 的 PBS 中再混悬。

例 4

盘的制备和化学淀积

A. 包括衬底制备和化学淀积的盘的制作

在本实施例中, 用喷气枪清洁透射盘的衬底, 清除任何尘埃。然后把盘安装在旋转涂布器中, 并以稳定流动的异丙醇清洗两次。之后, 用溶解在 310 ml 甲苯和 65 ml 异丙醇中的 2% 聚苯乙烯的聚苯乙烯溶

液，均匀涂布在盘上。

对副抗体的淀积，把活化的右旋糖酐醛新鲜溶液（在 PBS 中 $200\mu\text{g/ml}$ ），与等体积的 Vector IgG（在 PBS 中 $125\mu\text{g/ml}$ ）组合。用手工的针淀积，把约 $1\mu\text{l}$ 的 IgG+DCHO 络合物，淀积在盘的每一捕获区。盘在湿的箱中培养 60 分钟。用 D.I.水把过量的抗体清洗干净，然后把盘旋转干燥。

对主抗体，把 DAKO CD4 在 PBS 中稀释至 $50\mu\text{g/ml}$ ，DAKO CD8 在 PBS 中稀释至 $25\mu\text{g/ml}$ ，和 DAKO CD45 在 PBS 中稀释至 $145\mu\text{g/ml}$ 。用手工的针点样器，把每一种主抗体约 $1\mu\text{l}$ 淀积在已吸收的副抗体上部。在湿的箱中培养 30 分钟。用 PBS 清洗过量的抗体并使盘旋转干燥。

B. 盘的组装

使用的盖盘是透明的，上面附着有 Fraylock 粘附的通道层。在粘附层中有冲压形成的 4 个 U 形通道，构成流体通路。把顶盖放在透射盘衬底之上，使流体通道在抗体区之上。之后，为了使两个盘紧固在一起，要把它们经过 8 次盘模压。

C. 盘漏的检测、阻断

每一流体通道以 StabilGuard 填充，并培养 1 小时。在培养时，盘在旋转涂布器上，以每分钟 5000 转旋转 5 分钟。旋转后，检测盘通道的泄漏。然后，把 StabilGuard 从通道吸出，再把盘放在真空室中抽真空一整夜。次日早晨，把盘放在真空盒中并保存在 4°C 中。

例 5

淋巴瘤细胞谱系

A. 细胞谱系描述

细胞谱系是带有指定 SUP-T1 的人类 T 细胞淋巴瘤。ATCC cat. # 是 CRL-1942。该谱系是从患有 T-LL 病的 8 岁儿童恶性胸膜积液收集的恶性细胞中得到的。该细胞表达多种 T 谱系标记物。抗原表达是 CD1a+、CD3+、CD4+、CD5+、和 CD8+。通过每两周添加并用 10%FBS 代替 RPMI 媒质，使培养物保持在 2×10^5 与 2×10^6 细胞/ml 之间。培养

物是混悬液，在 37°C 的含 5% CO₂ 的大气中水平地培育。

B. SUP-TI 的制备

用血细胞计数器估算细胞浓度。通过离心和除去过量的上层清液，把细胞浓缩至需要的浓度。

例 6

使用淋巴瘤细胞谱系的盘检测

A. 用 SUP-TI 细胞的测试抗体

按照例 4 使用 25 μm 的粘附层/通道层制备盘。SUP-TI 细胞的浓度用血细胞计数器确定。细胞浓缩至 30,000 细胞/ μl 。把细胞注入分析盘的两个通道内。15 分钟后，以每分钟 3000 转把盘离心 5 分钟。拍摄捕获区上被捕获细胞的显微照片，并对细胞计数。该实验的结果列在下面表 6。

表 6

捕获区捕获的 SUP-TI 细胞数

通道#	CD4	CD8	CD45
1	3160	3200	3400
2	3264	3144	3008

例 7

血样 CD 标记物测试

A. 制备临床血样

上午 10:00 抽取的 12 ml 血（样品 # 176），放进 EDTA 管中。中午 12:00，在 4×15 ml 的管中，把 3 ml 血在 3 ml 的 Histopaque 1077 上形成层。在室温下，把管以 400×g 离心 30 分钟。离心后，把不透明 MNC 层内 0.5 cm 的血浆吸出。把剩余的不透明 MNC 层转移至清洁的 15 ml 管并添加 12 ml 的 PBS。对剩余的 3 管重复该过程。

清洗

之后，把细胞混悬液以 250×g 离心 10 分钟。吸出上层清液。细胞在 14 ml 的 PBS 中再混悬。再把混悬液以 250×g 离心 10 分钟。吸出上层清液，并以 175 μl 的 PBS 把每一细胞丸再混悬。然后，把所有

4 个 MNC 混悬液组合,而细胞浓度则用 Cell Dyne 1600 细胞计数器运行 CBC 确定。最后的体积是 650 μl , 浓度为 23.5K 细胞/ μl 。然后我们进行了 6 种系列稀释剂的稀释,以浓度范围在 1000 细胞/ μl 到 100,000 细胞/ μl 为止,见下面的表 7。

B. 购自 DAKO 和 Serotec 的 CD4 抗体的比较

有 6 个通道的两个盘 (#338 & #339), 各按例 4 用 100 μm 粘附层制作。另一种购自 Serotec 的主 CD 抗体 (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$, cat. # LN1298), 也用于本实验。

我们向盘 338 的每一通道, 注入用一种系列稀释剂稀释的样品 176。15 分钟后, 以每分钟 3000 转把盘离心 5 分钟。拍摄化学区上被捕获细胞的显微照片, 并用细胞计数软件 (Metamorph) 对细胞计数。另外, 捕获的细胞数可以用光盘阅读机及随盘软件评估。该过程是用于盘 339 的。在 DAKO CD4 化学区上捕获细胞的计数, 与 Serotec CD4 化学区捕获的细胞比较。从该实验收集的数据, 示于表 7 及图 61。

表 7

用 DAKO 和 Serotec CD4 捕获抗体捕获的细胞

样品 176	CD4 DAKO	CD4 DAKO	CD4 DAKO	CD4 Serotec	CD4 Serotec	CD4 Serotec
细胞浓度	盘 338	盘 339	平均	盘 338	盘 339	平均
1,000 细胞/ μl	76	59	68	71	49	60
5,000 细胞/ μl	282	211	247	287	273	280
10,000 细胞/ μl	559	526	543	530	525	528
25,000 细胞/ μl	1168	1205	1187	1015	1040	1028
50,000 细胞/ μl	2459	2595	2527	1726	1981	1854
100,000 细胞/ μl	3686	3835	3761	3513	3372	3443

例 8

把盘的 CD4/CD8 比值与 FACS 的 CD4/CD8 比值比较

临床样品 (No. 154、156、157、159 和 175) 的制备与例 7 同, 每一样品只用 3 ml 血, 最后样品的浓度是 10,000 细胞/ μl 。

盘 (No. 272、275、276、267 和 327) 的制备与例 4 同, 使用 100 μm 的粘附层通道。

各样品按下面表 8 所示注入对应的盘。15 分钟后, 以每分钟 3000 转把盘离心 5 分钟。拍摄化学区上被捕获细胞的显微照片, 并对细胞计数。各临床样品还用 FACS 进行分析。该实验的结果, 示于下面的表 8 及图 62A 和 62B。

表 8

用光生物盘和 FACS 的血 CD4/CD8 比值

盘#	样品#	盘 CD4/CD8	FACS CD4/CD8
272	154	0.32	0.48
275	156	0.99	0.87
276	157	2.86	2.46
267	159	1.48	1.65
327	175	1.18	1.32

结束声明

本文公开本发明涉及设备、方法、和处理的各个方面, 也在下面的专利申请中给出: U.S. Provisional Application Serial No. 60/323,682, 标题是: “Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Blocking Agents”, 2001 年 9 月 20 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/324,336, 标题是: “Methods for Reducing Bubbles in Fluidic Chambers Using Polyvinyl Alcohol and Related Techniques for Achieving Same in Optical Bio-Discs”, 2001 年 9 月 24 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/326,800, 标题是: “Sealing Methods for Containment of Hazardous Biological Materials within Optical Analysis Disc Assemblies”, 2001 年 10 月 3 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/328,246, 标题是: “Methods for Calculating Qualitative and Quantitative Ratios of Helper/Inducer-Suppressor/Cytotoxic

T-Lymphocytes Using Optical Bio-Disc Platform”, 2001 年 10 月 10 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/386,072, 标题是: “Quantitative and Qualitative Methods for Characterizing Cancerous Blood Cells Including Leukemic Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform”, 2001 年 10 月 19 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/386,073, 标题是: “Methods for Quantitative and Qualitative Characterization of Cancerous Blood Cells Including Lymphoma Blood Samples Using Optical Bio-Disc Platform”, 2001 年 10 月 19 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/386,071, 标题是: “Methods for Specific Cell Capture by Off-Site Incubation of Primary Antibodies with Sample and Subsequent Capture by Surface-Bound Secondary Antibodies and Optical Bio-Disc Including Same”, 2001 年 10 月 26 日申请; U.S. Provisional Application Serial No. 60/344,977, 标题是: “Quantitative and Qualitative Methods for Cell Isolation and Typing Including Immunophenotyping”, 2001 年 11 月 7 日申请; 和 U.S. Provisional Application Serial No. 60/349,975, 标题是: “Methods for Reducing Non-Specific Binding of Cells on Optical Bio-Discs Utilizing Charged Matter Including Heparin, Plasma, or Poly-Lysine”, 2001 年 11 月 9 日申请, 本文引用所有这些专利申请, 供参考。

虽然本发明已经参照一些优选实施例和技术例子详细说明, 但显而易见, 本发明不限于那些精确的实施例或例子。相反, 借助现在公开的、说明目前实现本发明的最佳模式, 本领域熟练人员会发现, 在不违背本发明的范围和精神的情况下, 存在许多变化和修改。因此, 本发明的范围应由下面的权利要求书规定, 而不是由前面的说明规定。所有与权利要求书等效的意义和范围内的变化、修改、和变更, 都应认为涵盖在权利要求书的范围之内。

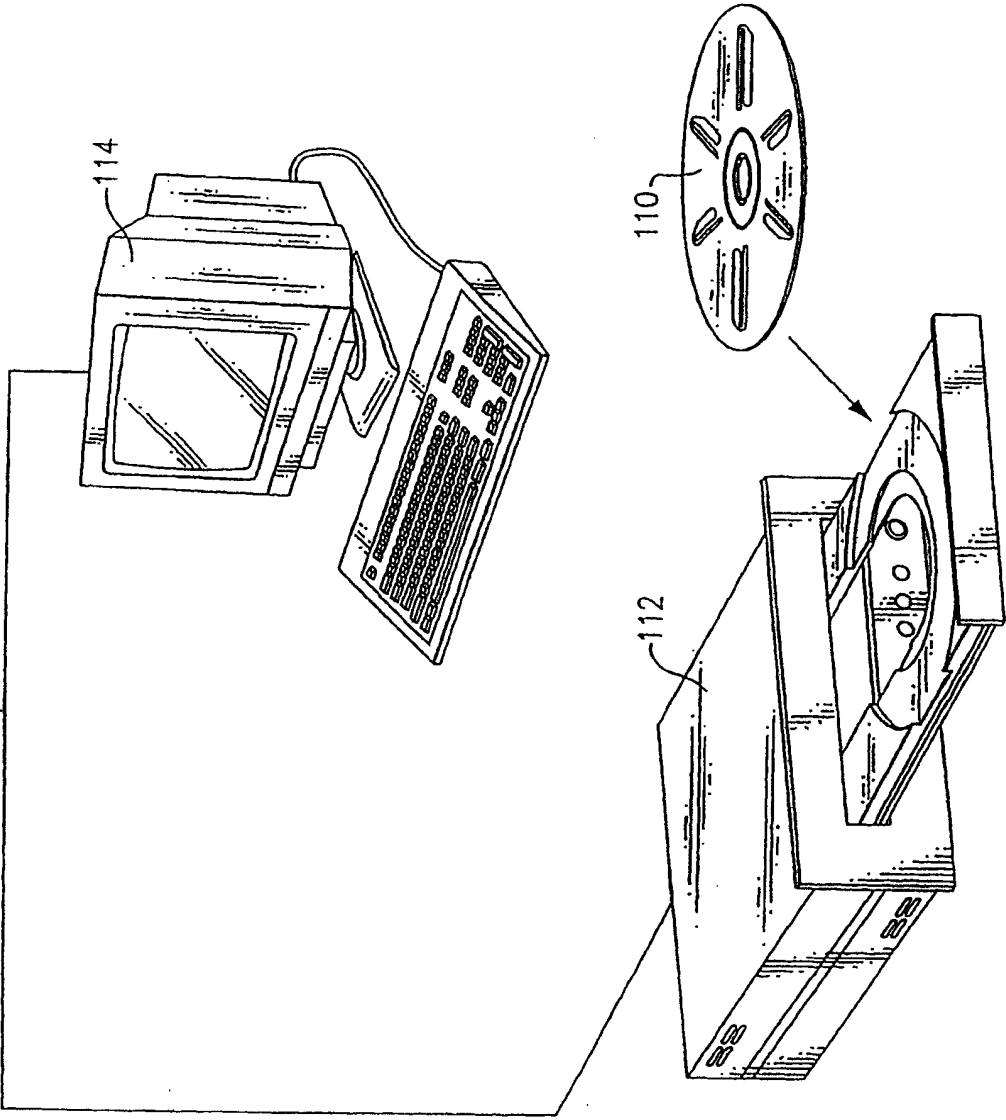
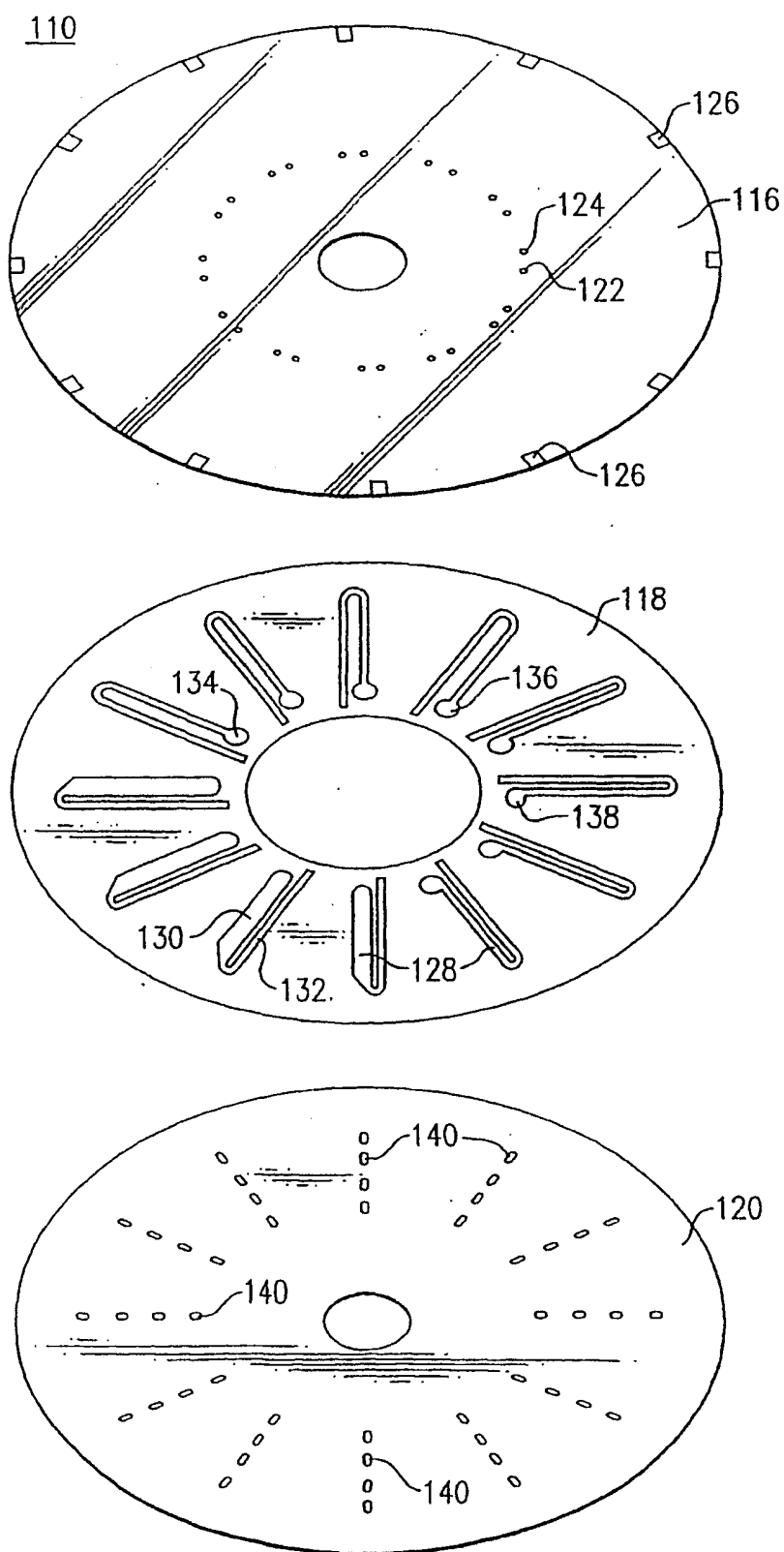


图1

图2



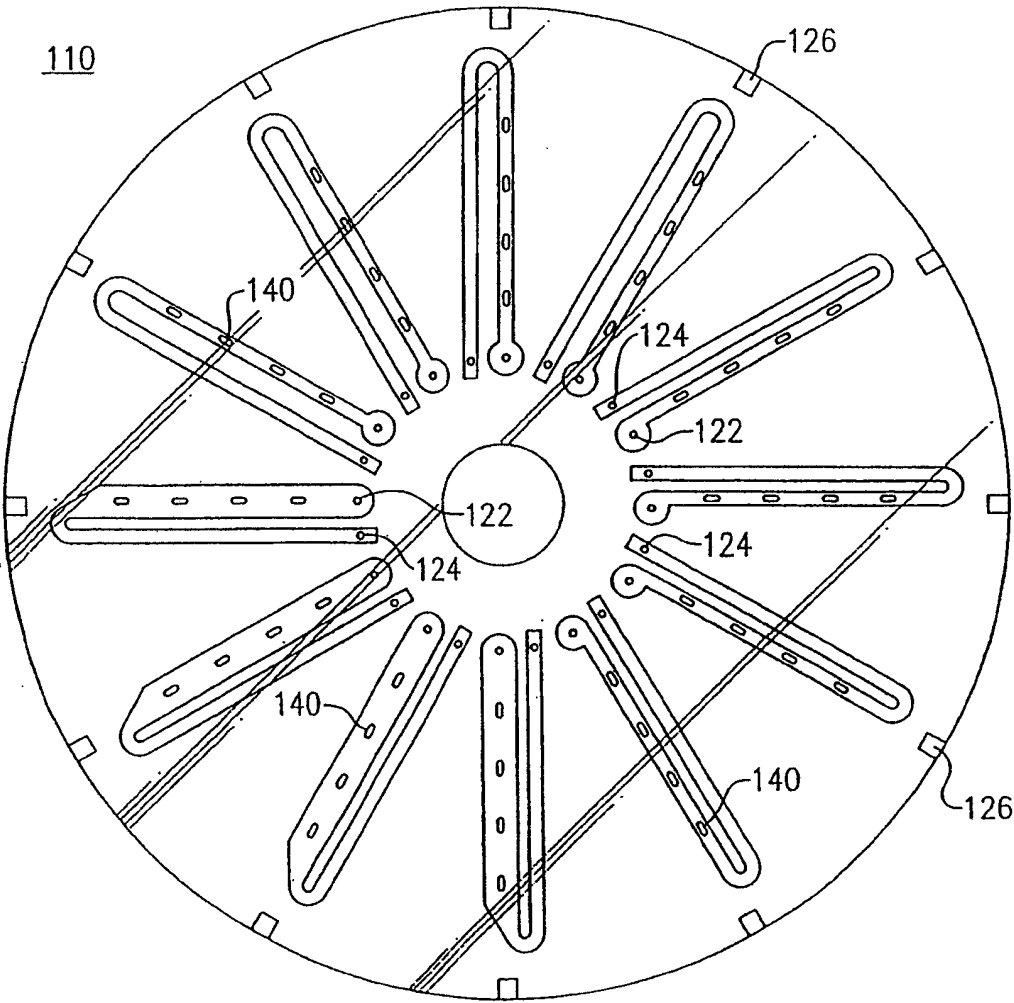
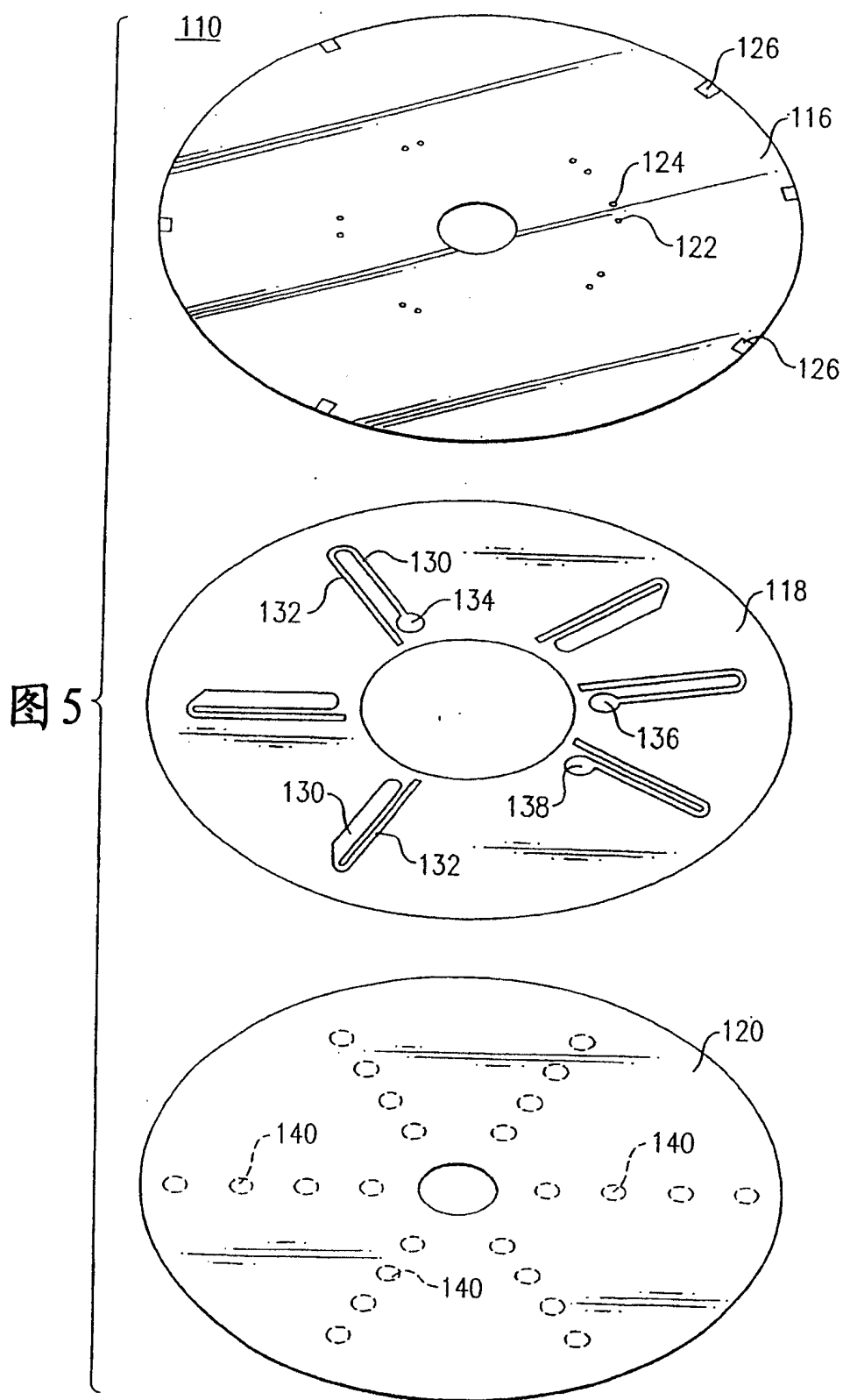


图 3



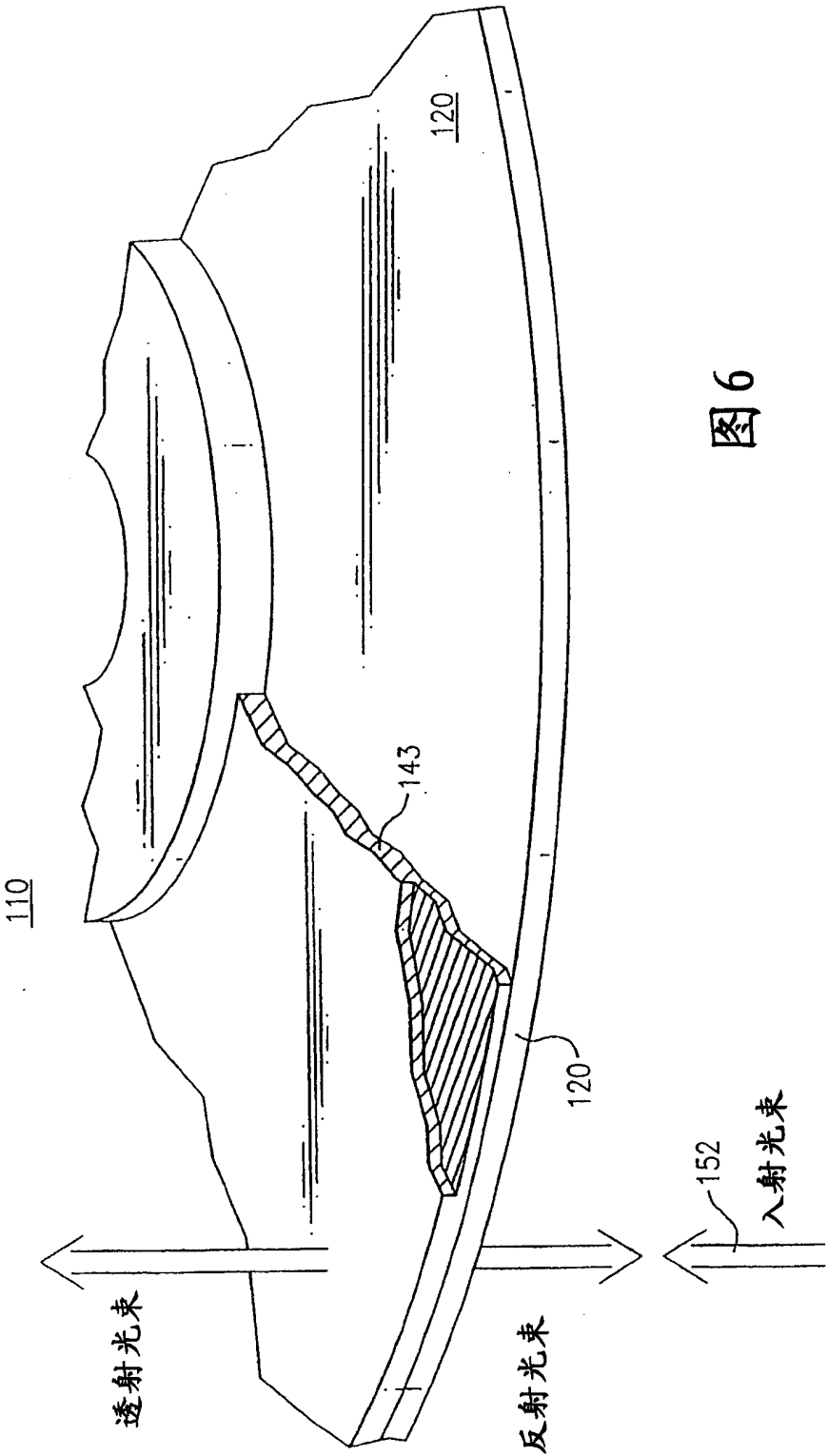


图6

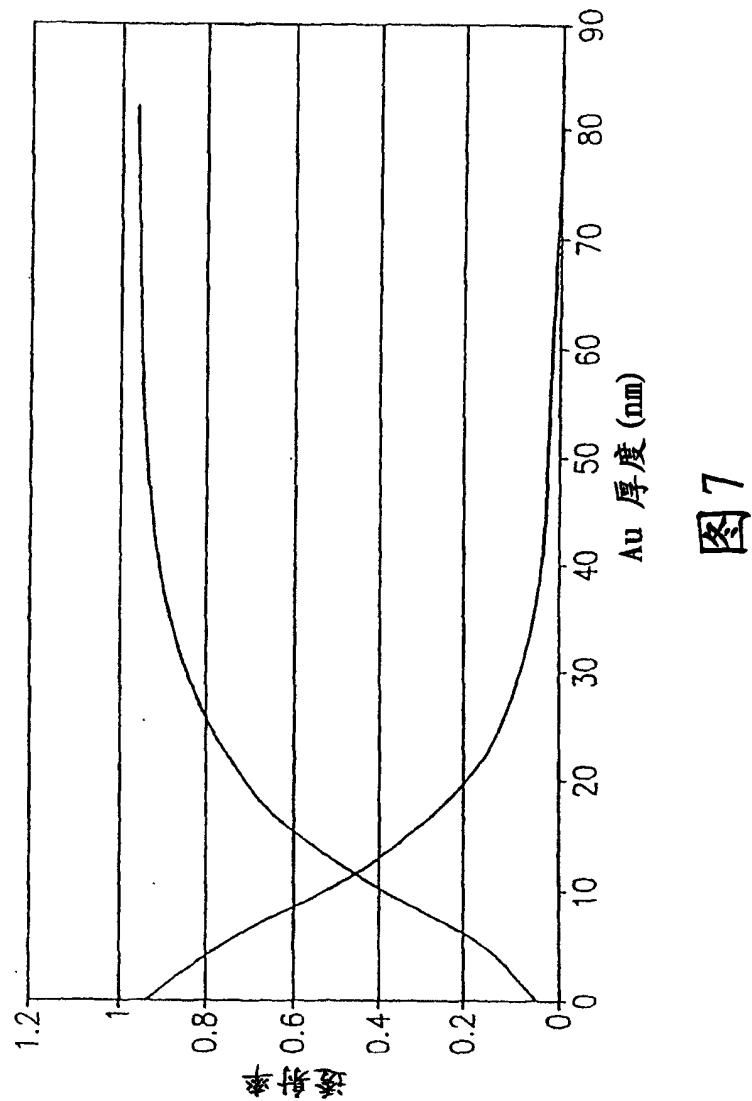


图7

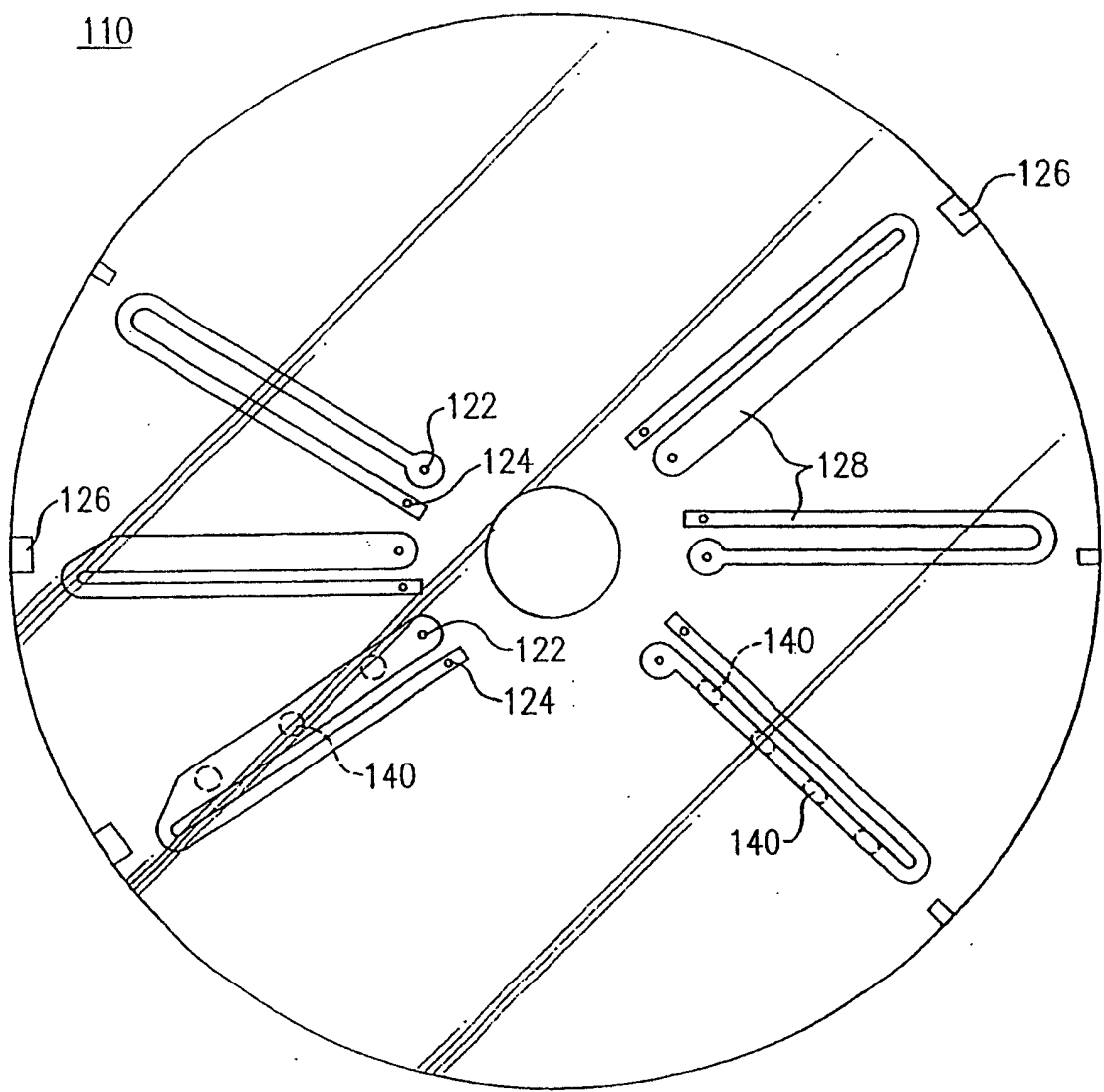


图8

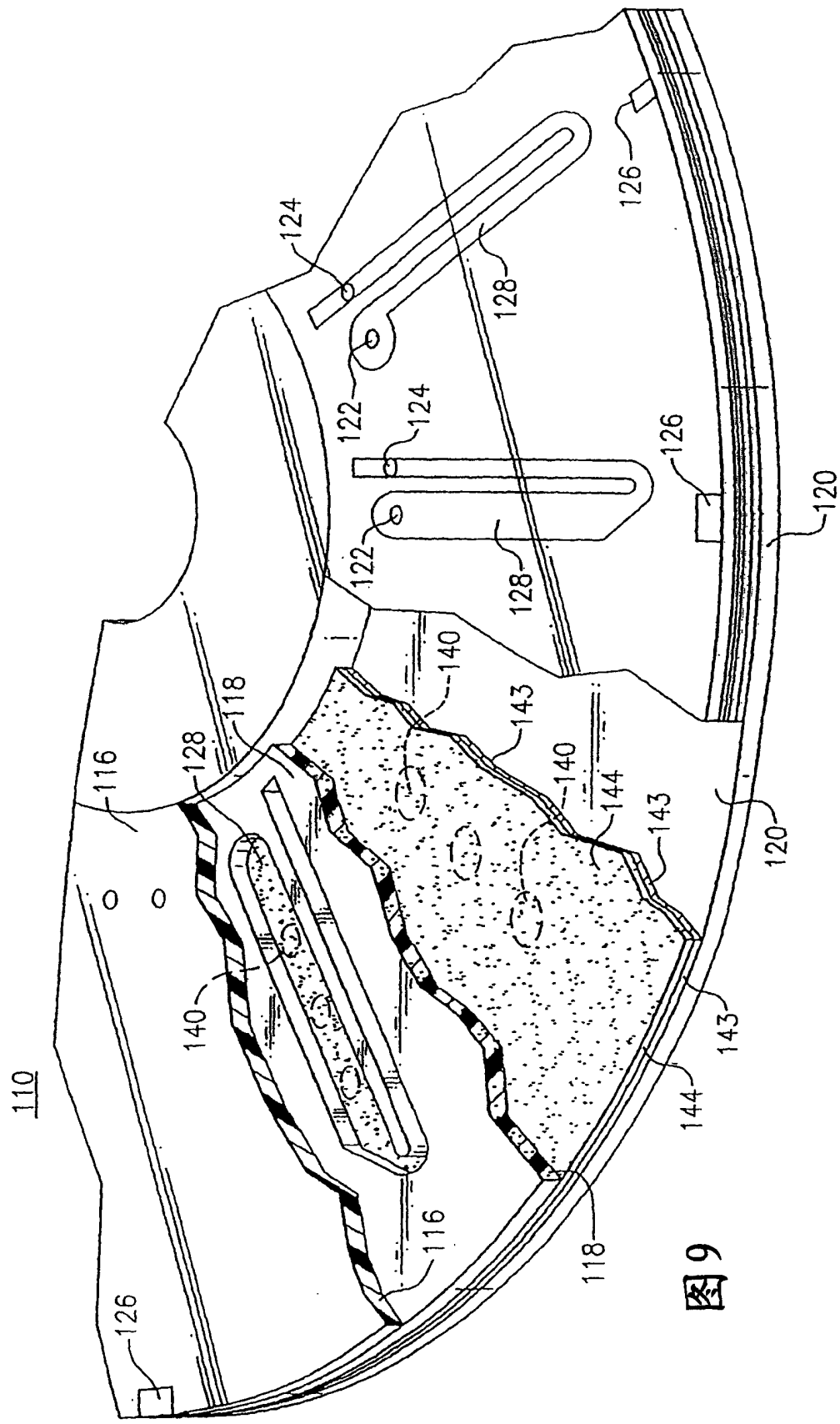


图9

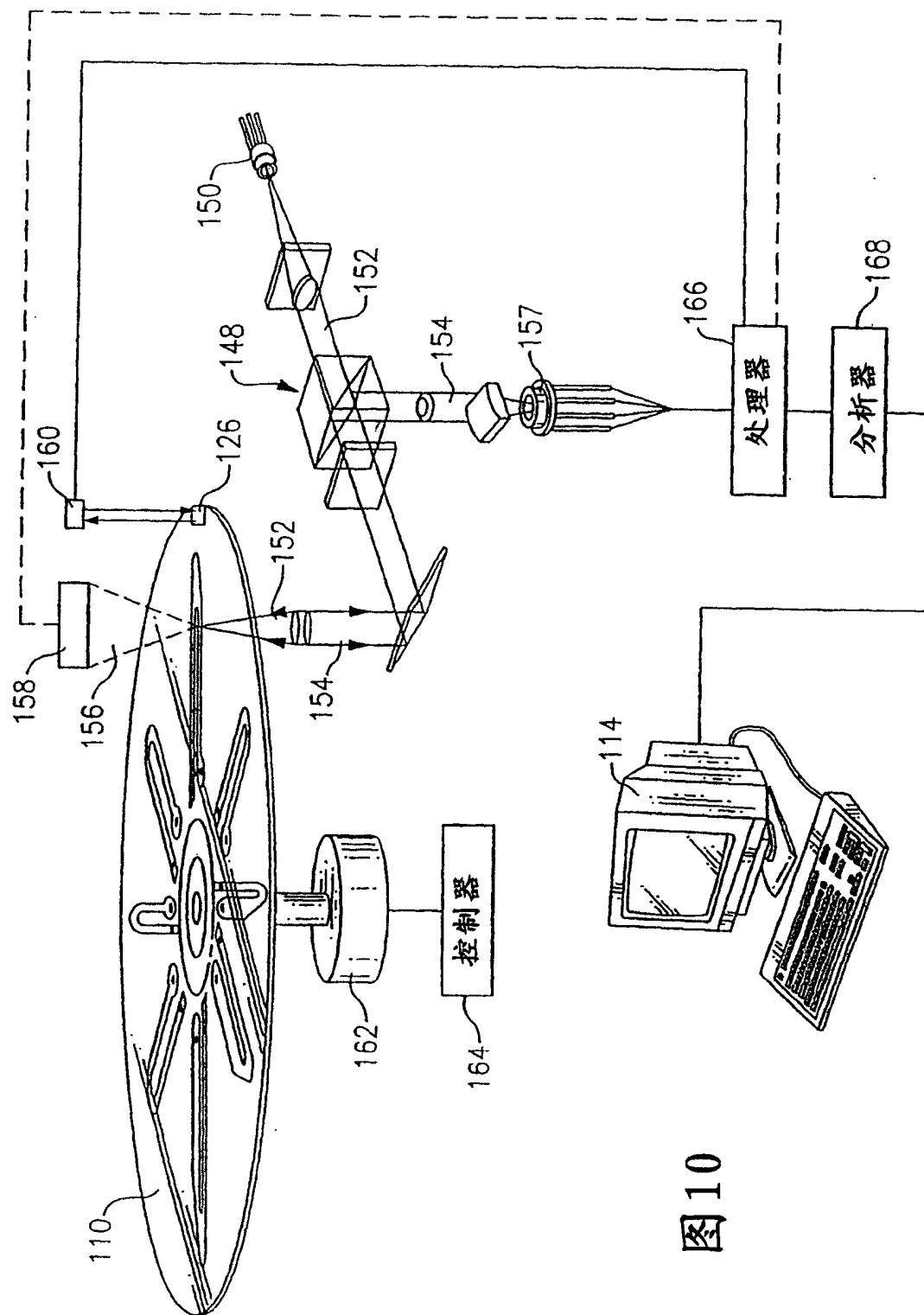
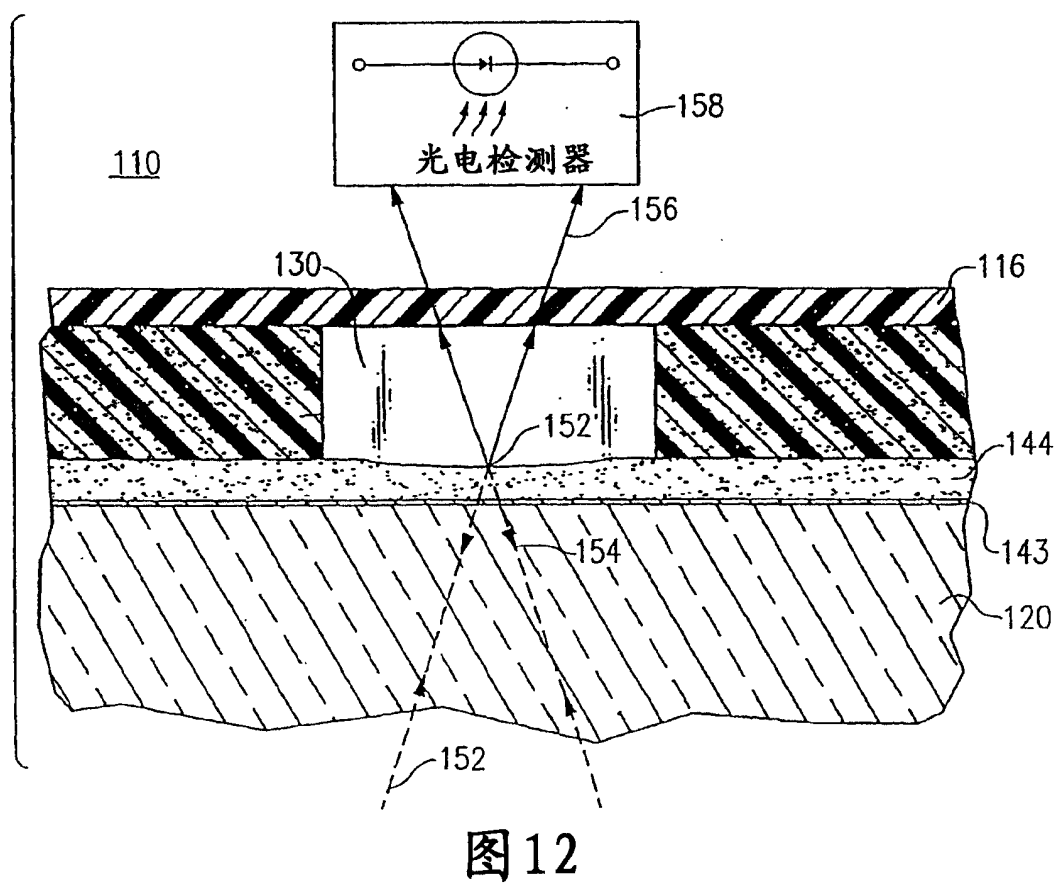
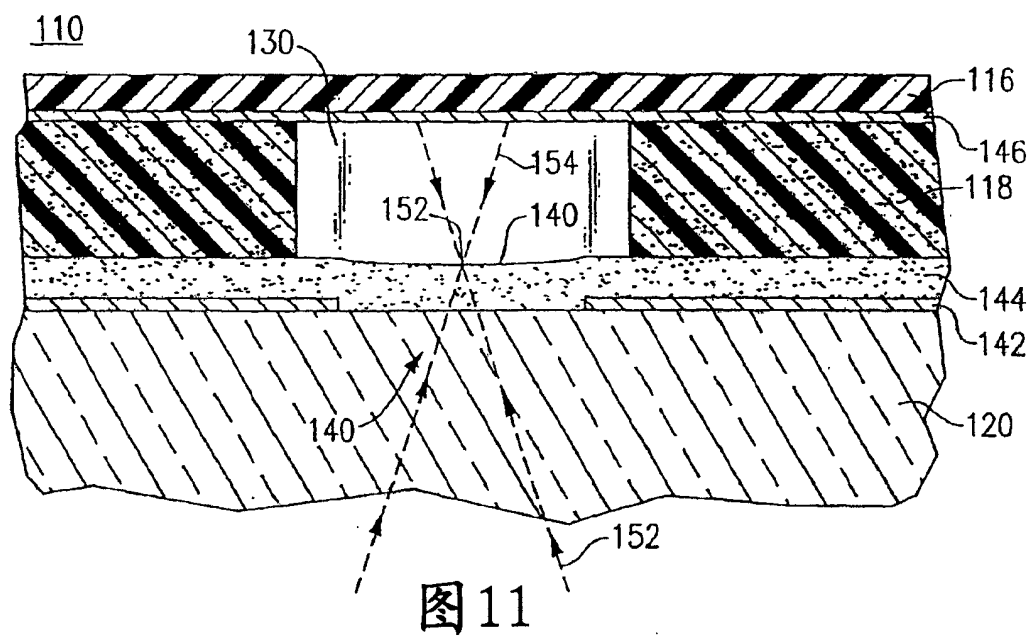
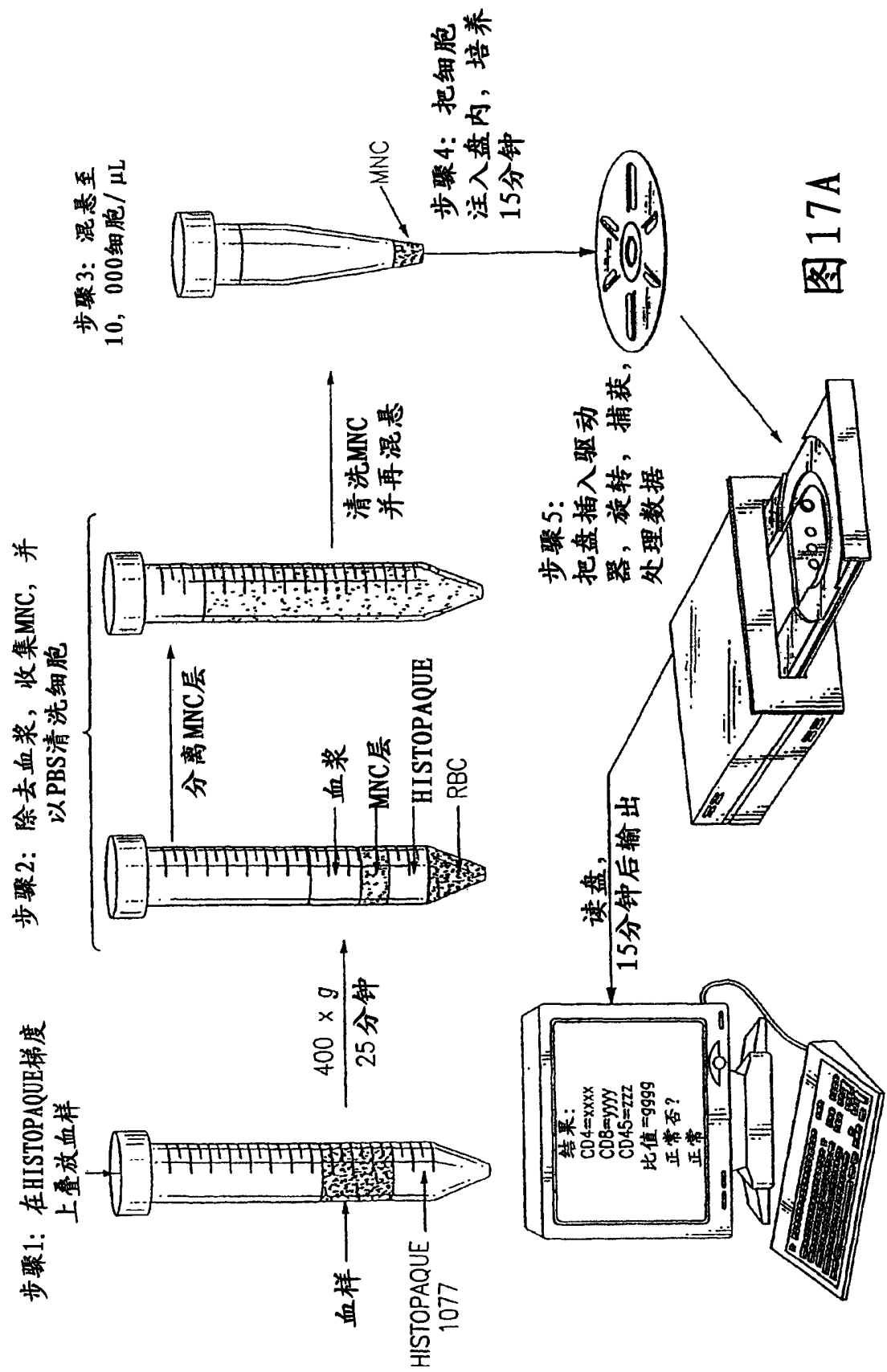


图10





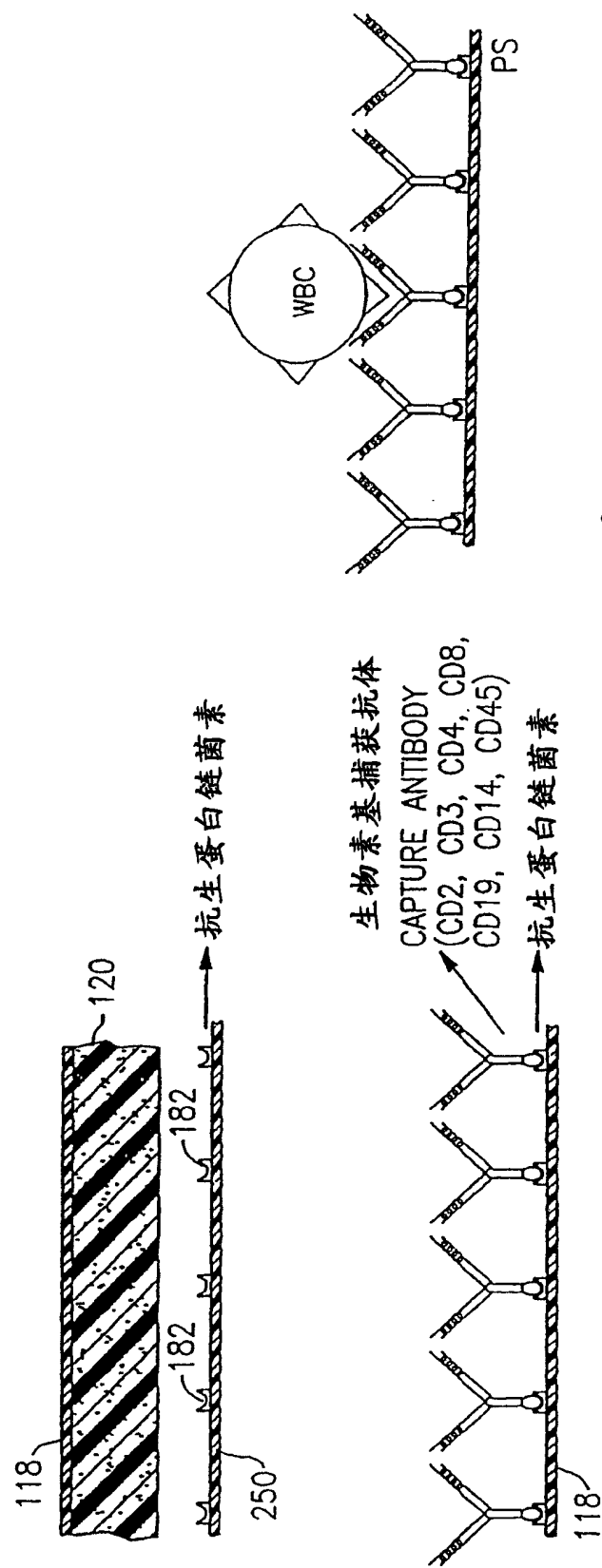


图17B

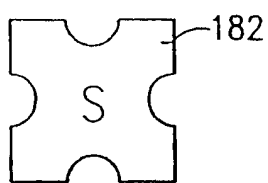


图 18A

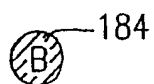


图 18B

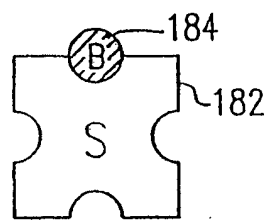


图 18C

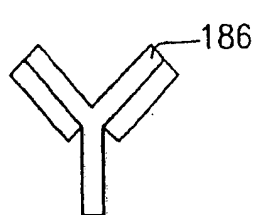


图 18D

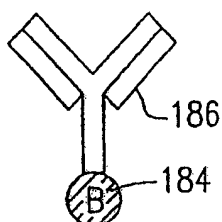


图 18E

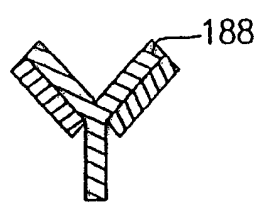


图 18F

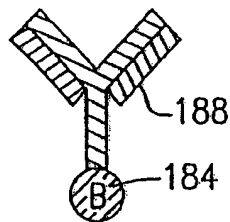


图 18G

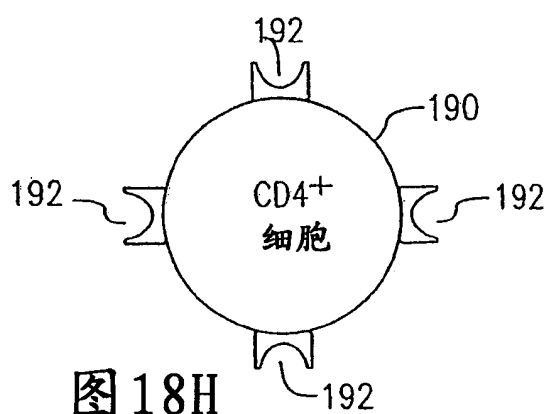


图 18H

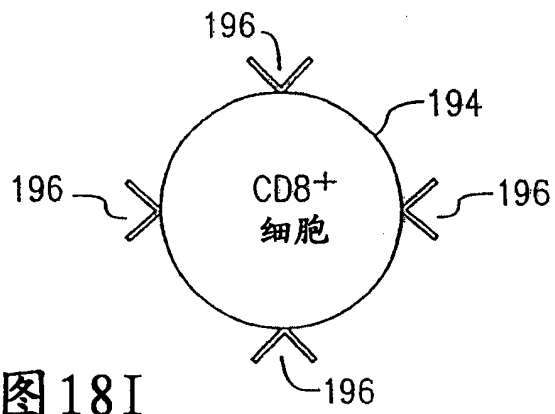


图 18I

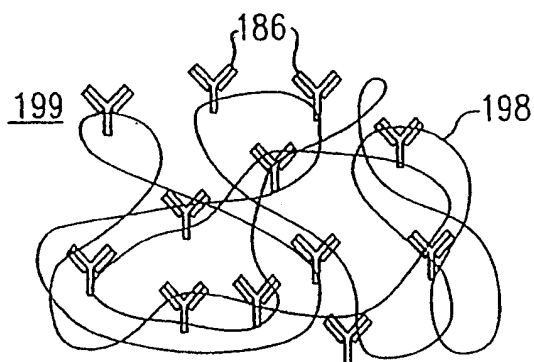


图 18J

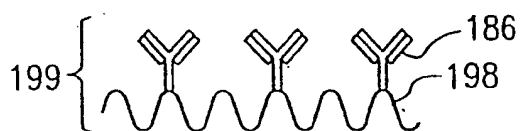


图 18K

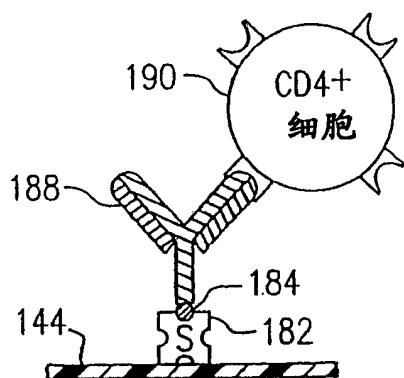


图 19A

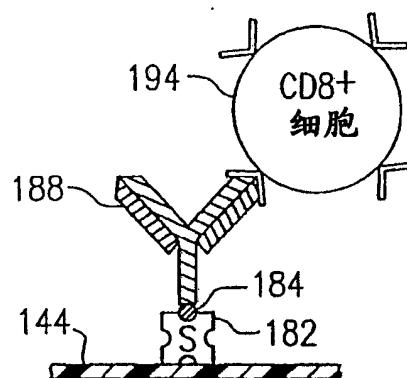


图 19B

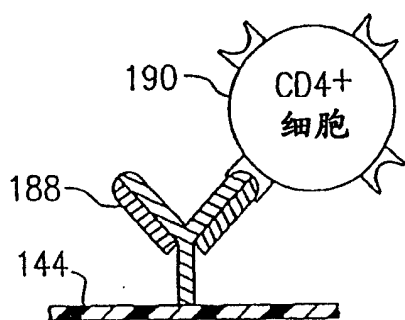


图 19C

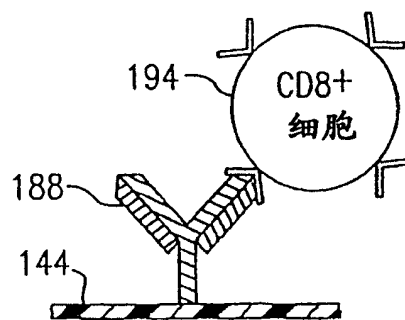


图 19D

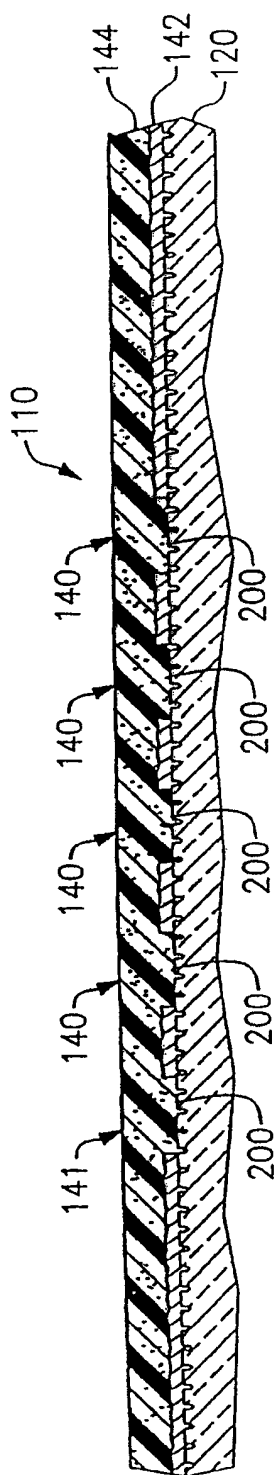


图 20A

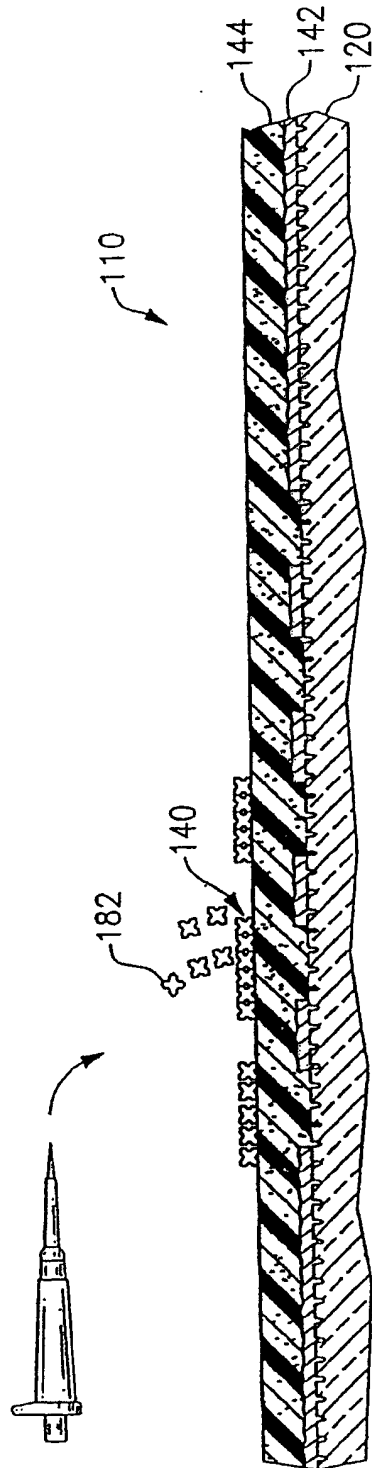


图 20B

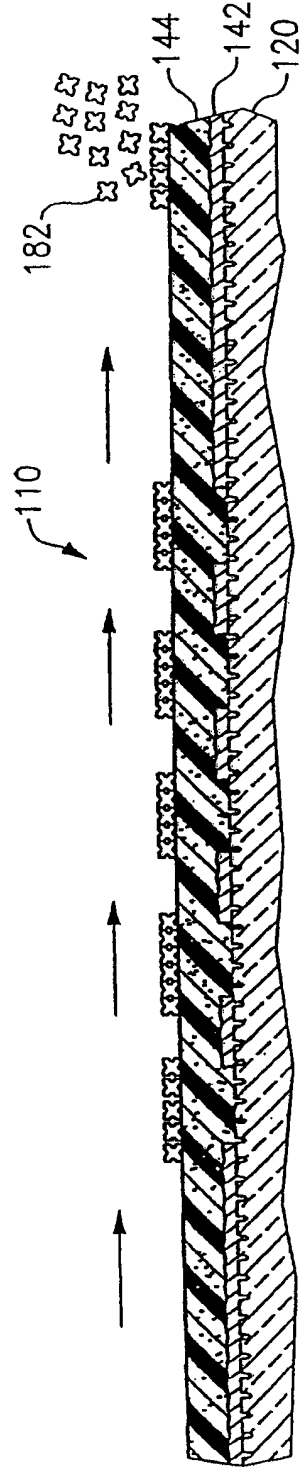


图 20C

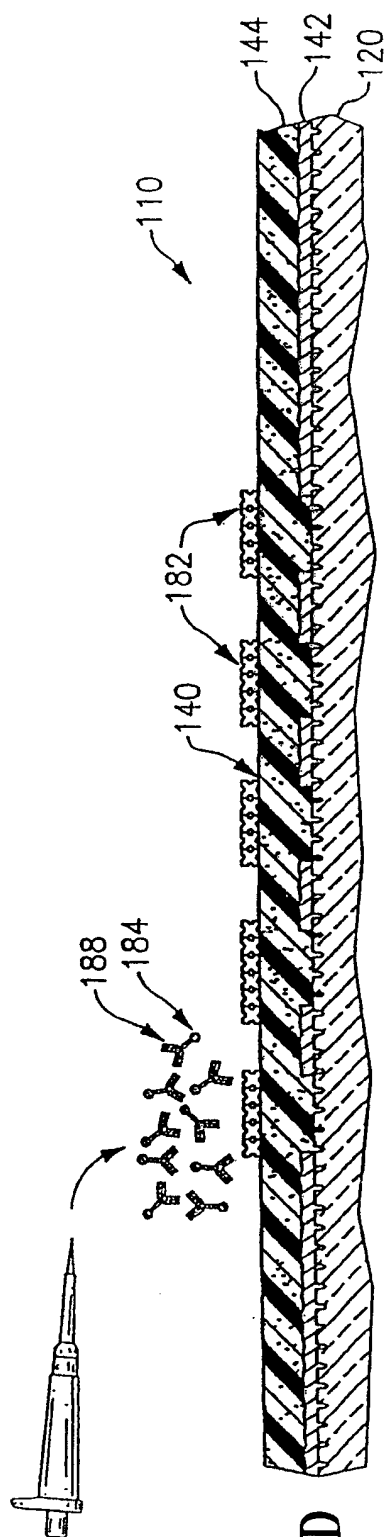


图 20D

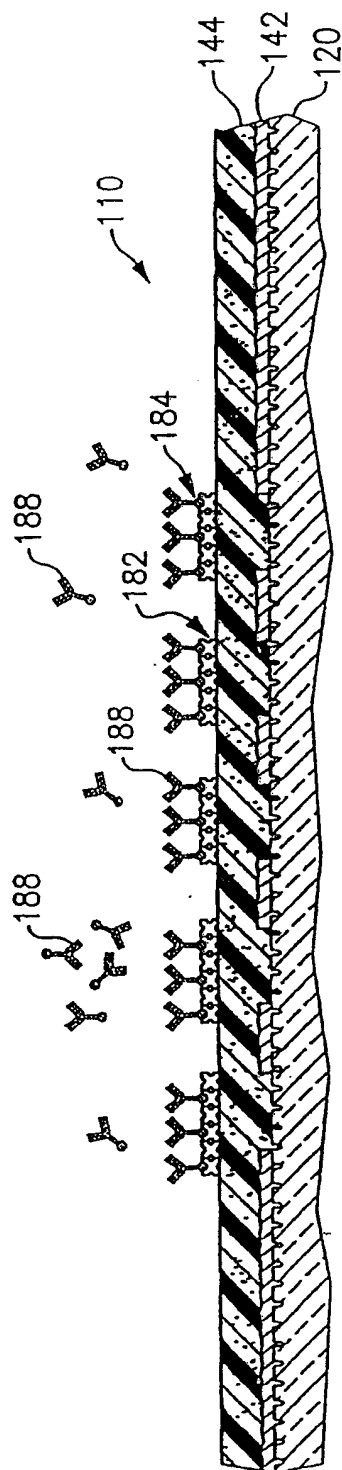


图 20E

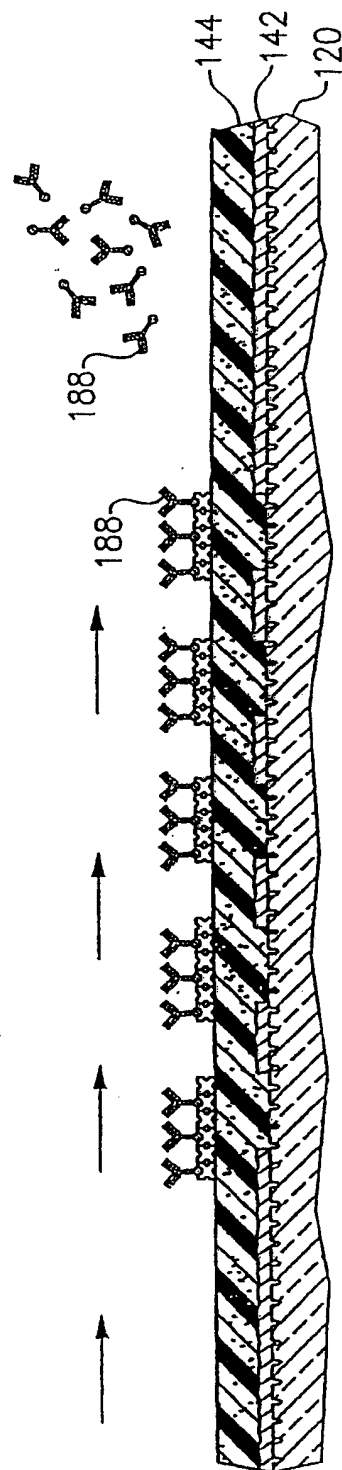


图 20F

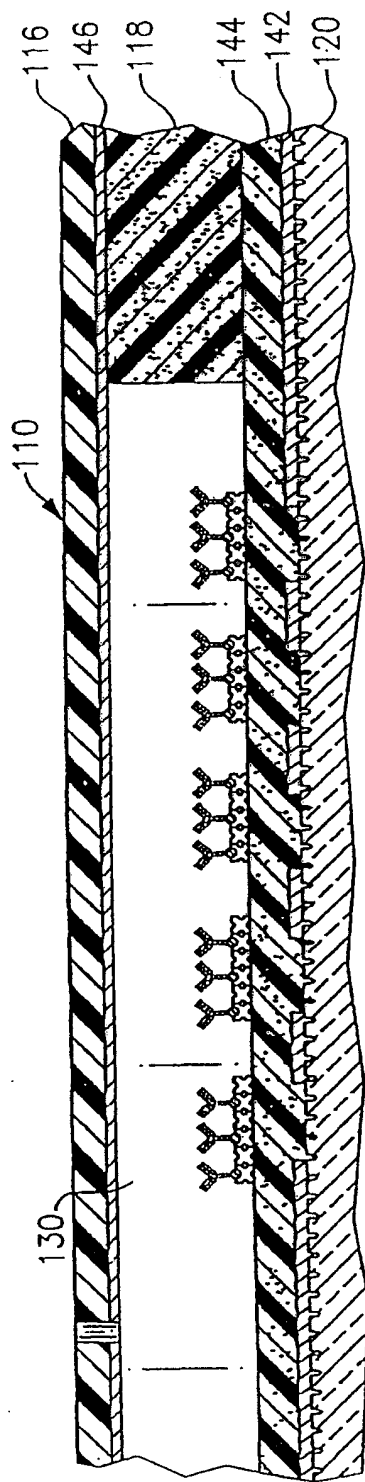


图 20G

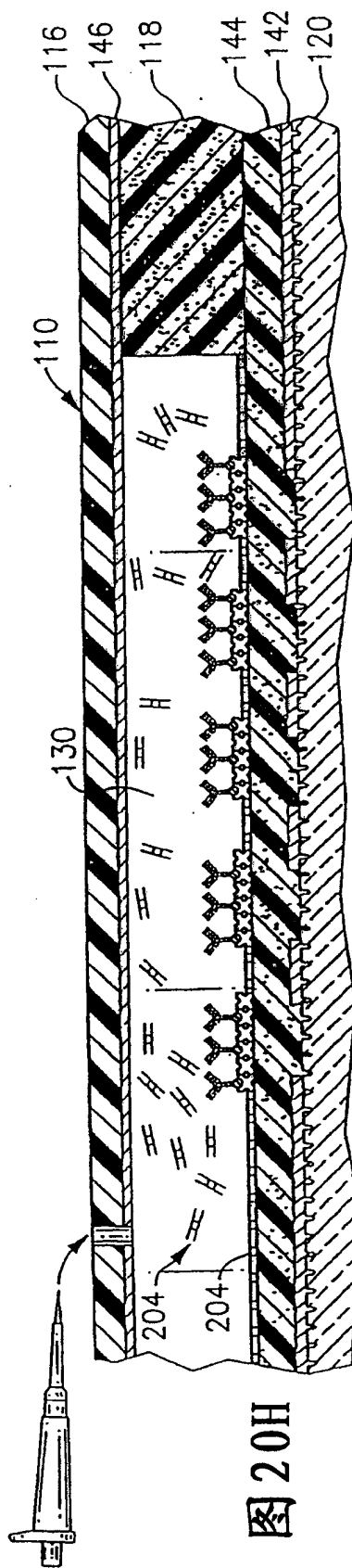


图 20H

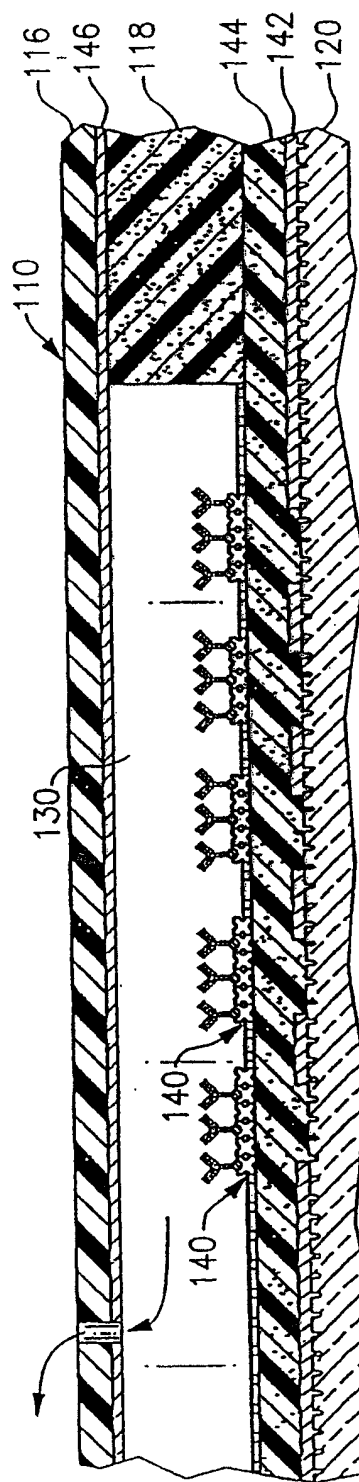


图 20I

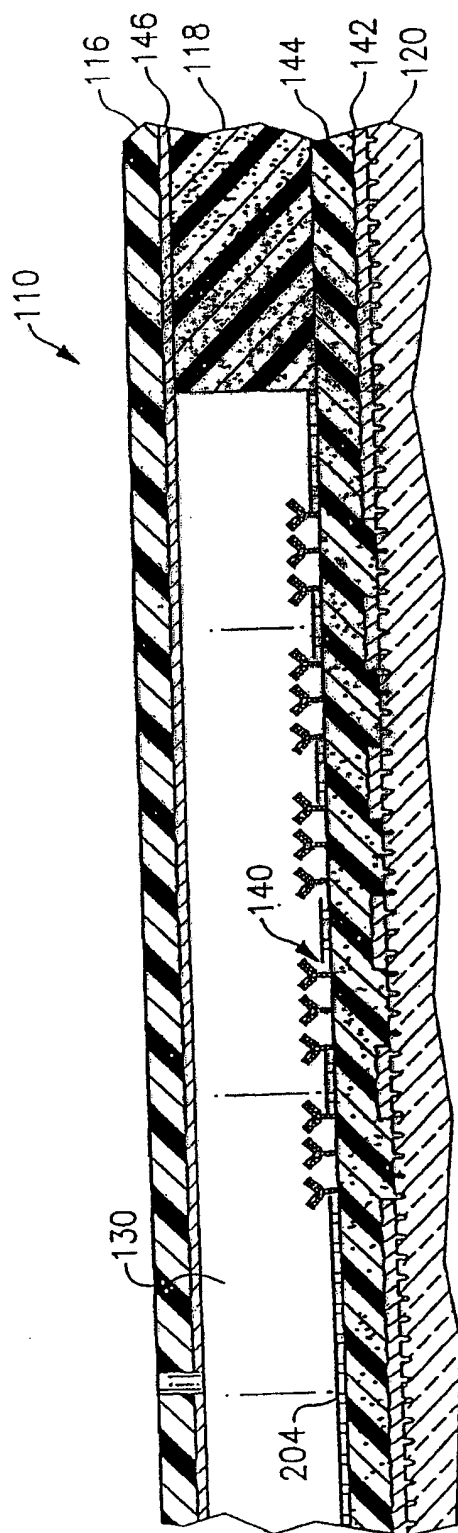


图 21

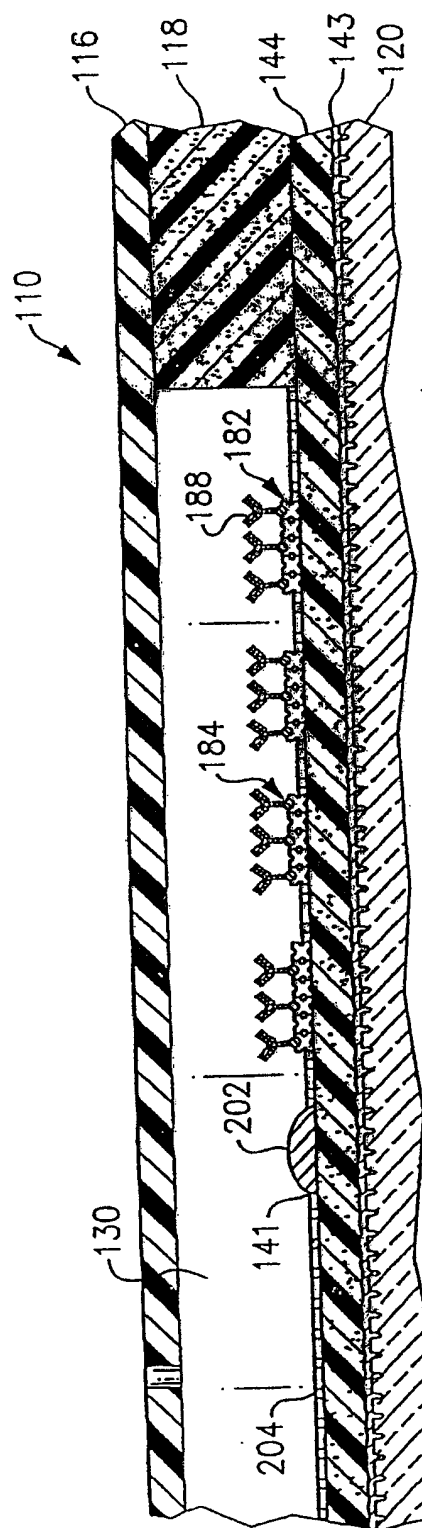


图 22

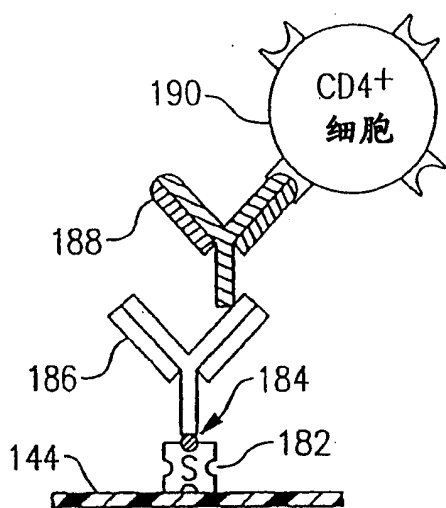


图 23A

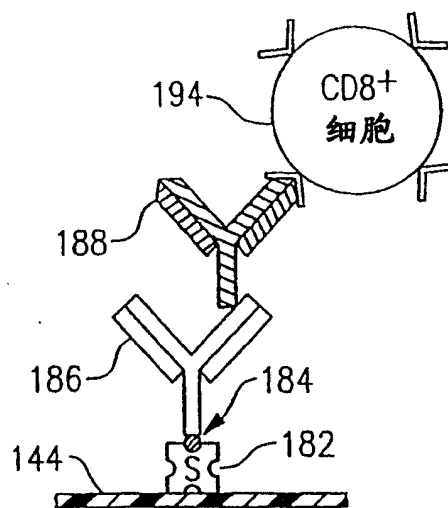


图 23B

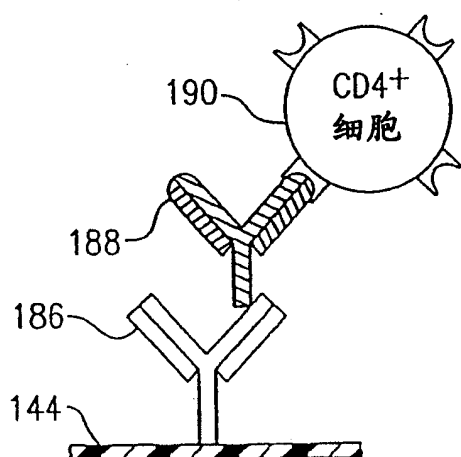


图 23C

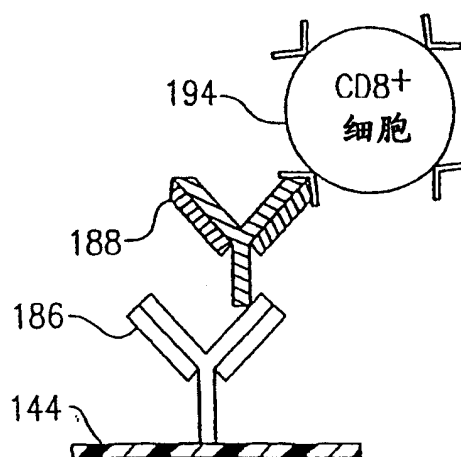


图 23D

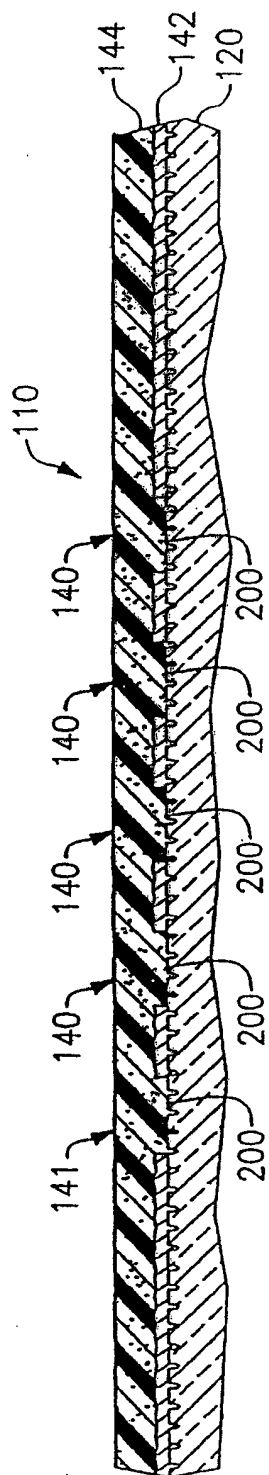


图 24A

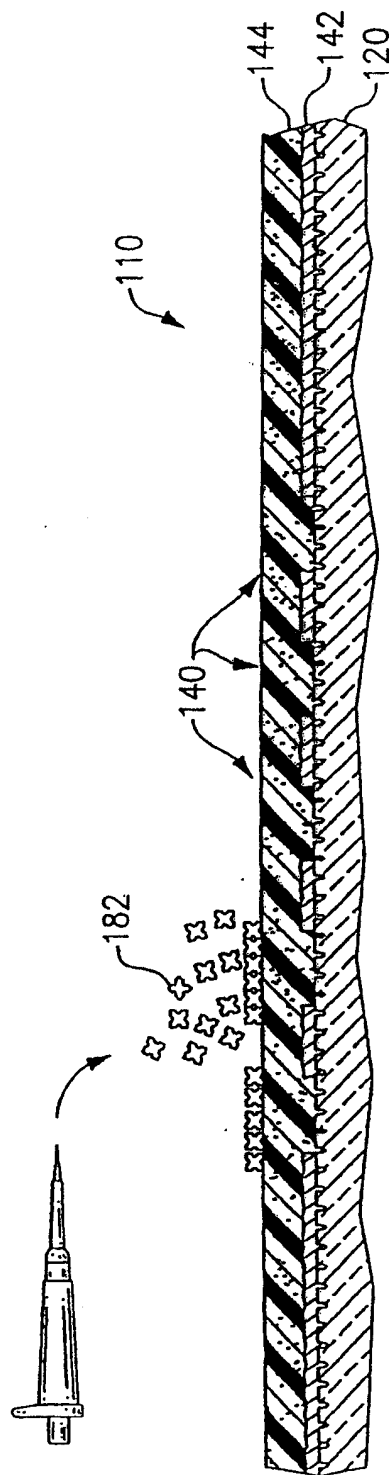


图 24B

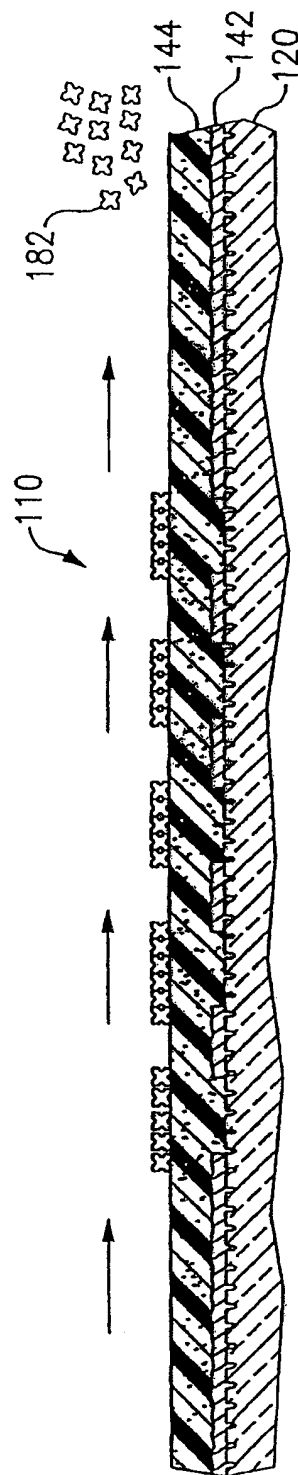


图 24C

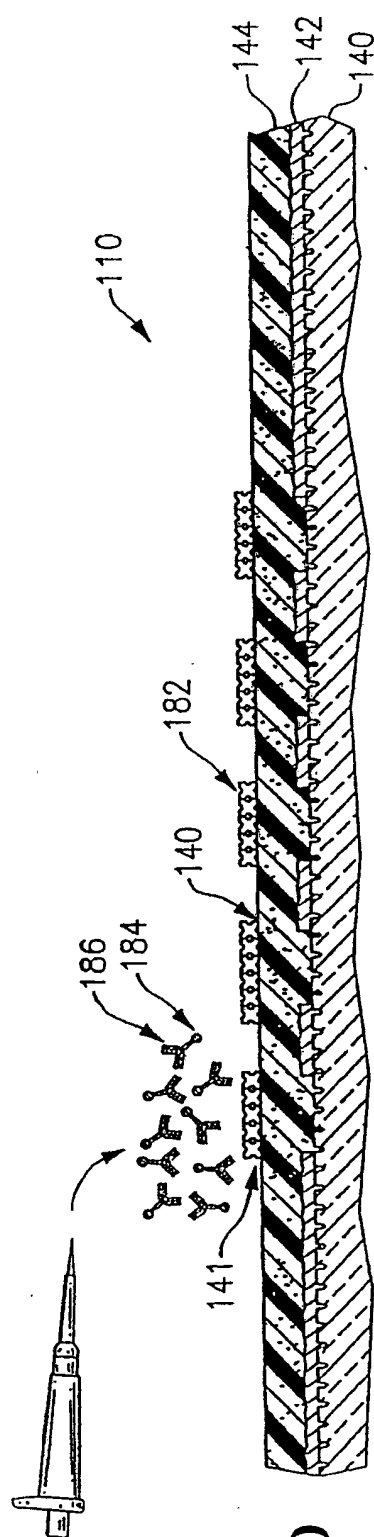


图 24D

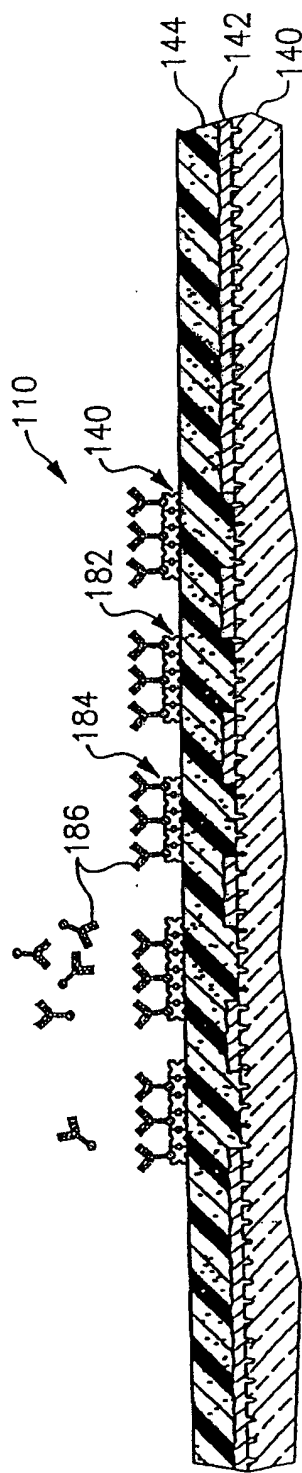


图 24E

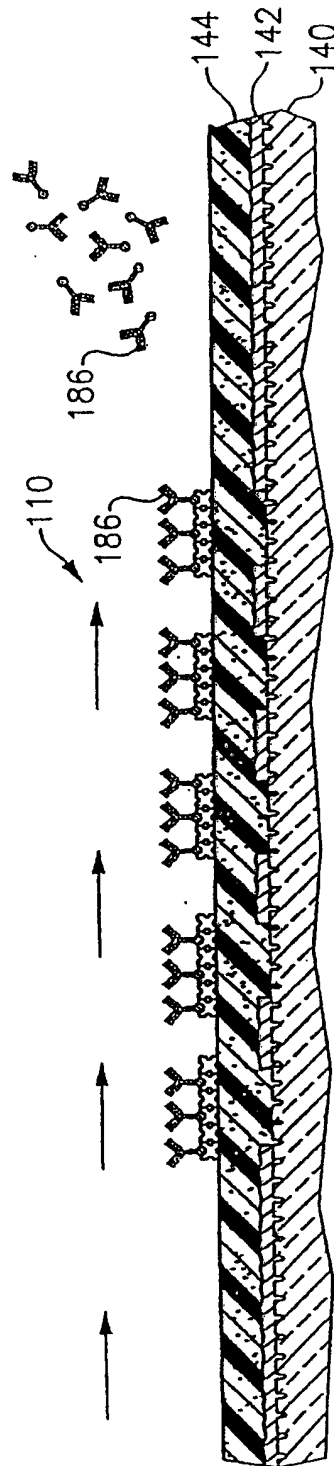


图 24F

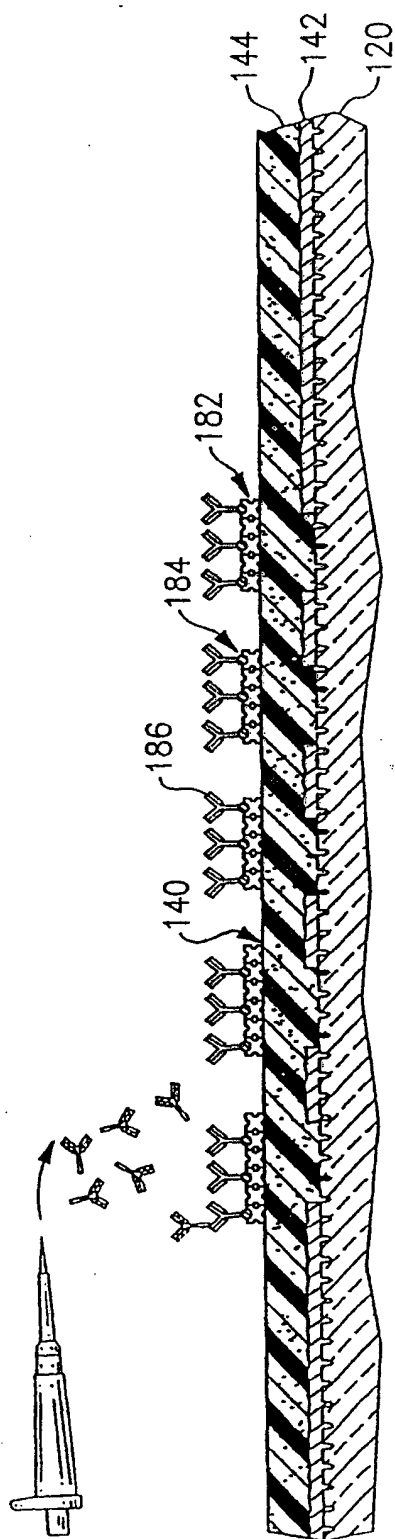


图24G

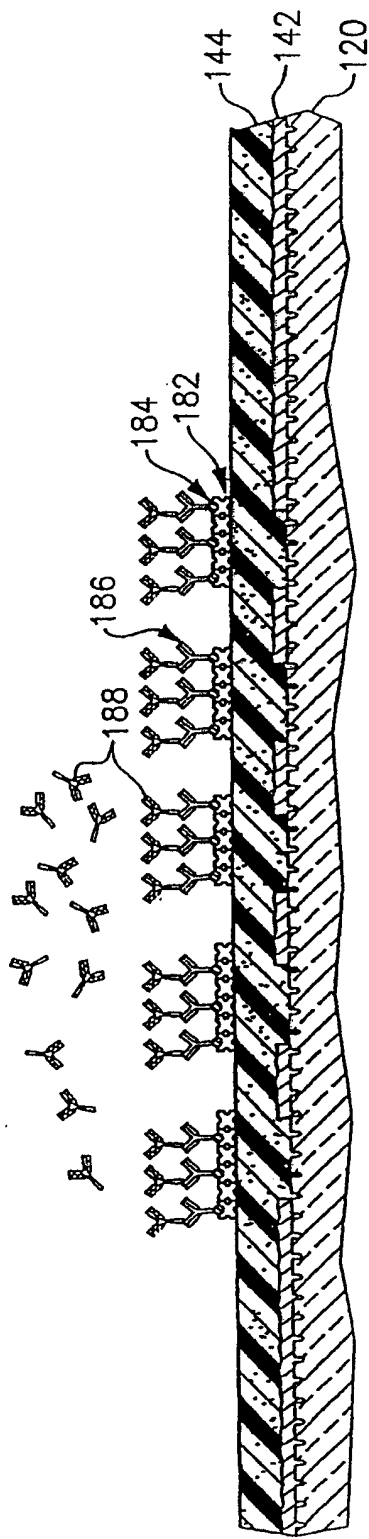


图24H

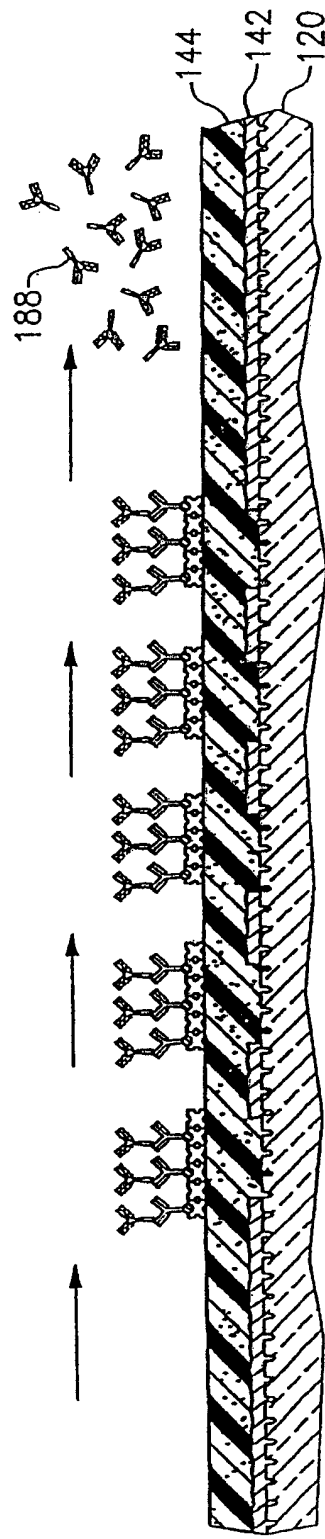


图24I

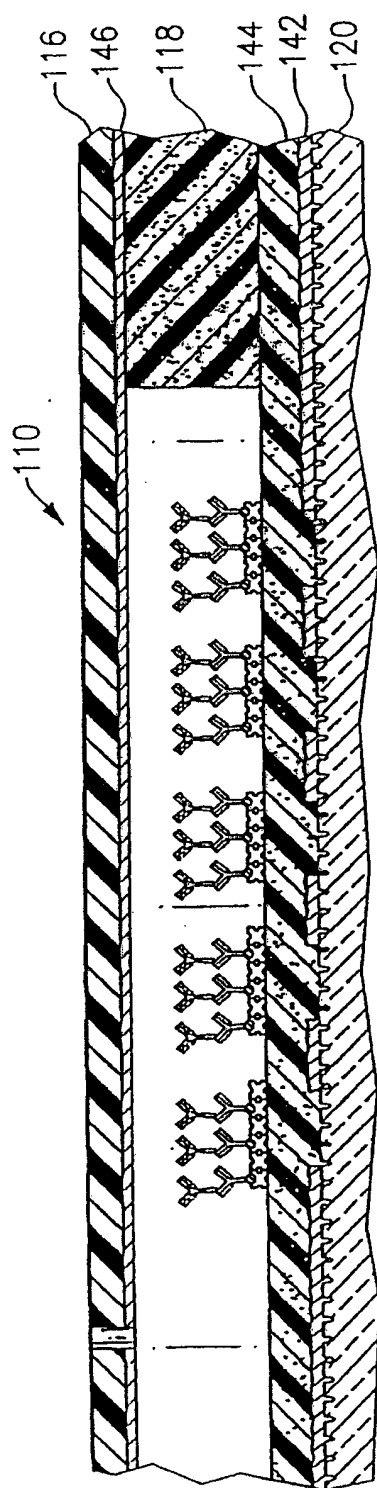


图 24J

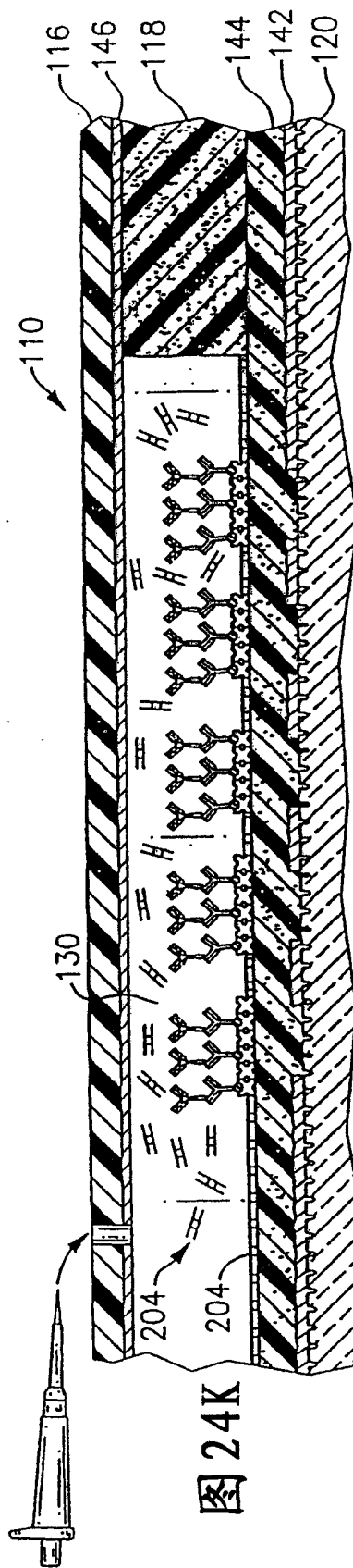


图 24K

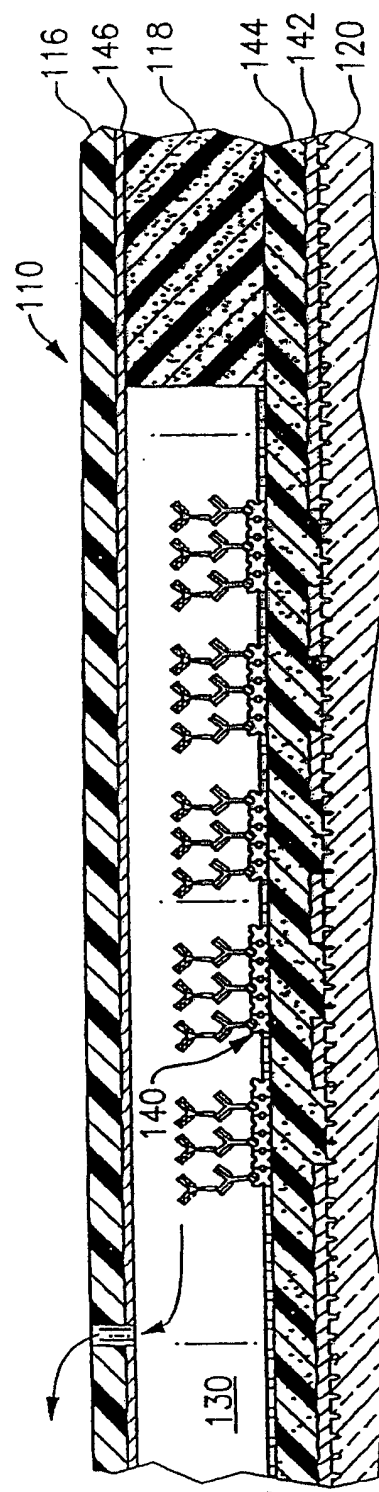


图 24L

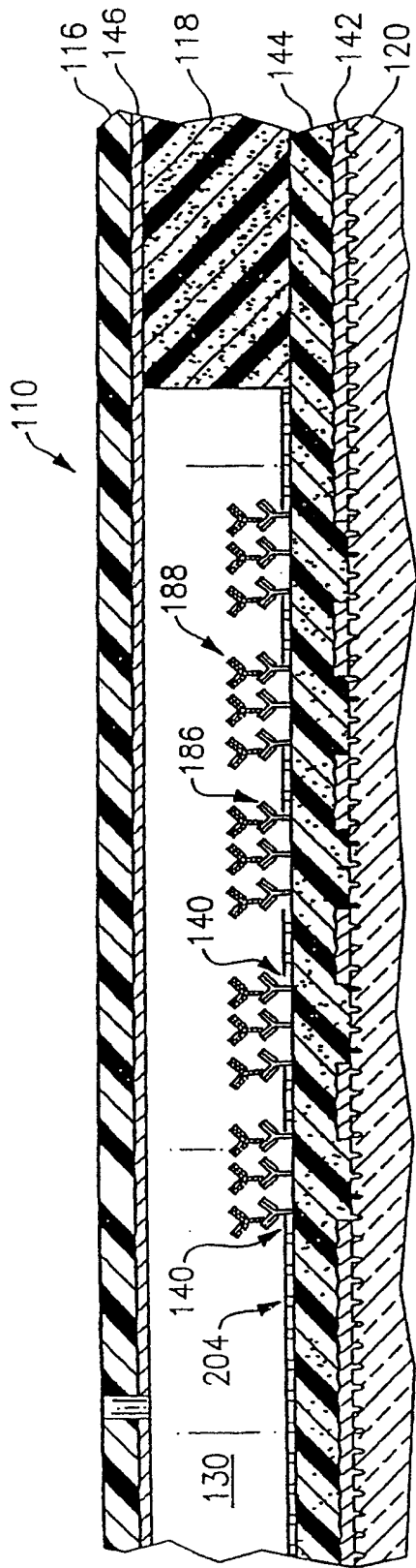


图 25

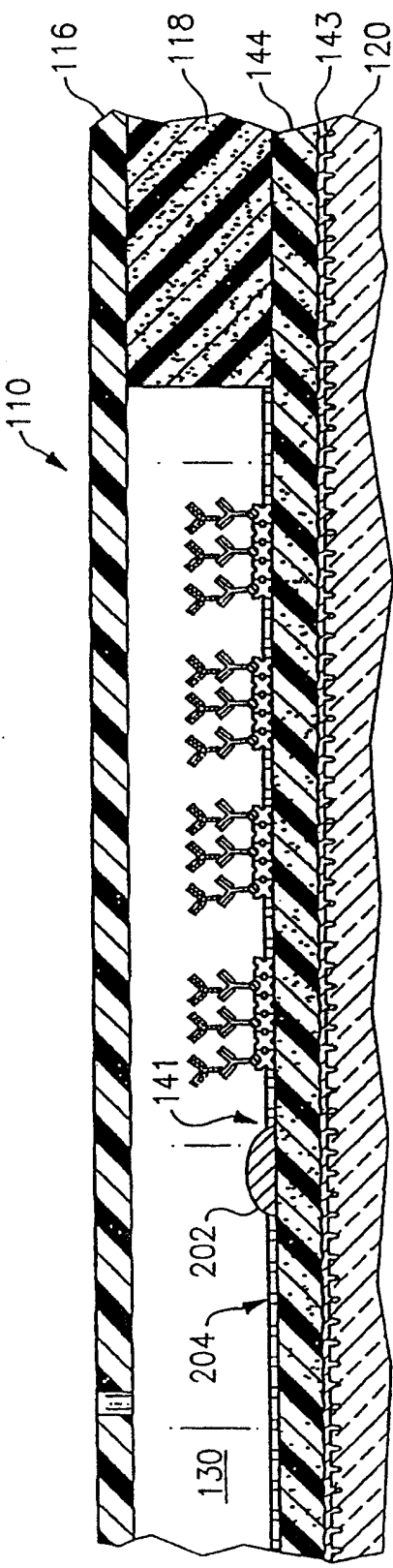


图 26

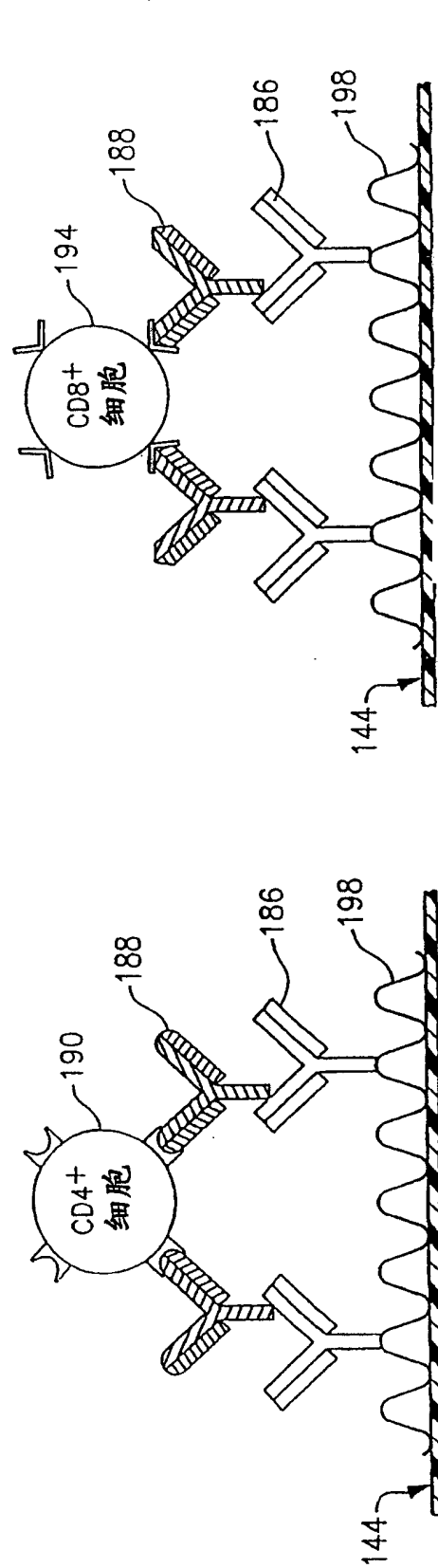


图 27A

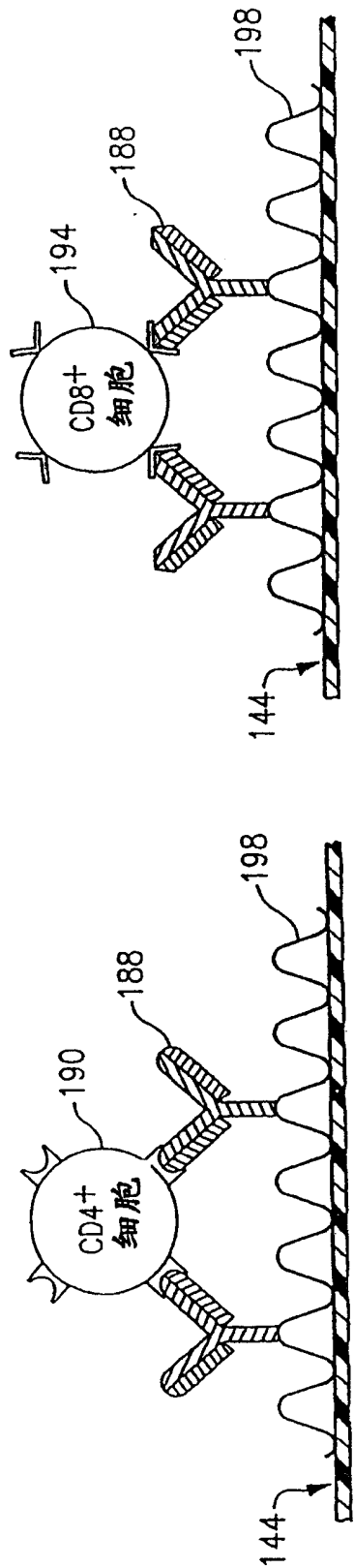


图 27B

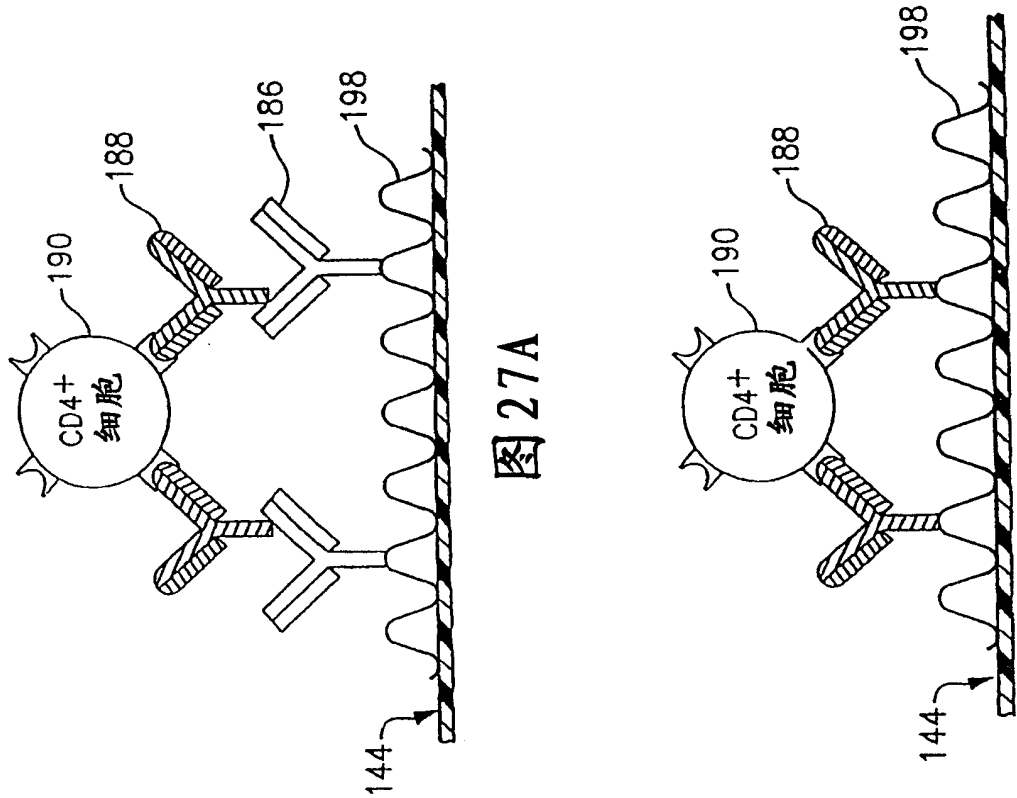


图 27C

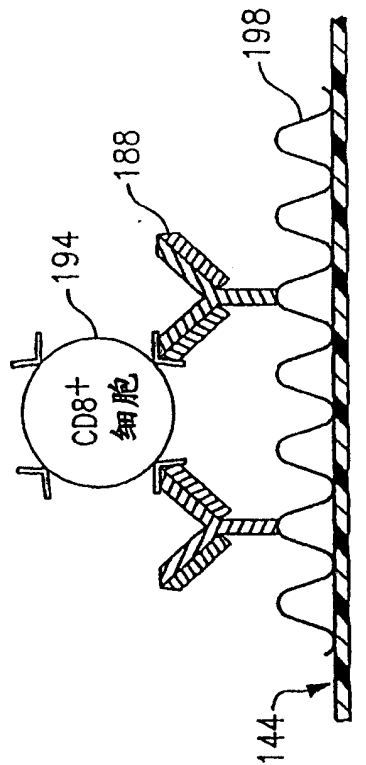


图 27D

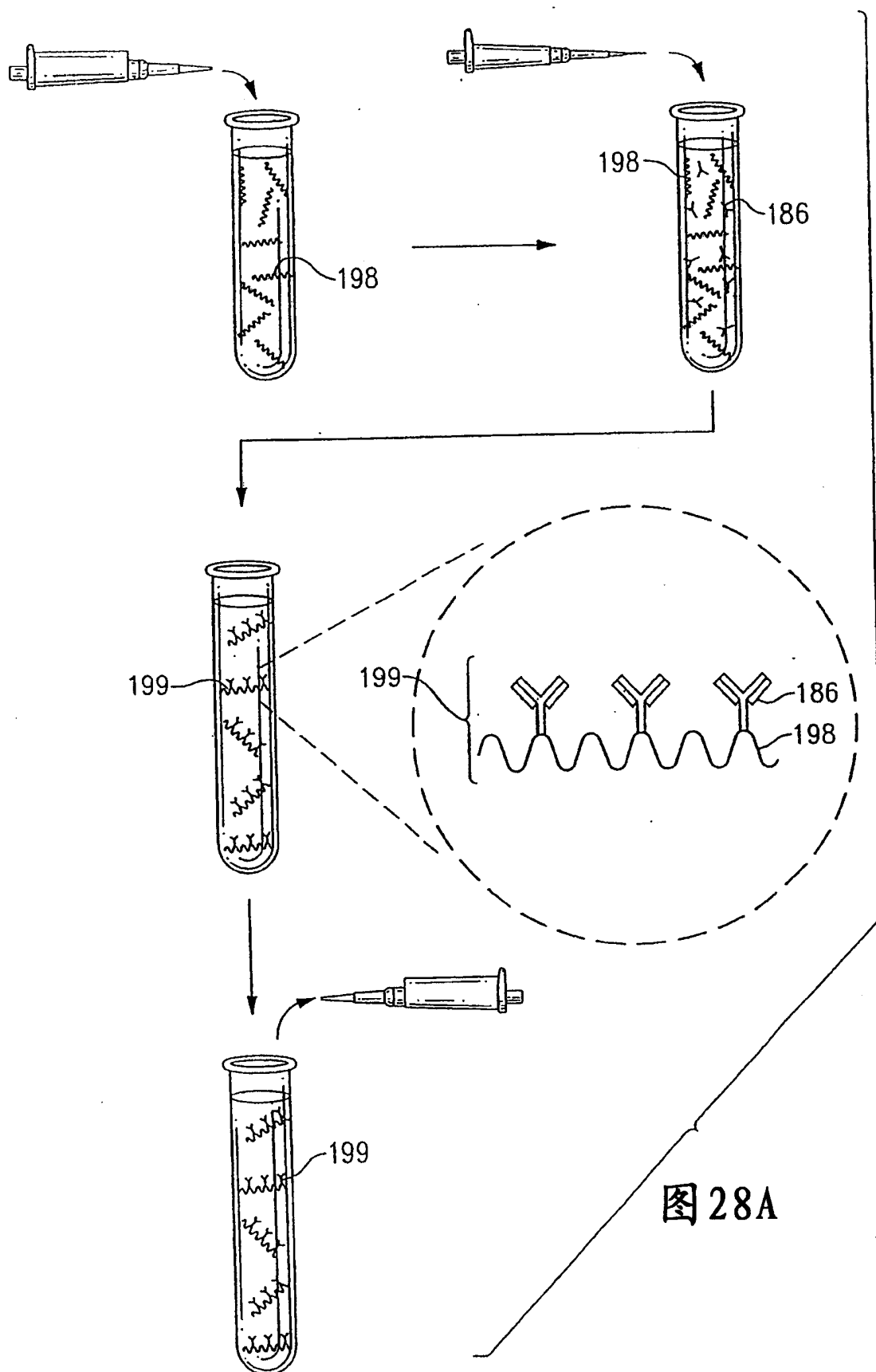


图 28A

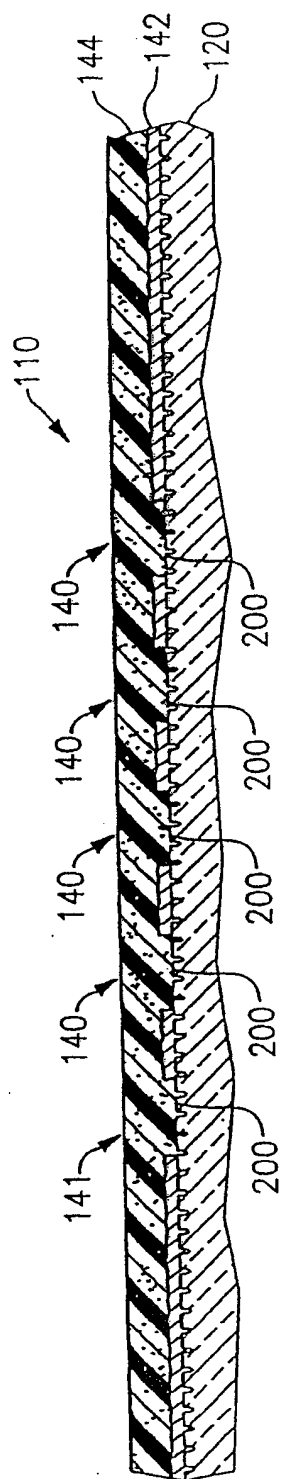


图 28B

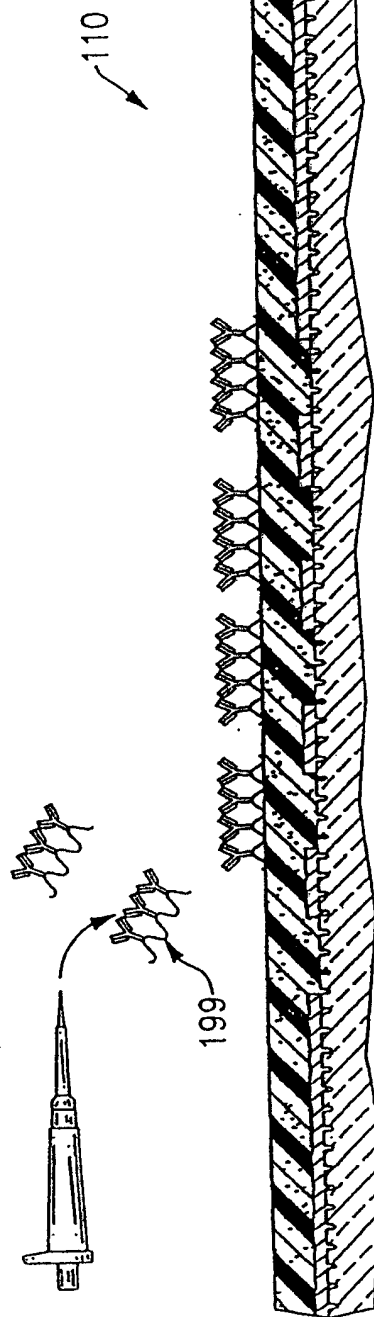


图 28C

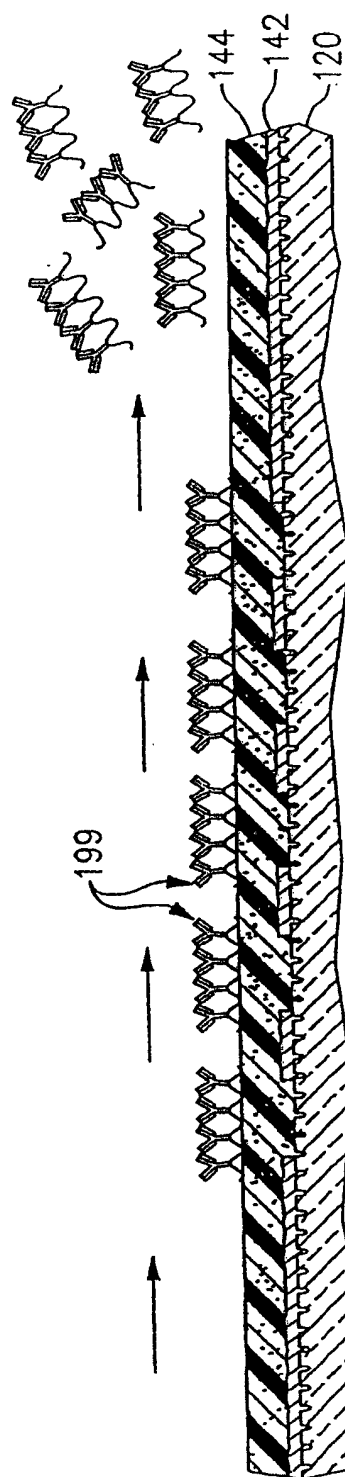


图 28D

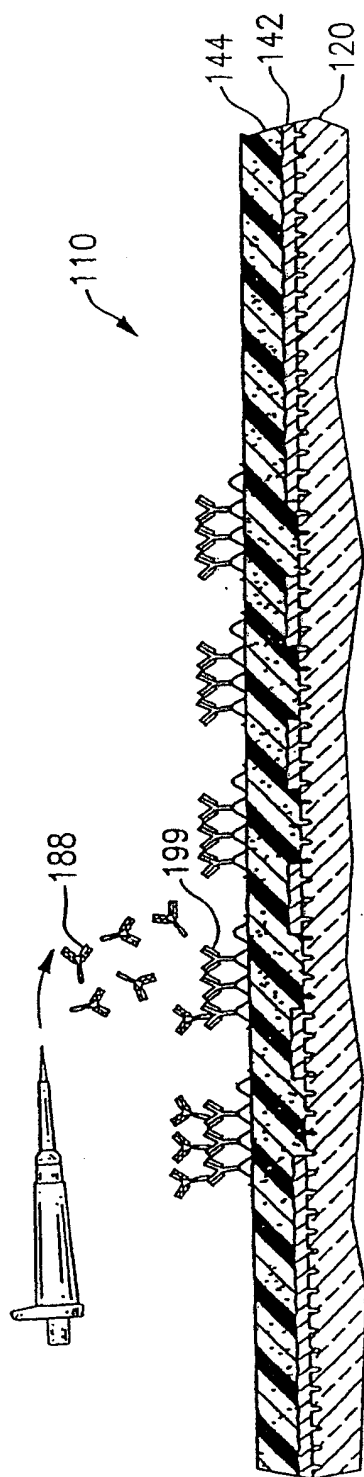


图 28E

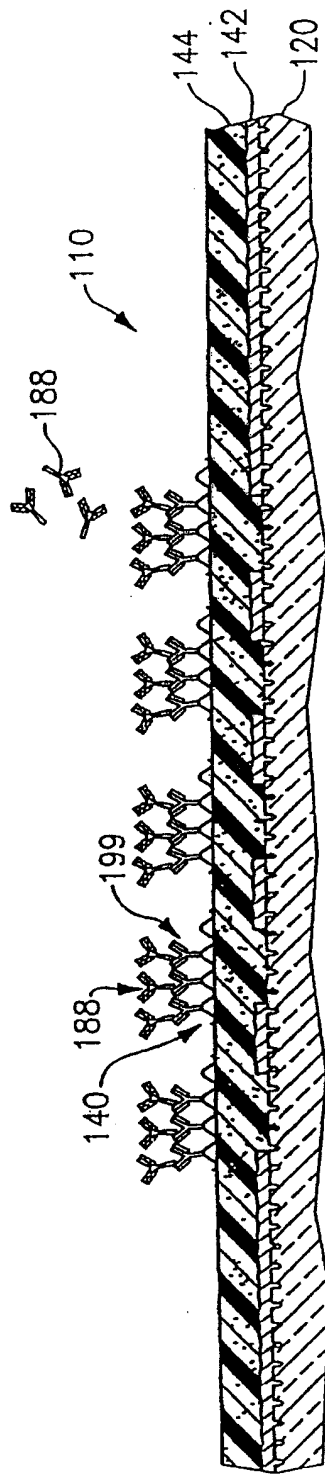


图 28F

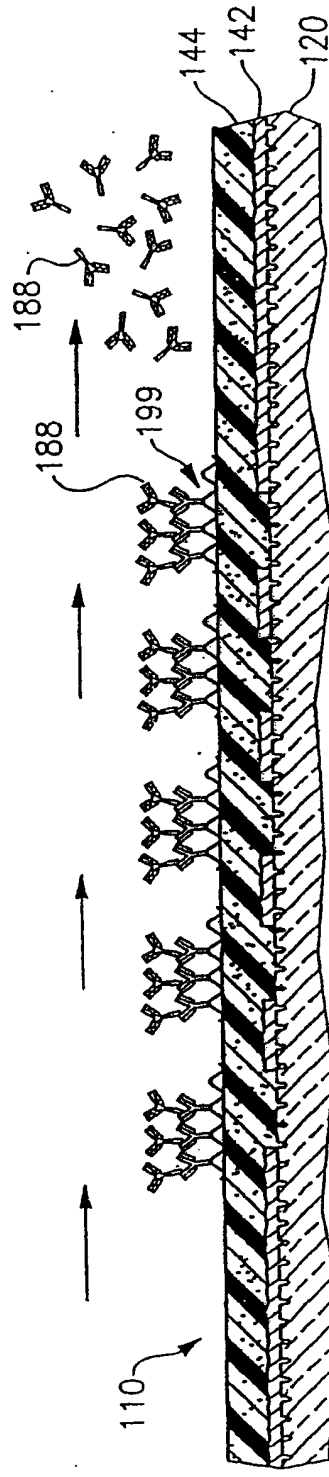


图 28G

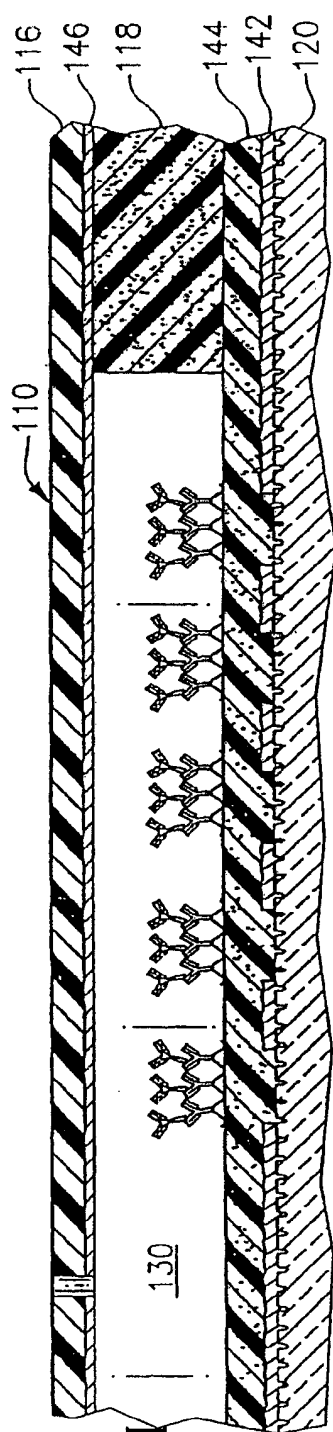


图 28H

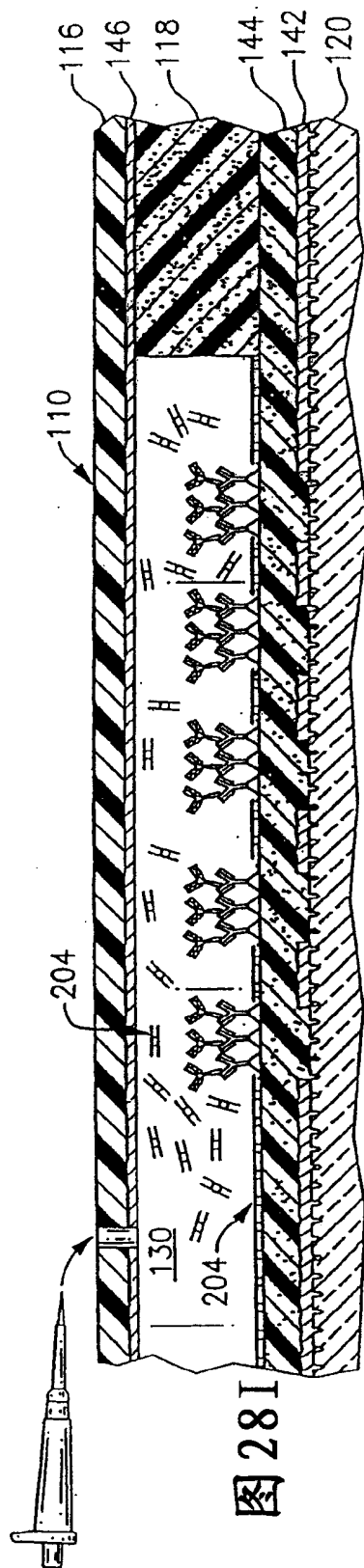


图 28I

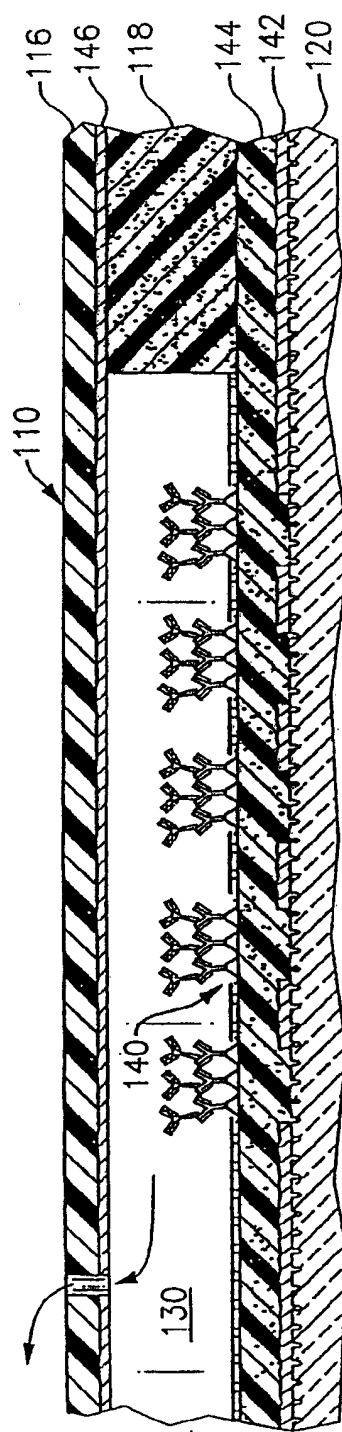


图 28J

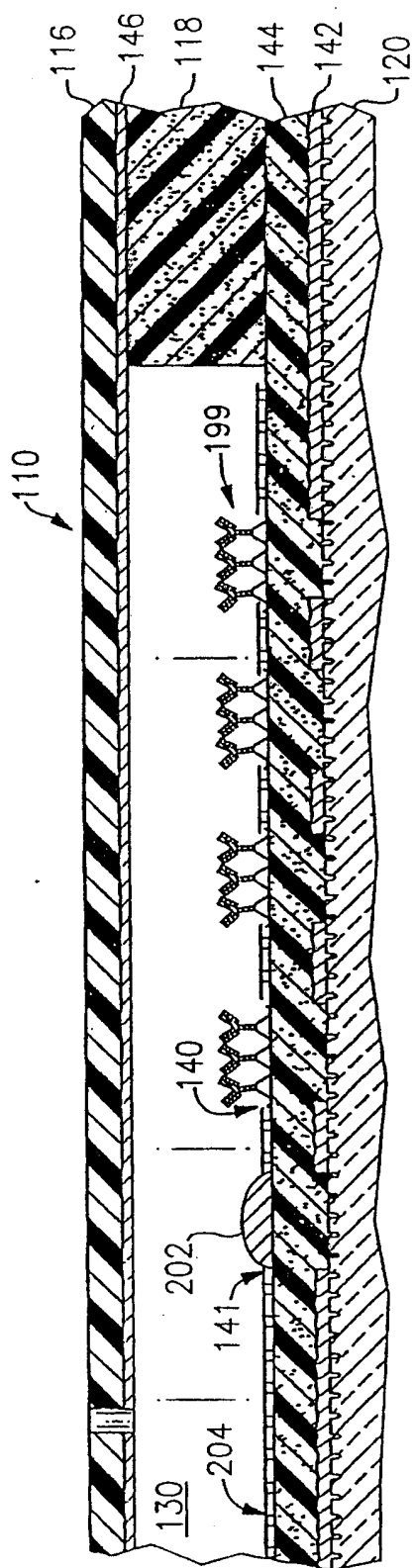


图 29

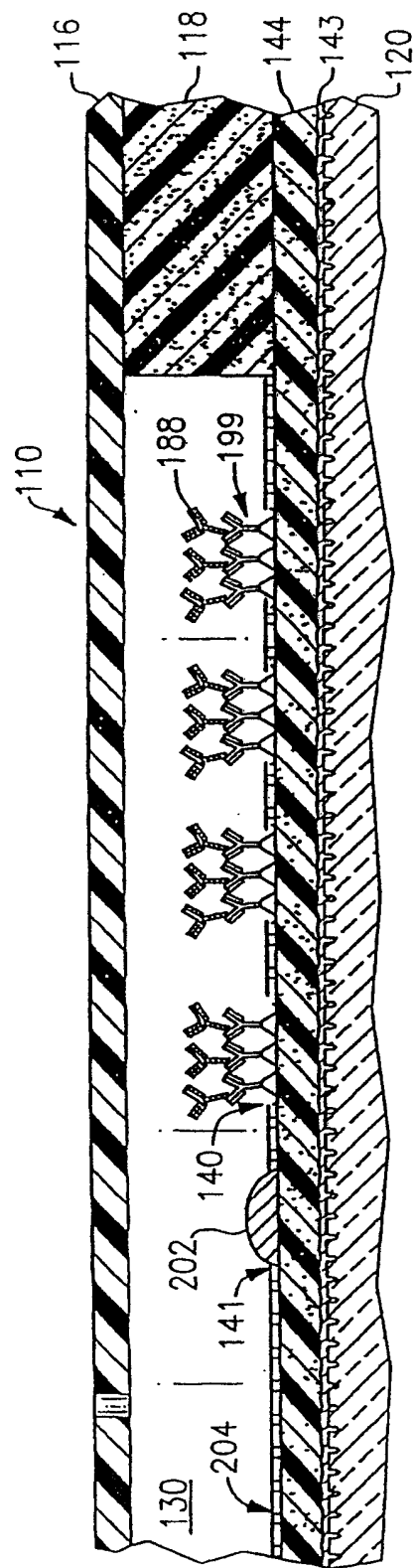


图 30

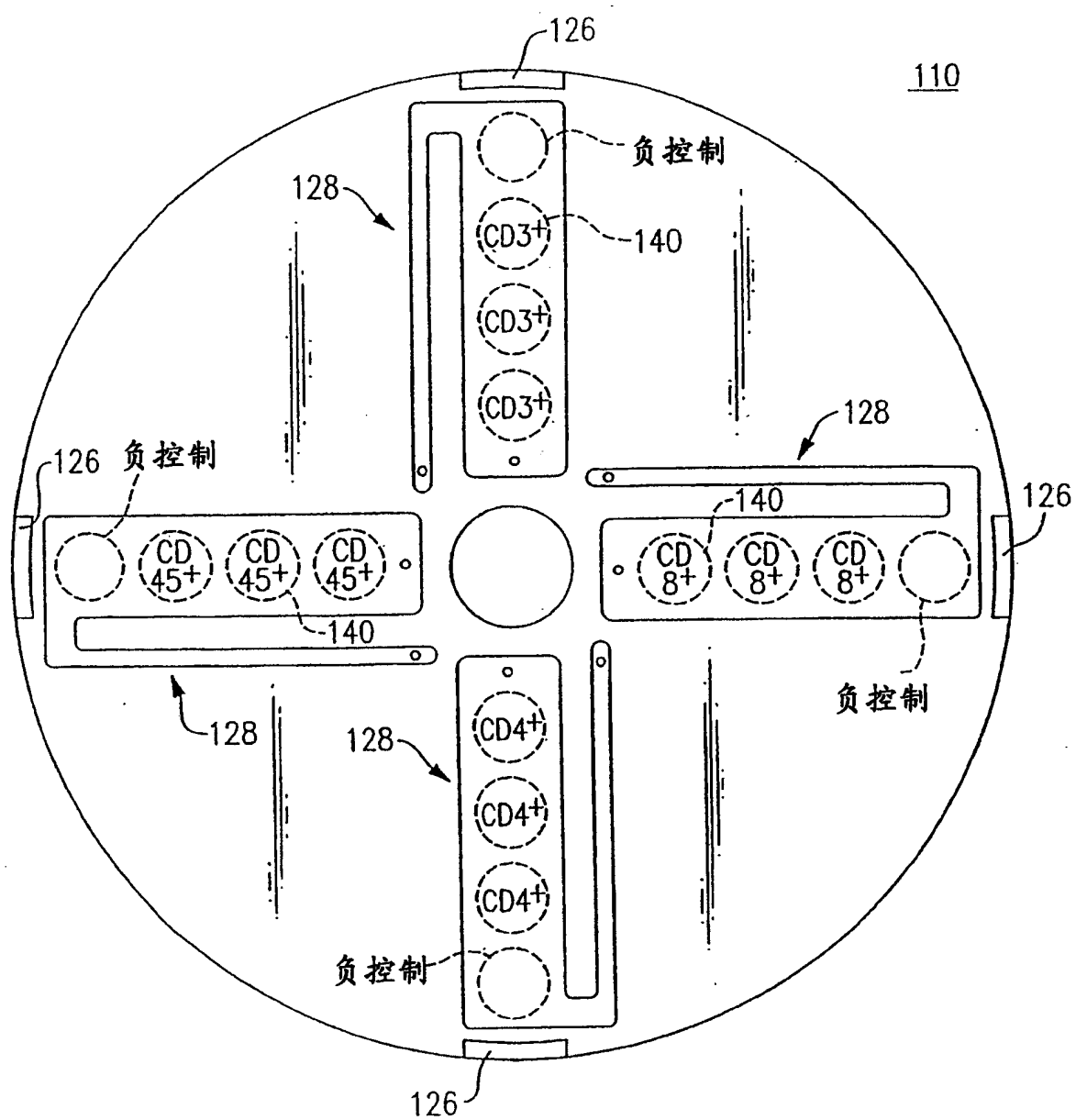


图 31A

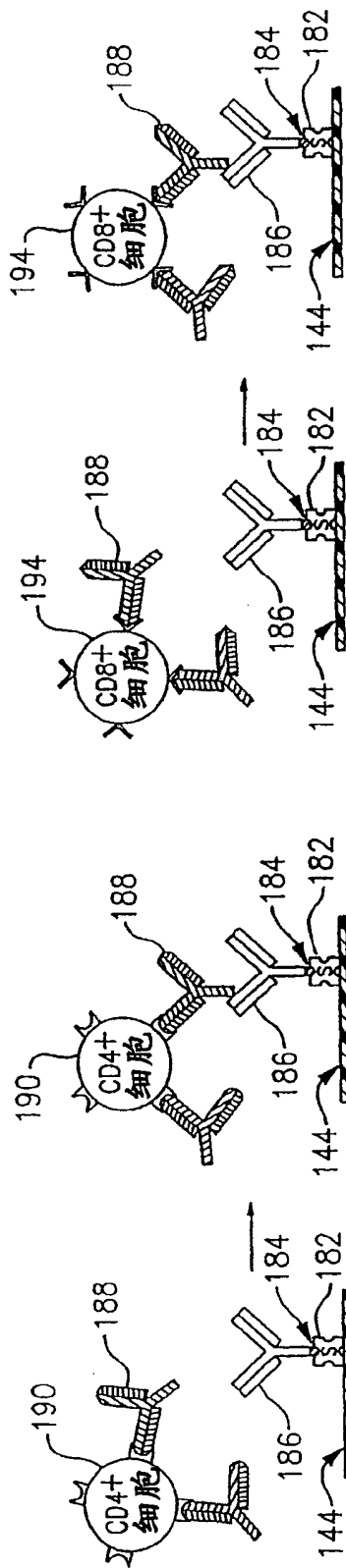


图 31B

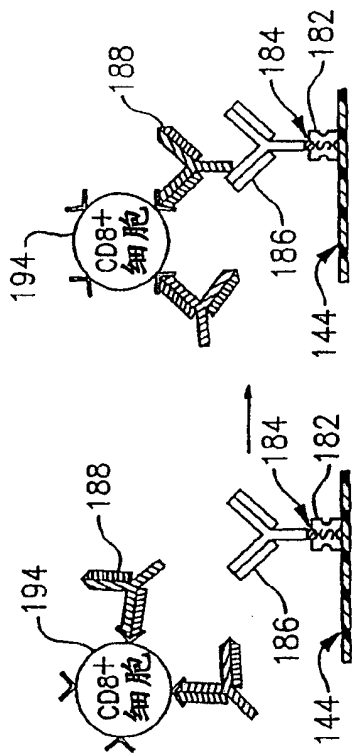


图 31C

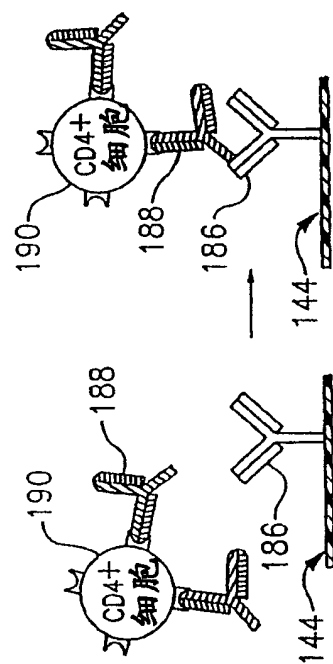


图 31D

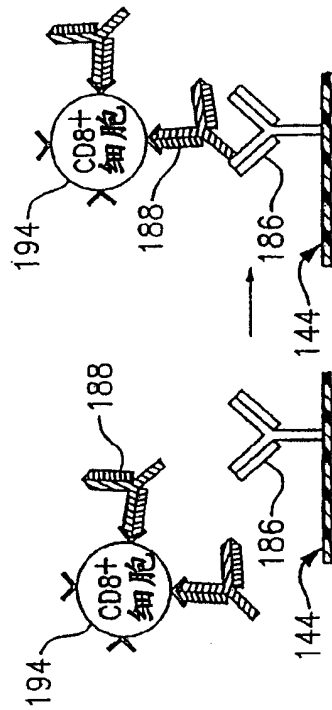


图 31E

35/69

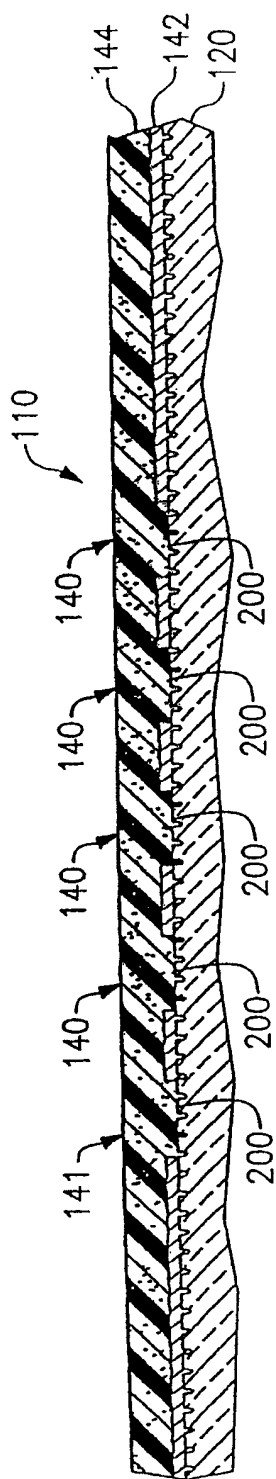


FIG. 32A

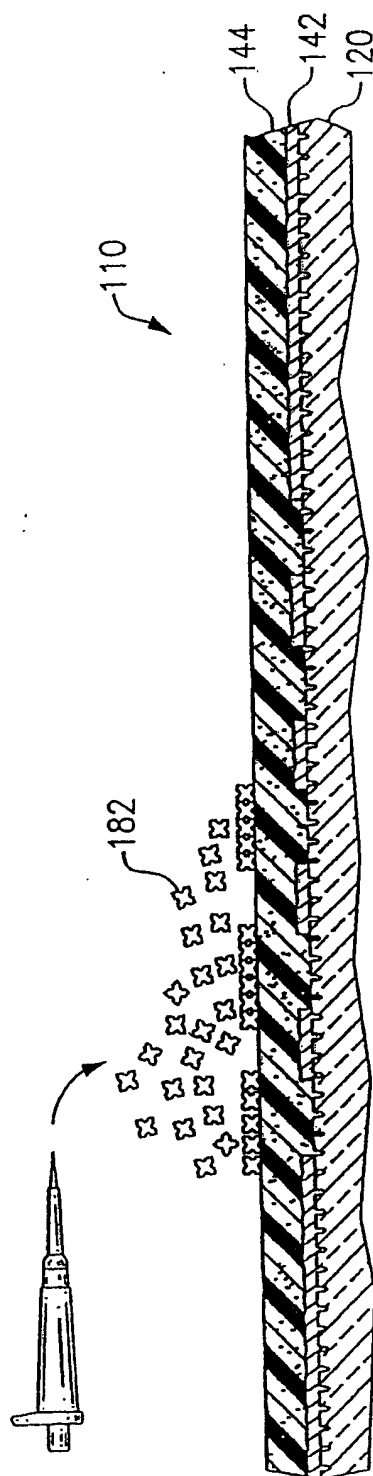


FIG. 32B

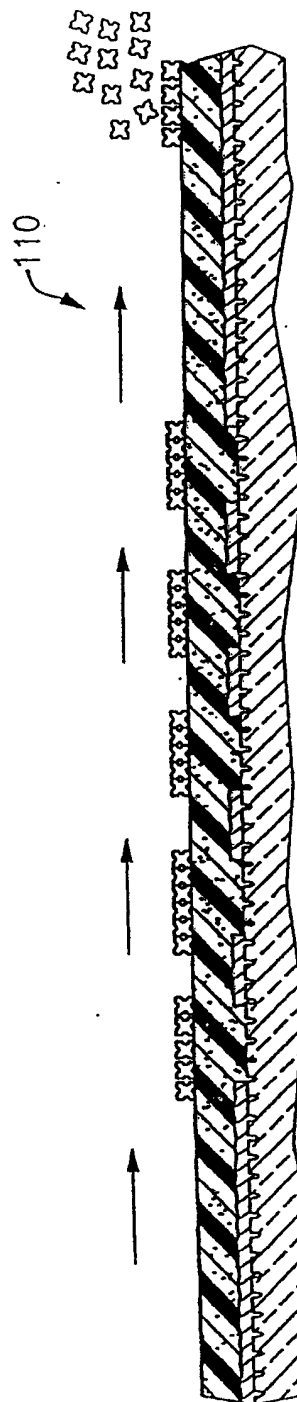


FIG. 32C

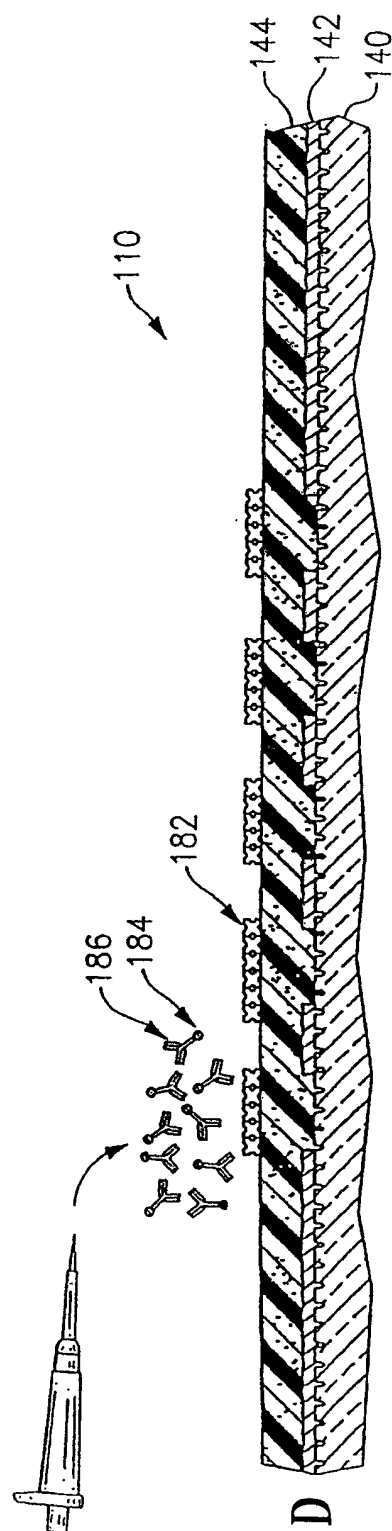


图 36D

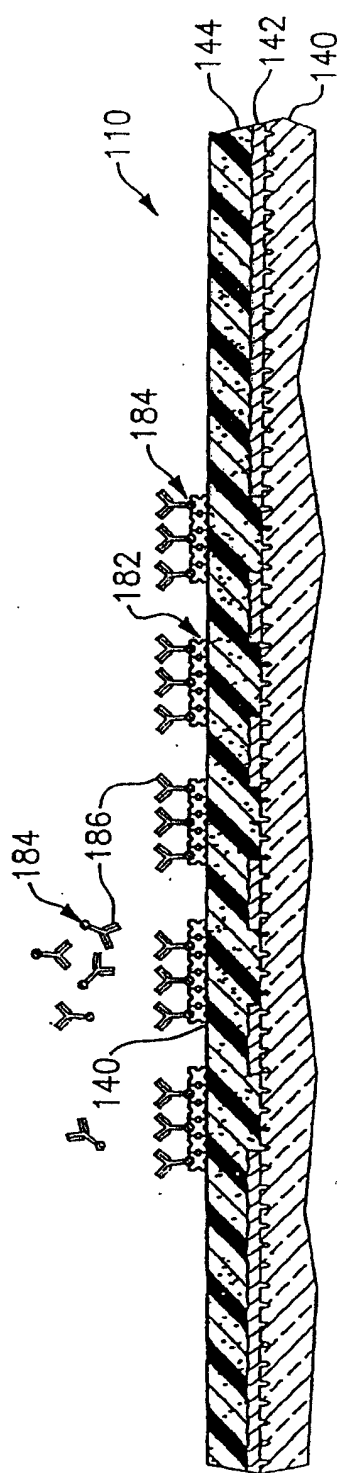


图 36E

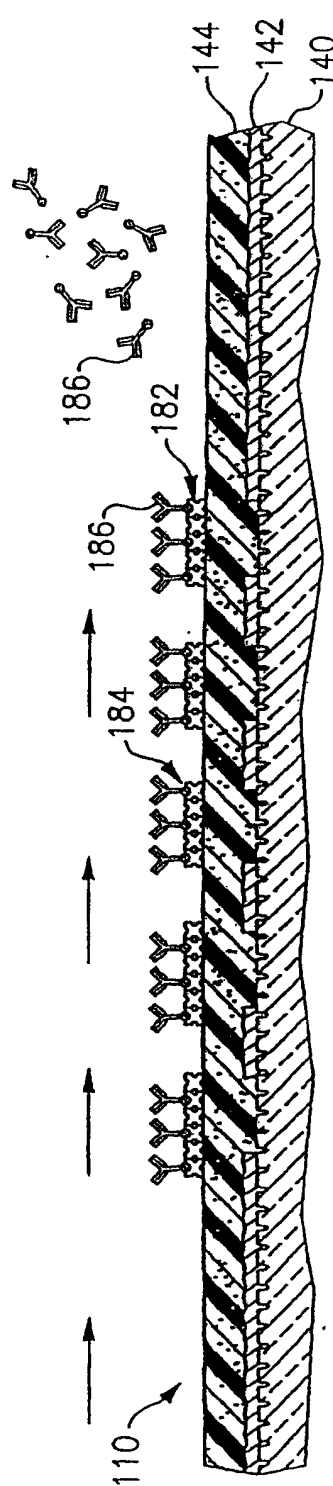


图 36F

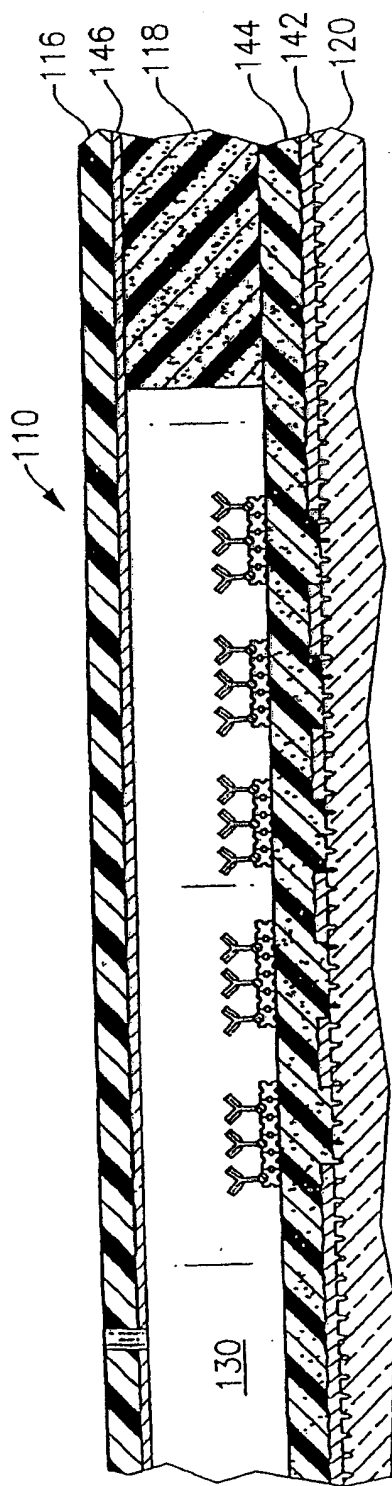


图 32G

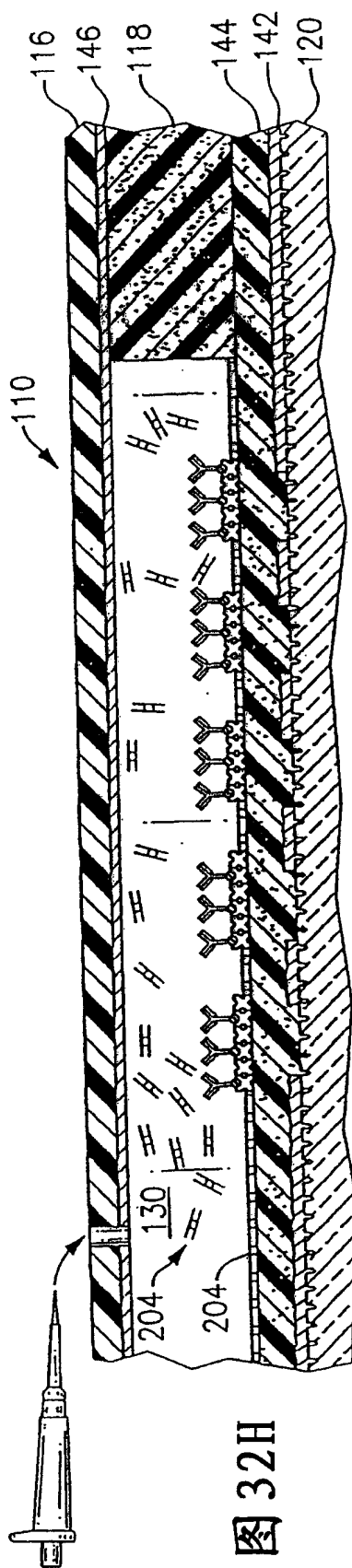


图 32H

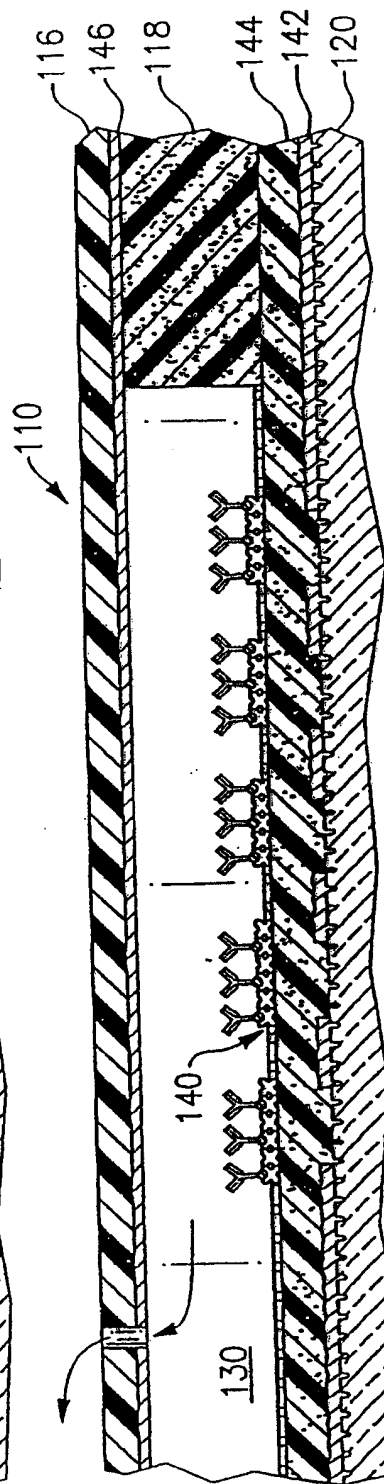


图 32I

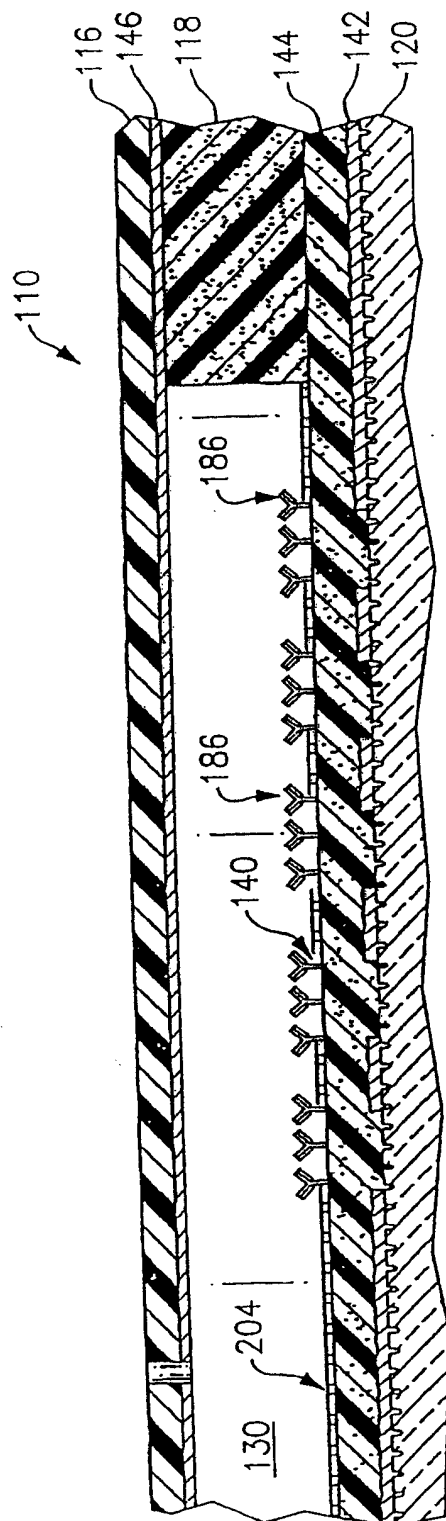


图 33

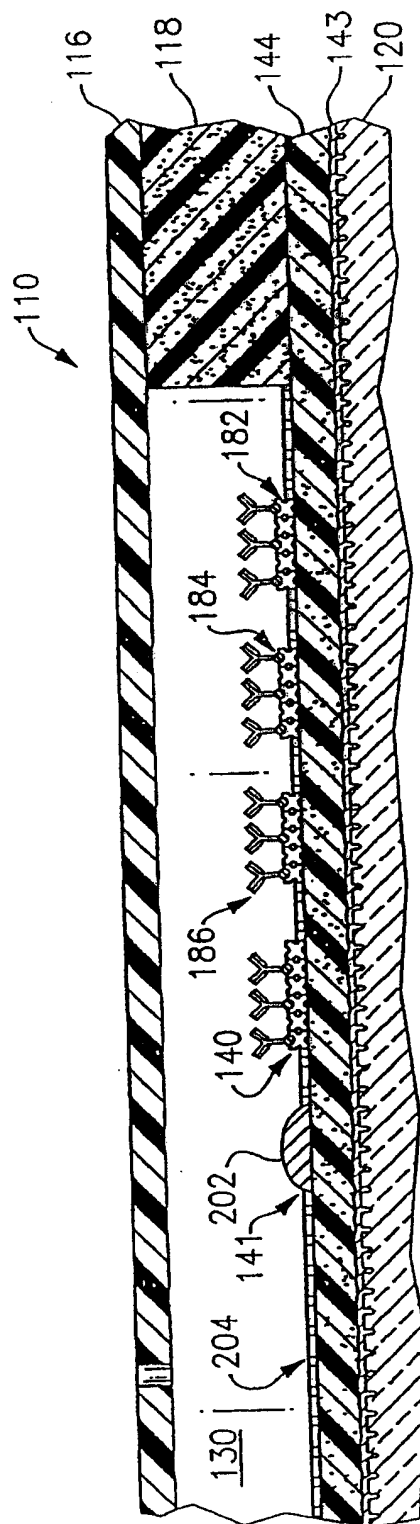


图 34

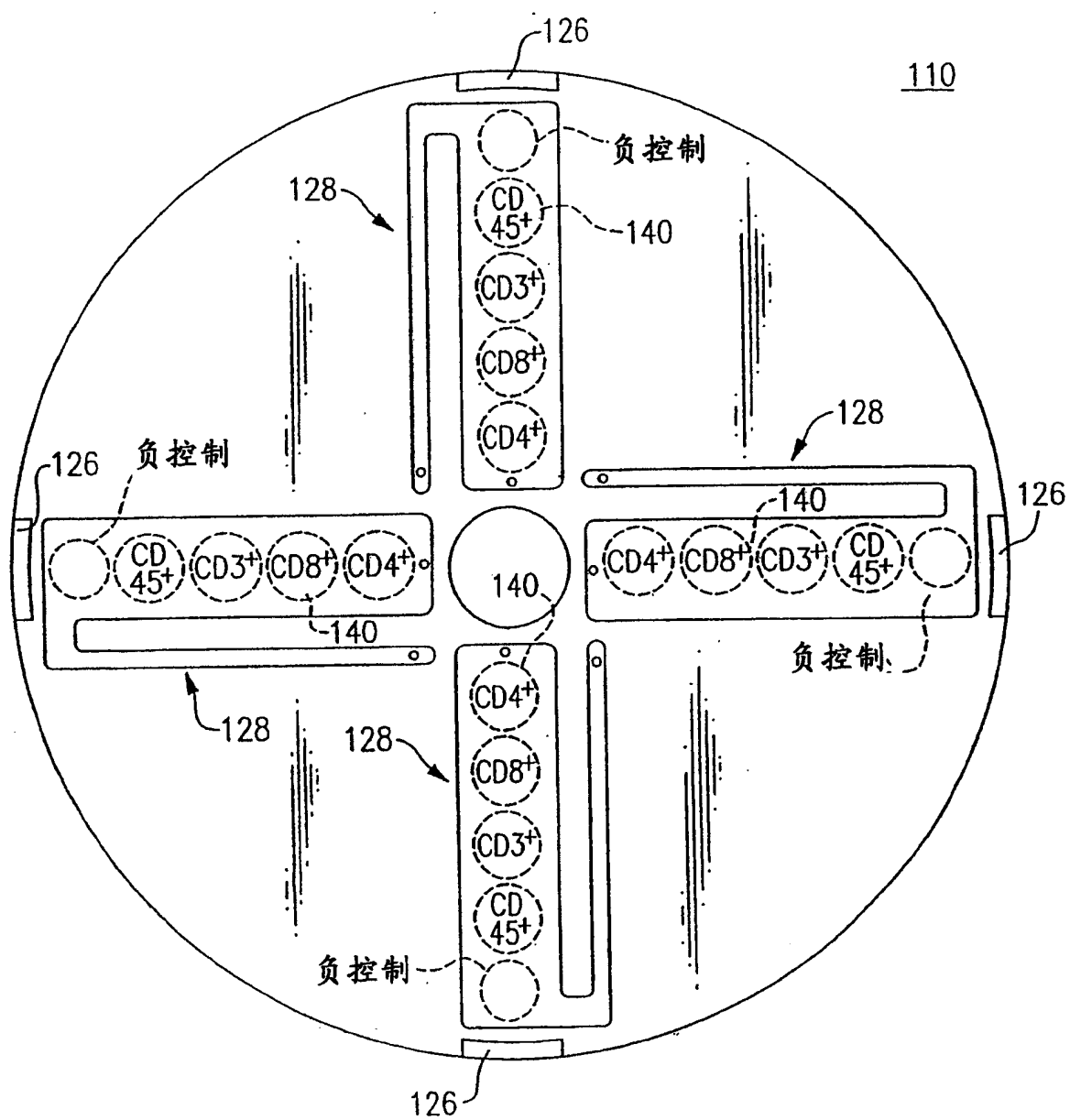
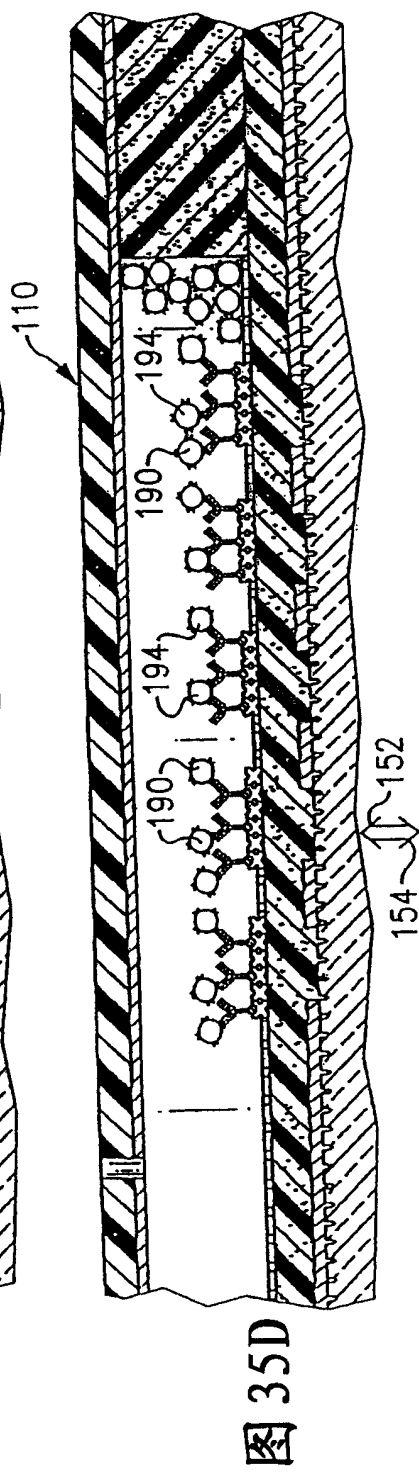
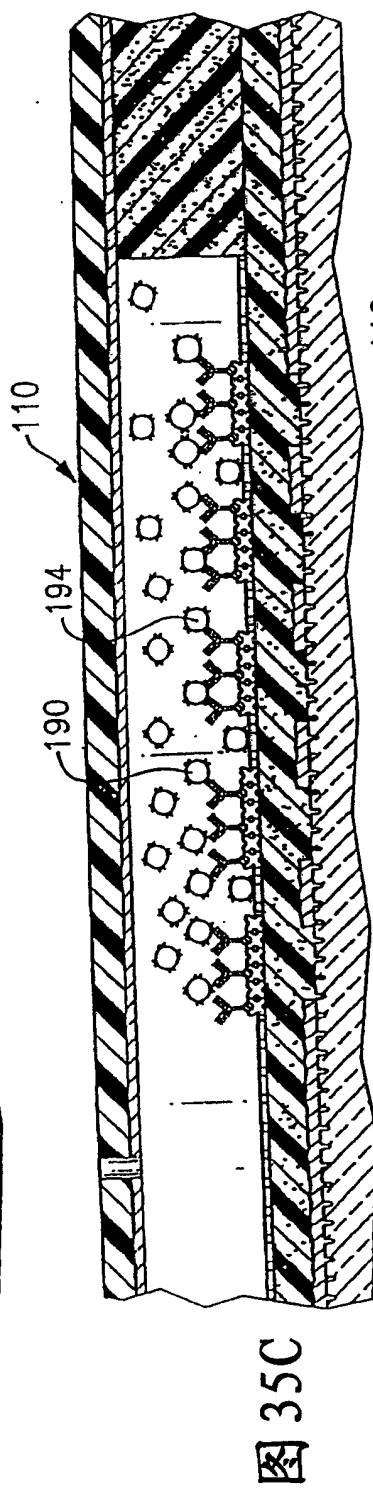
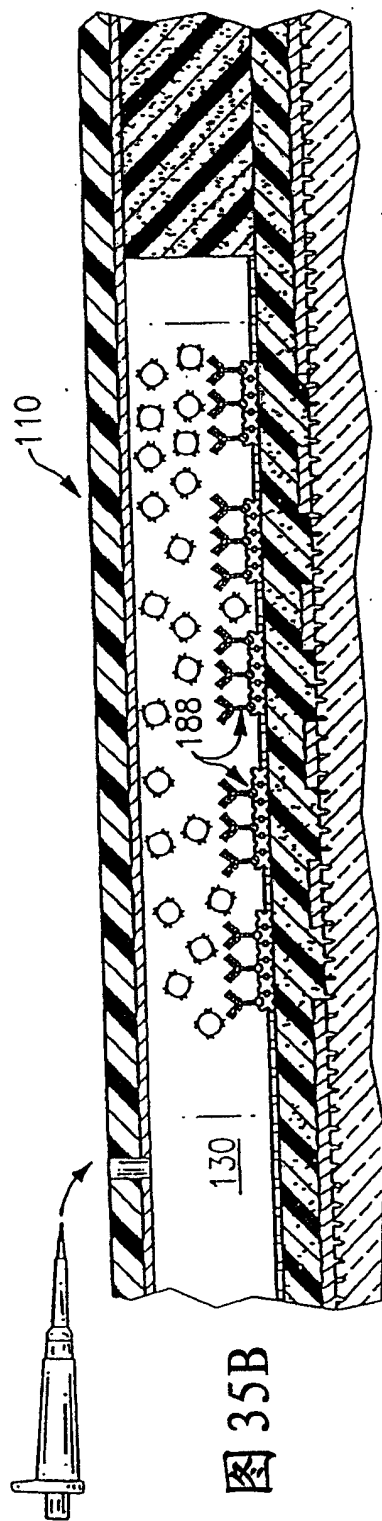
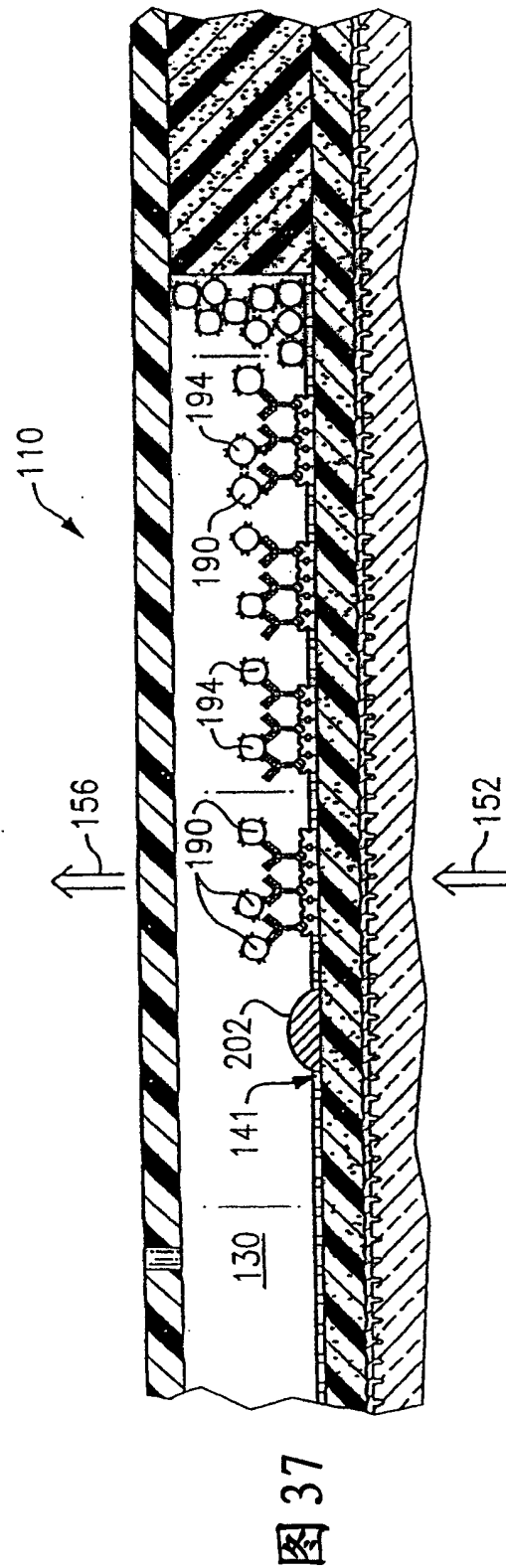
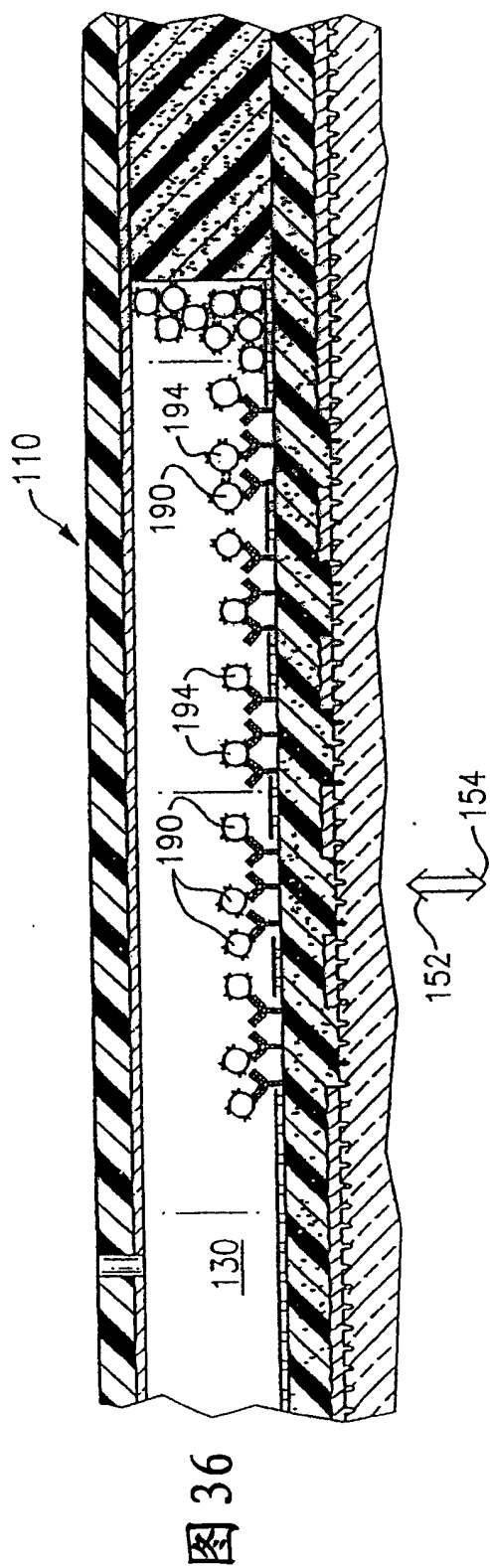
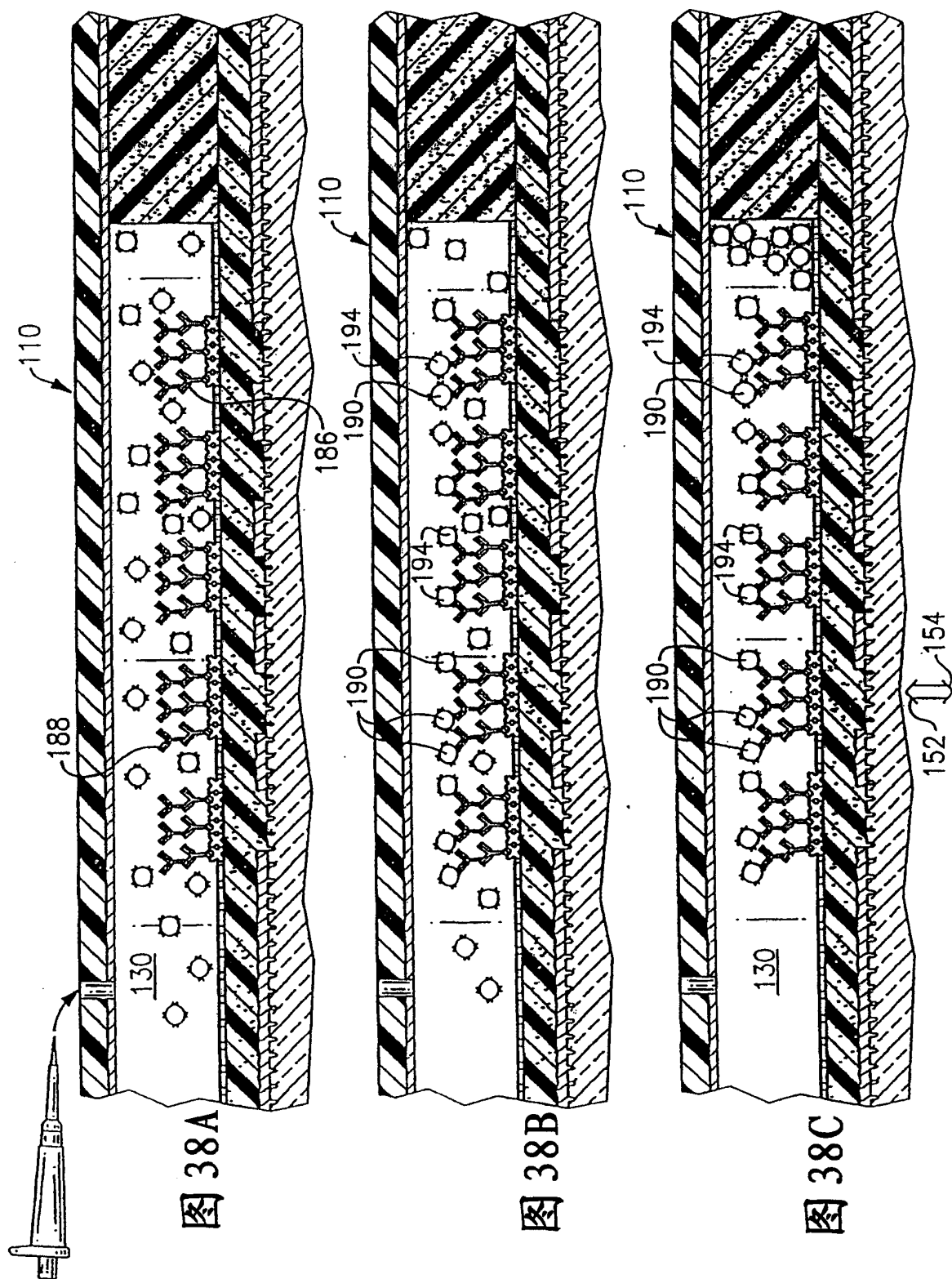


图 35A







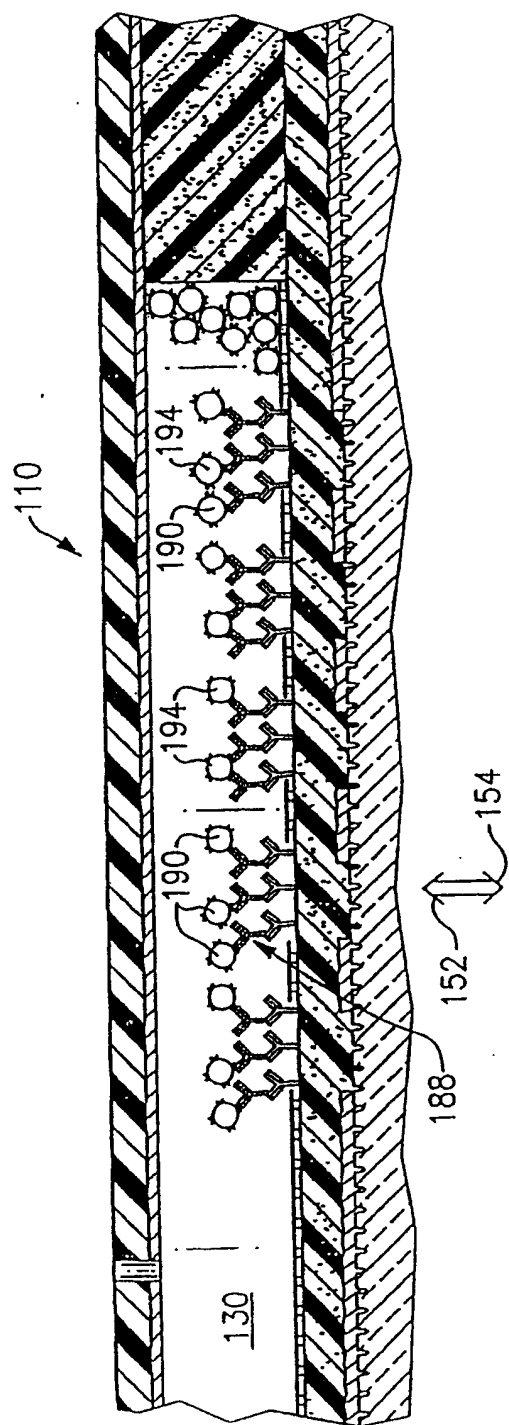


图 39

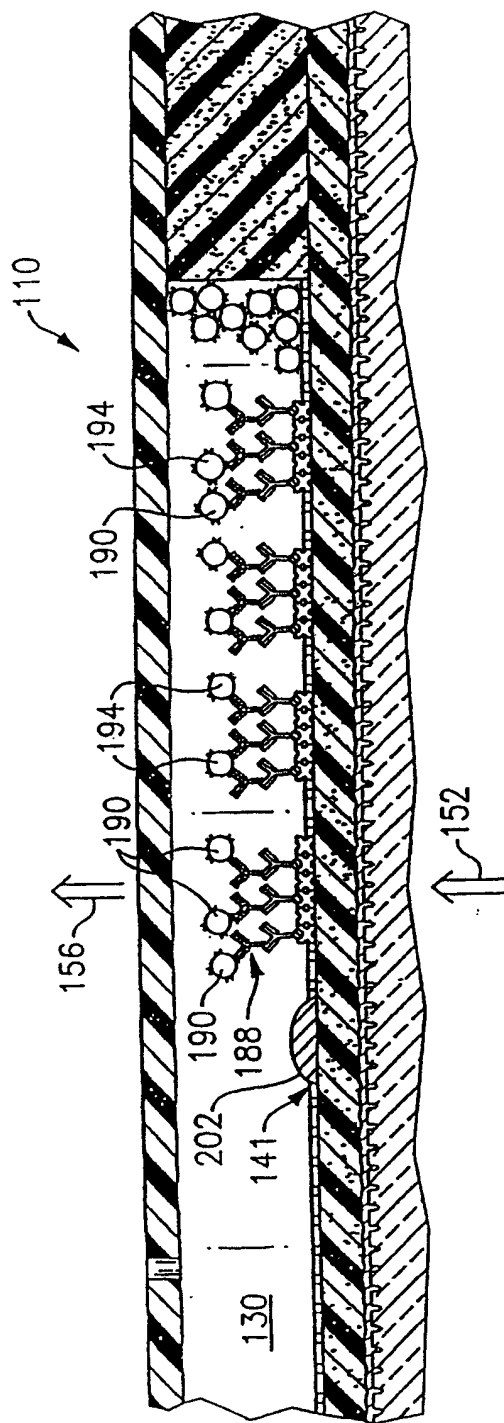
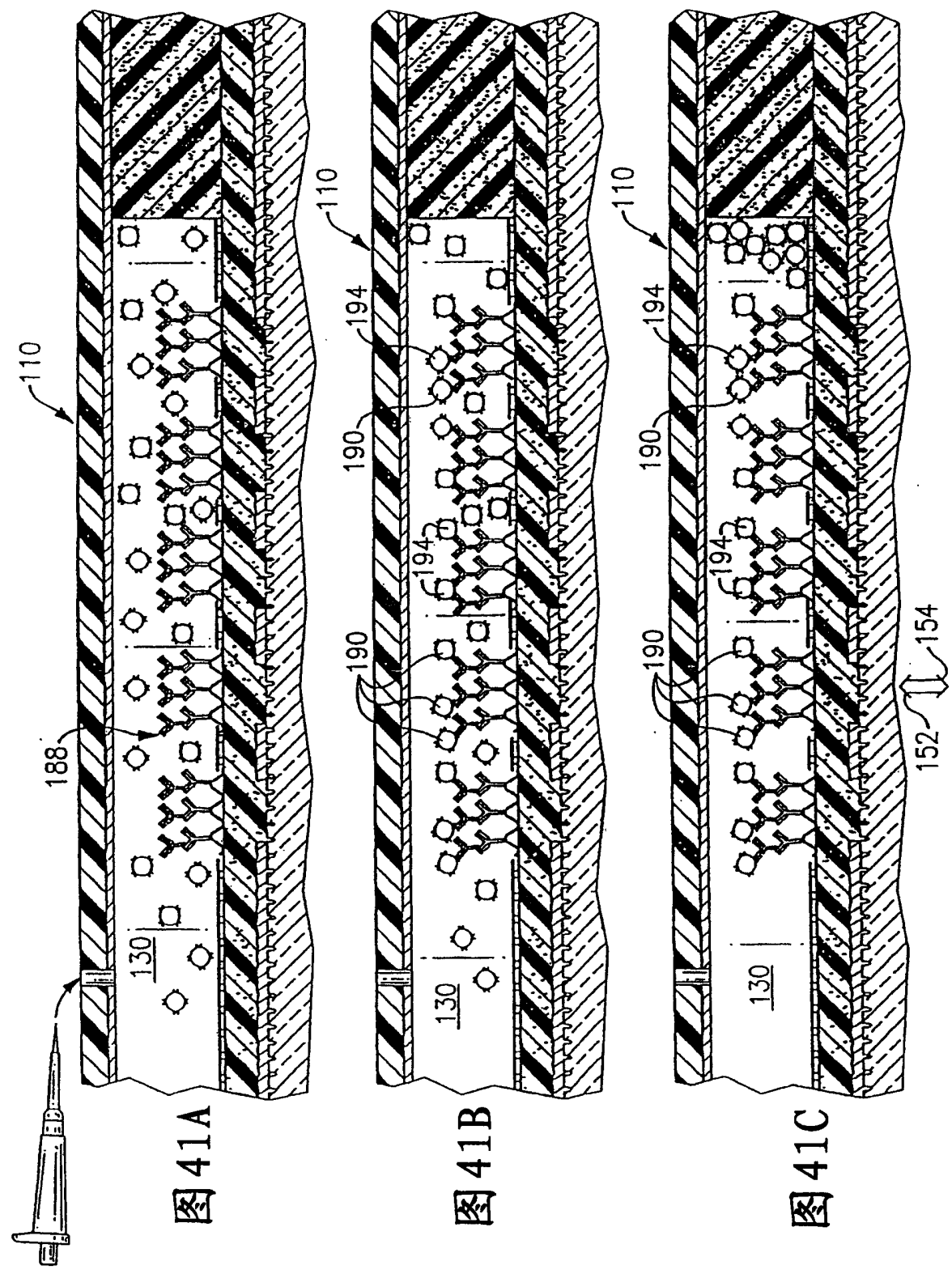
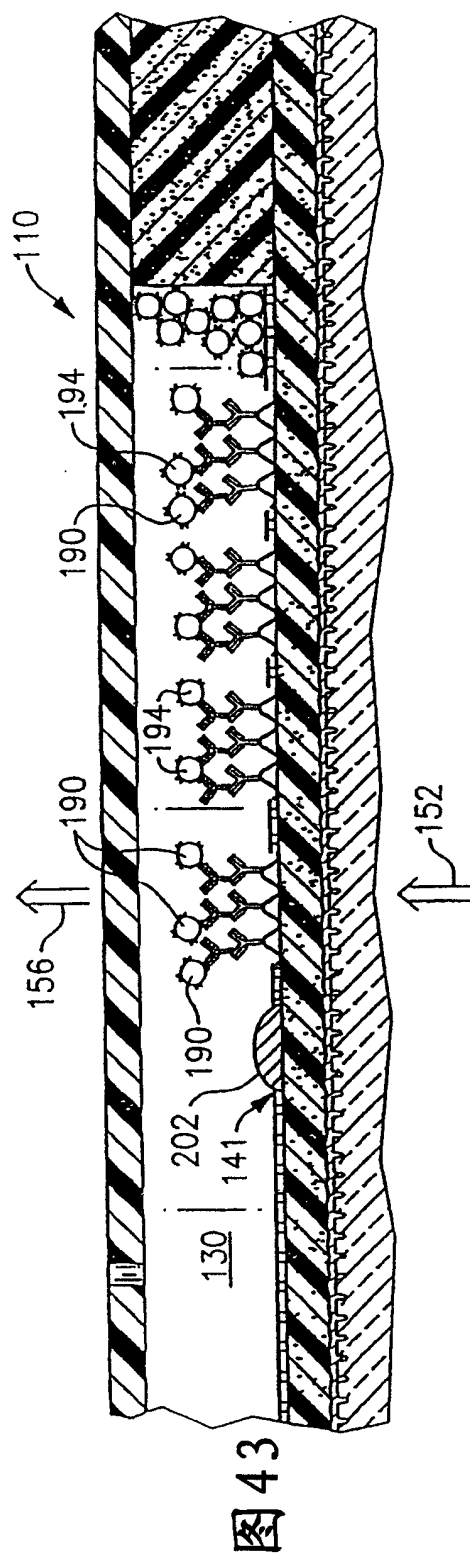
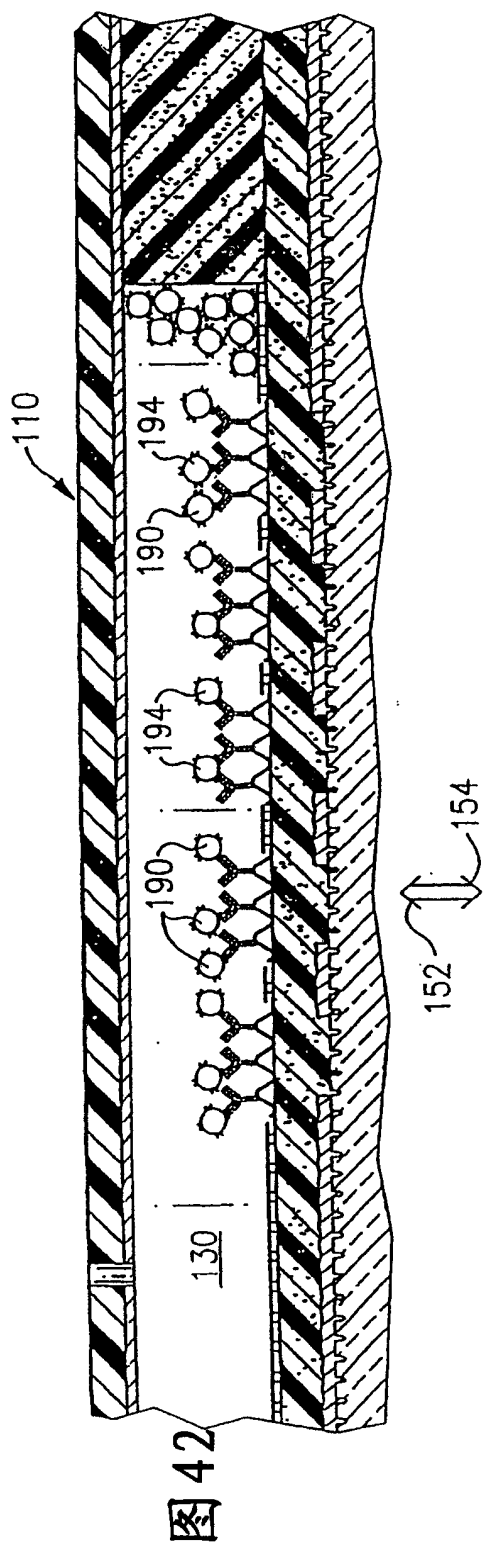


图 40





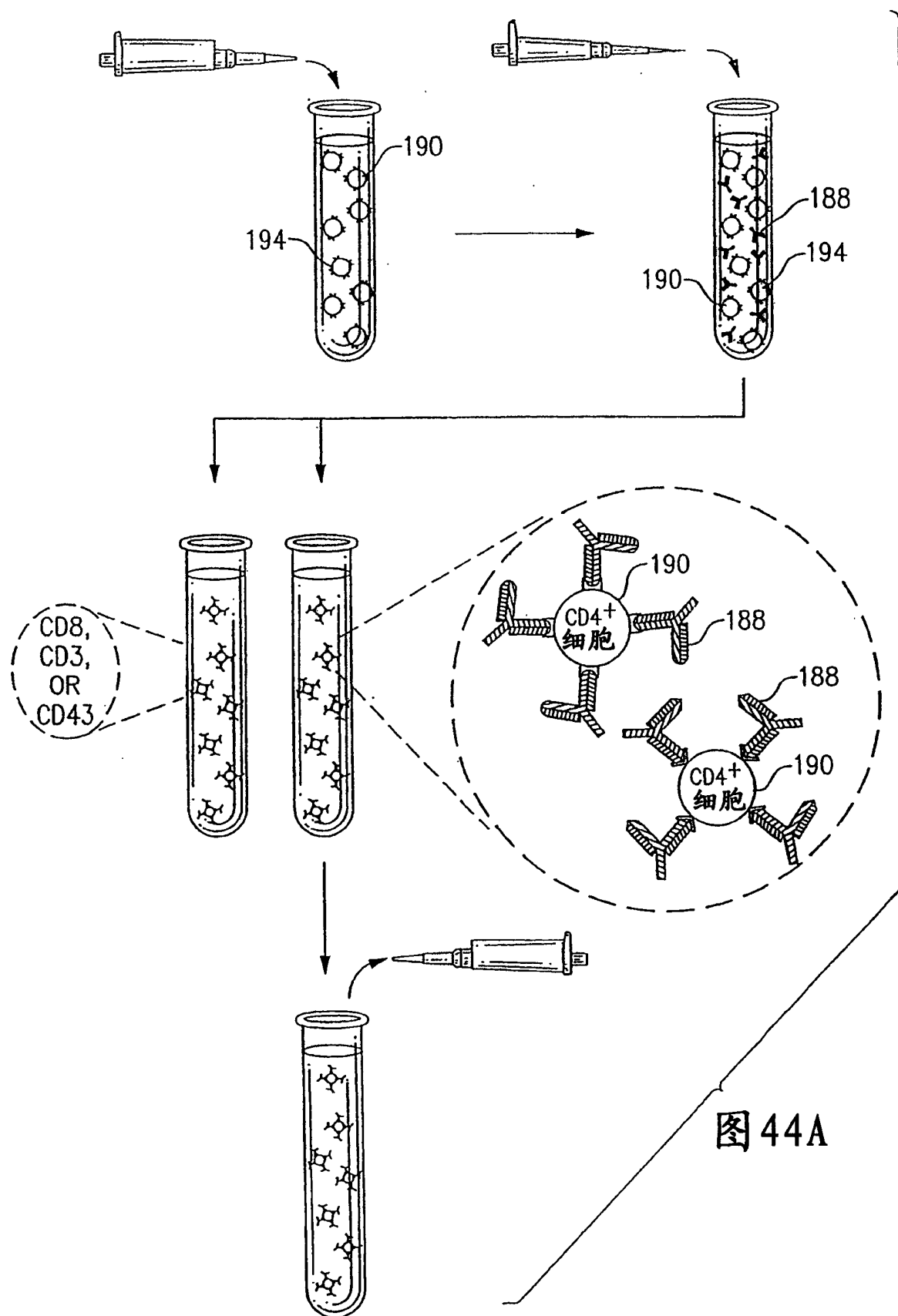
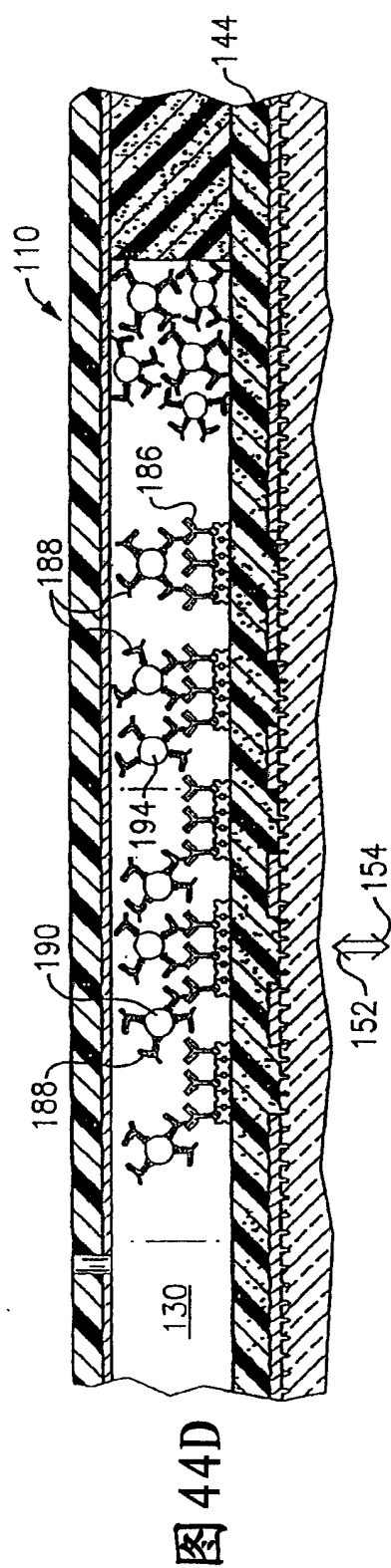
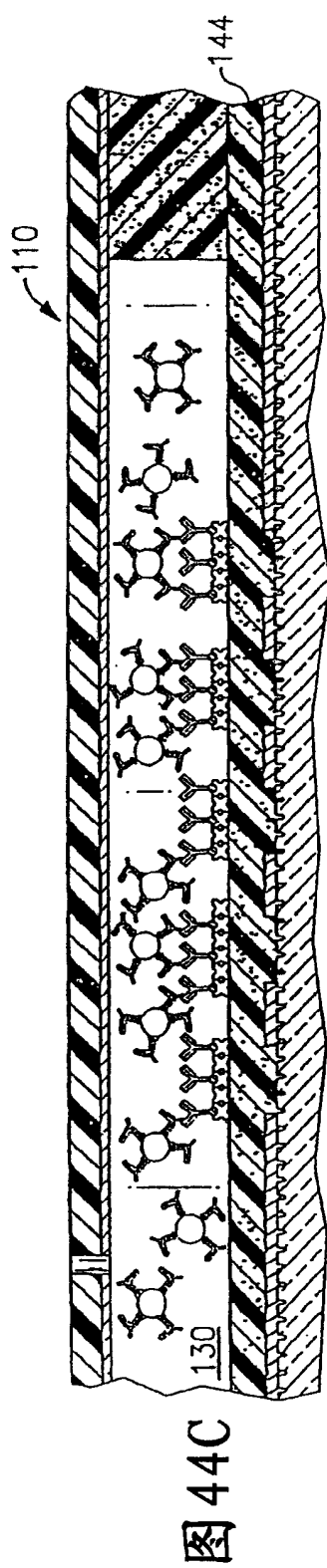
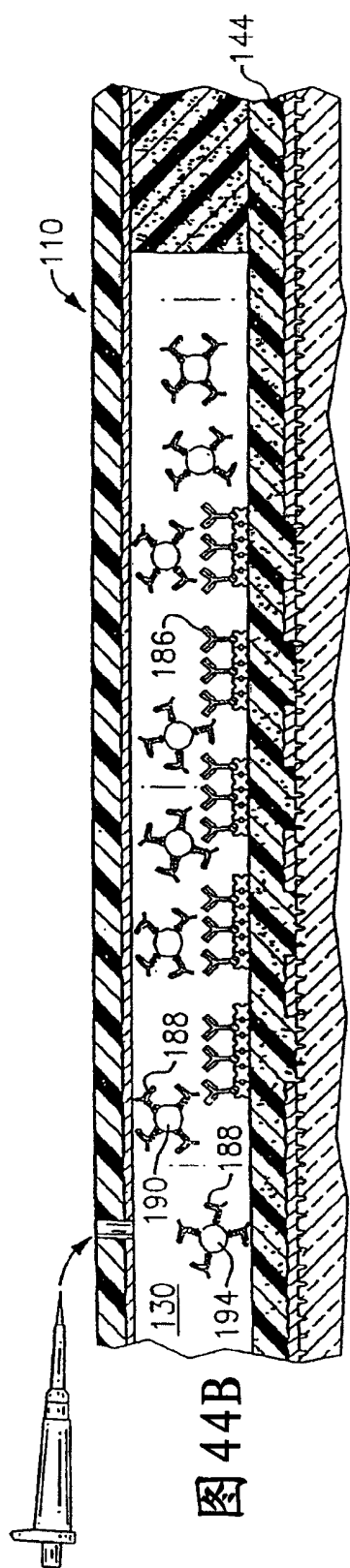
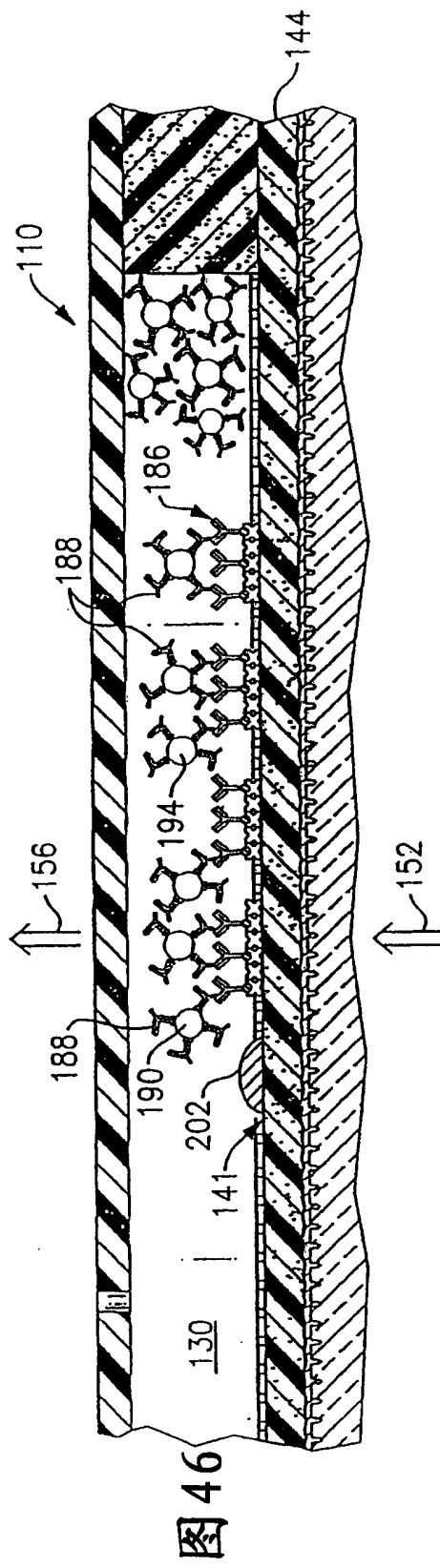
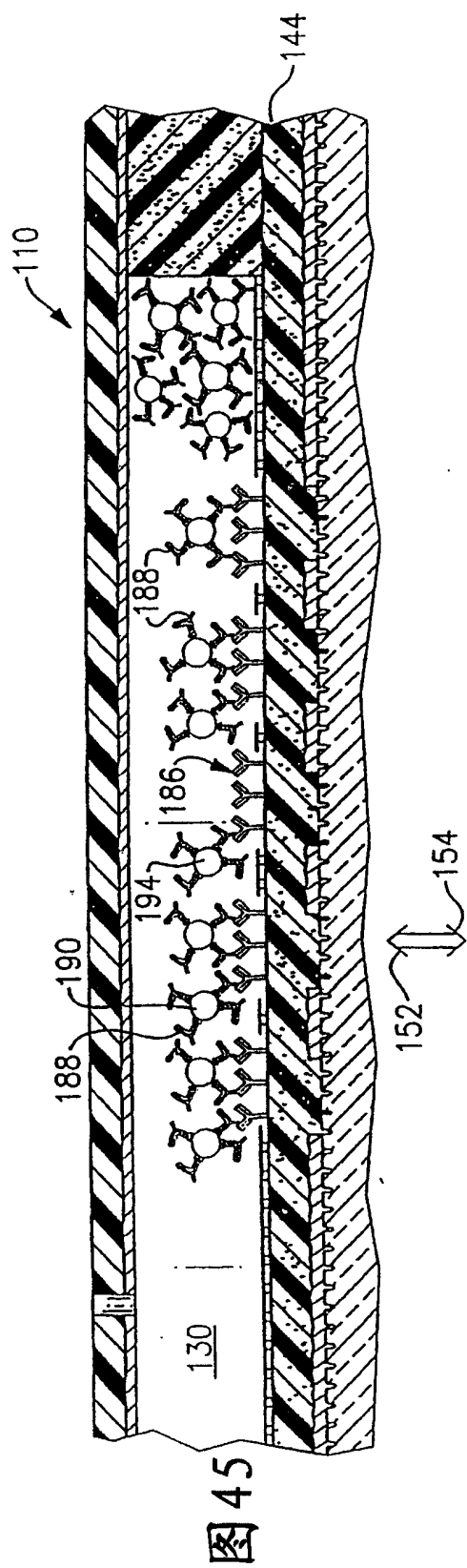


图 44A





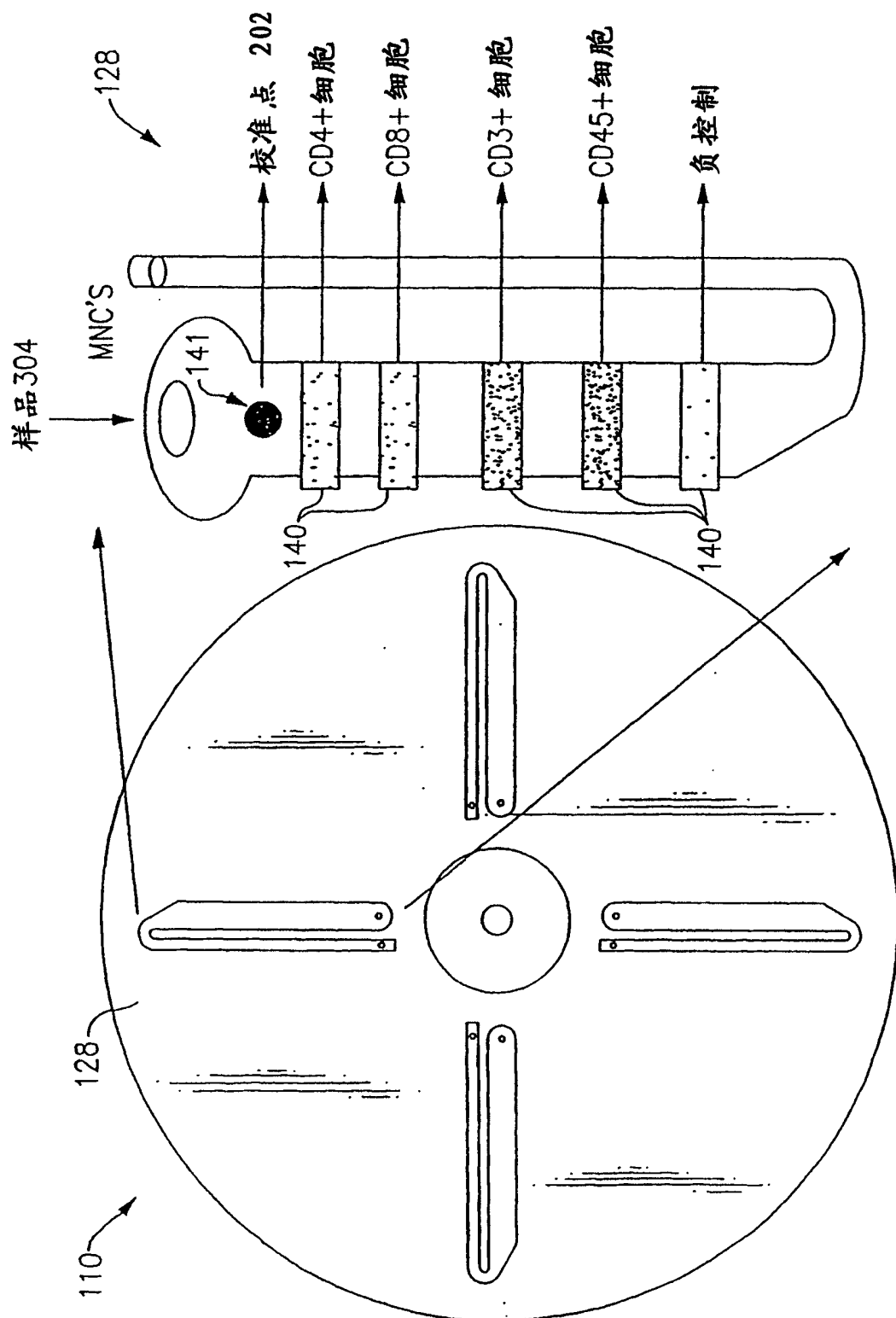


图 47

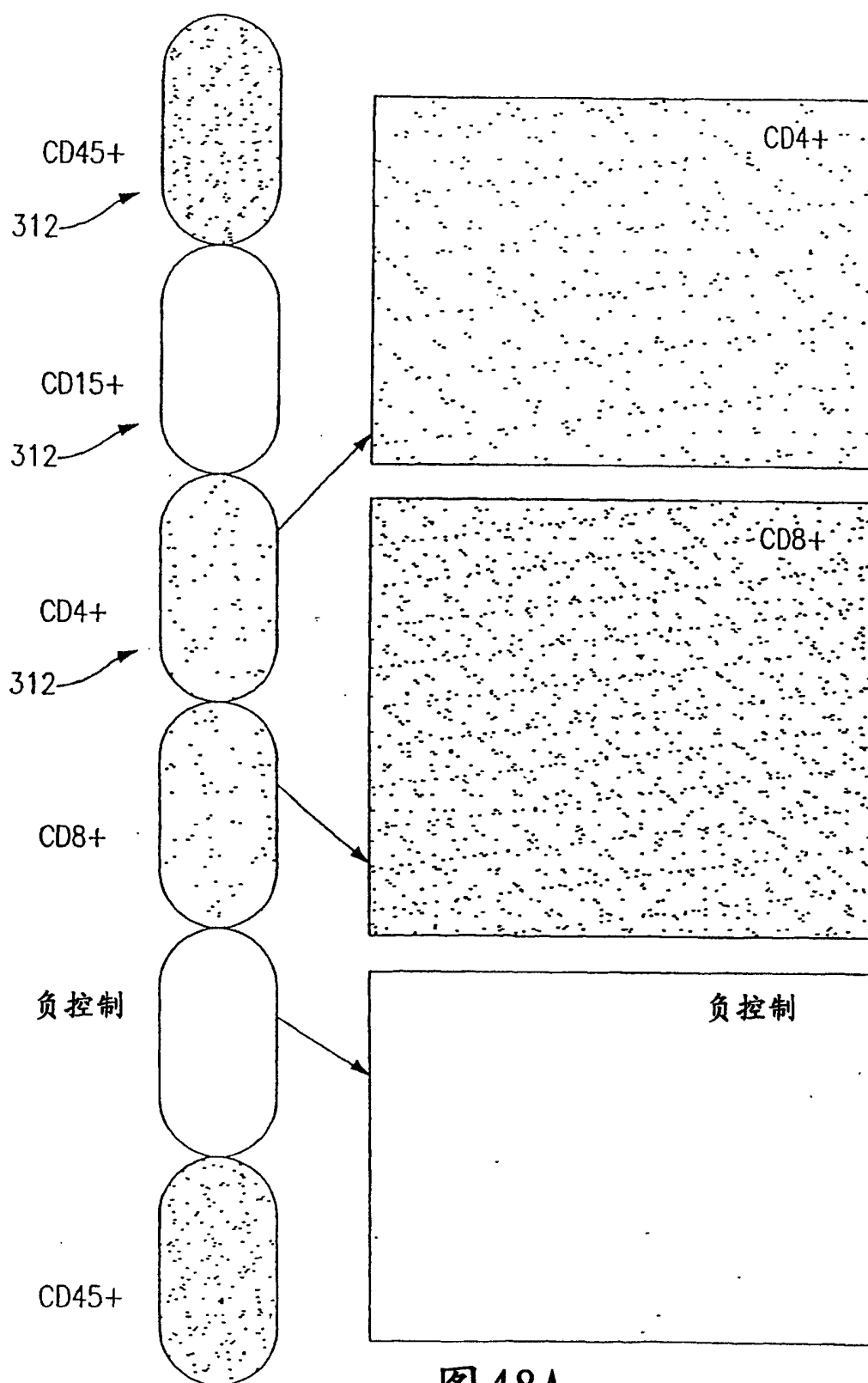


图 48A

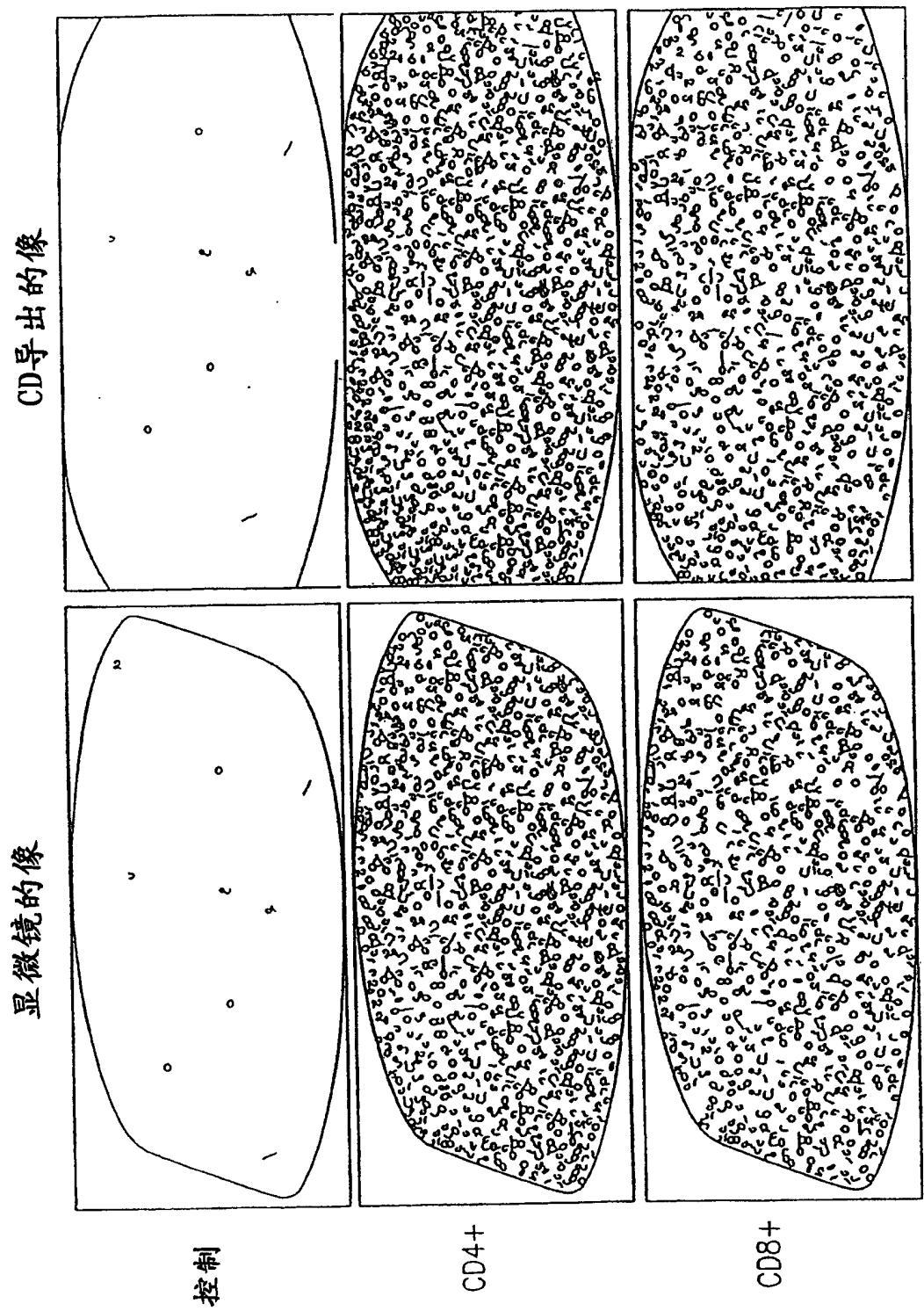


图48

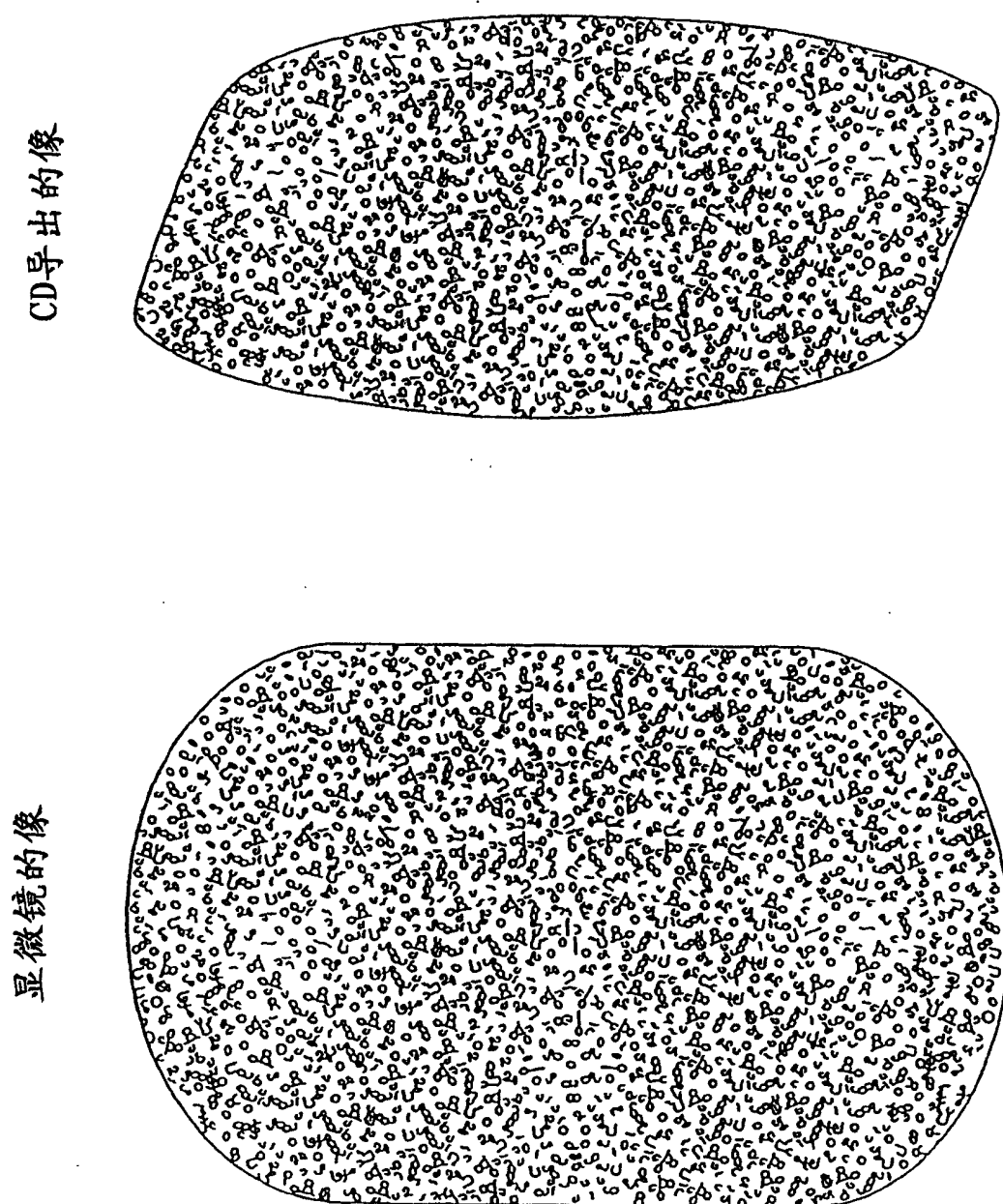


图 49

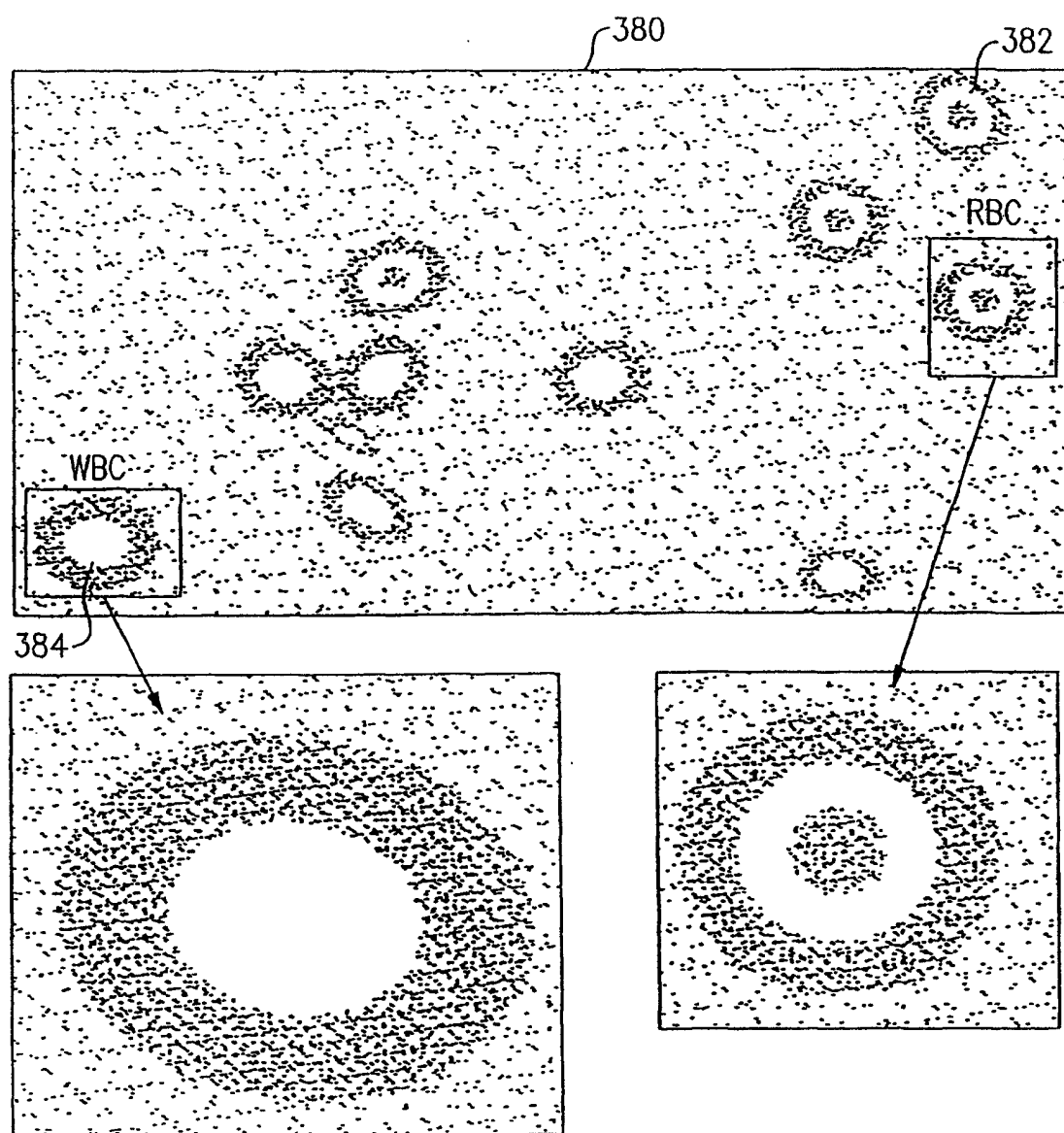


图 50

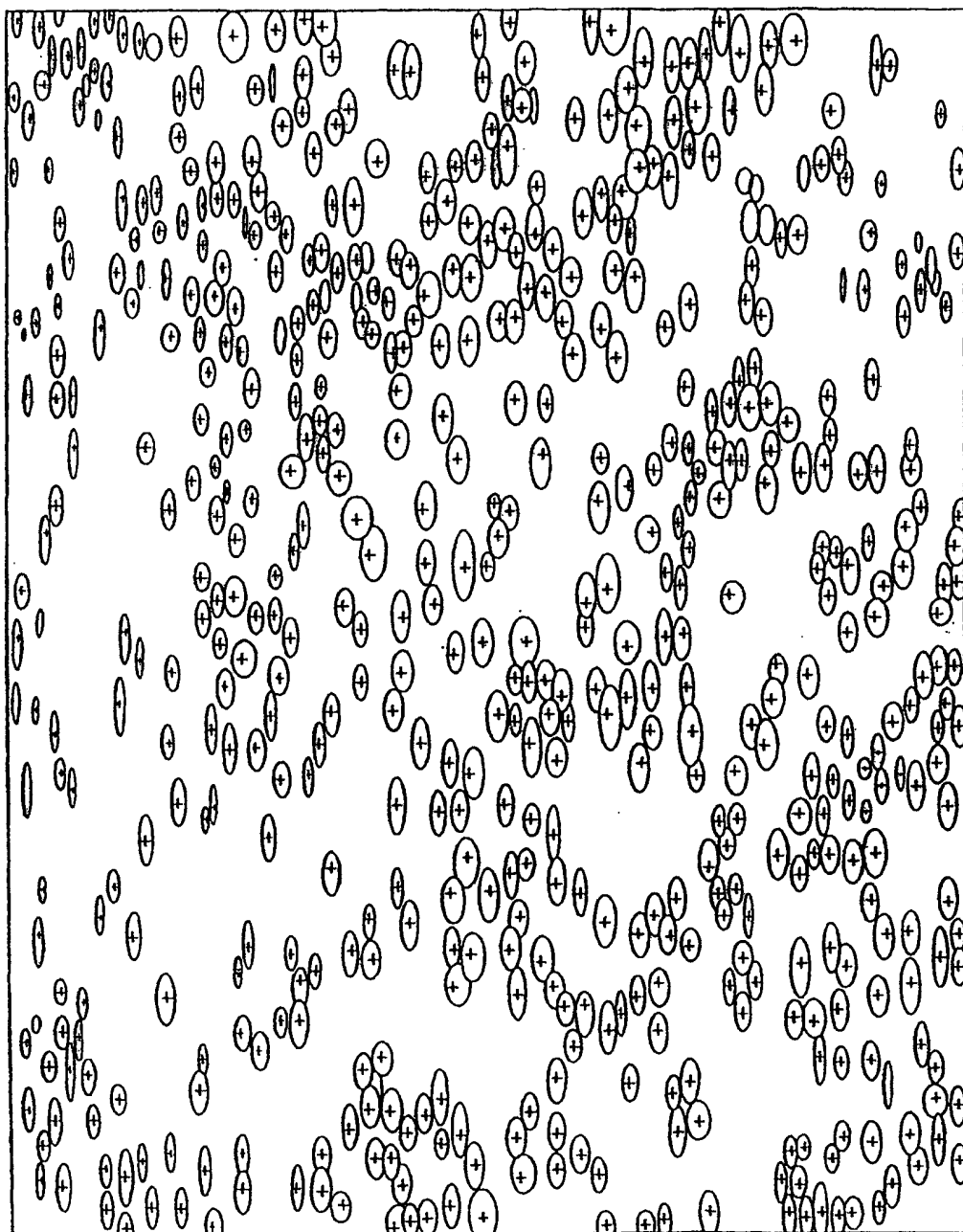


图 51

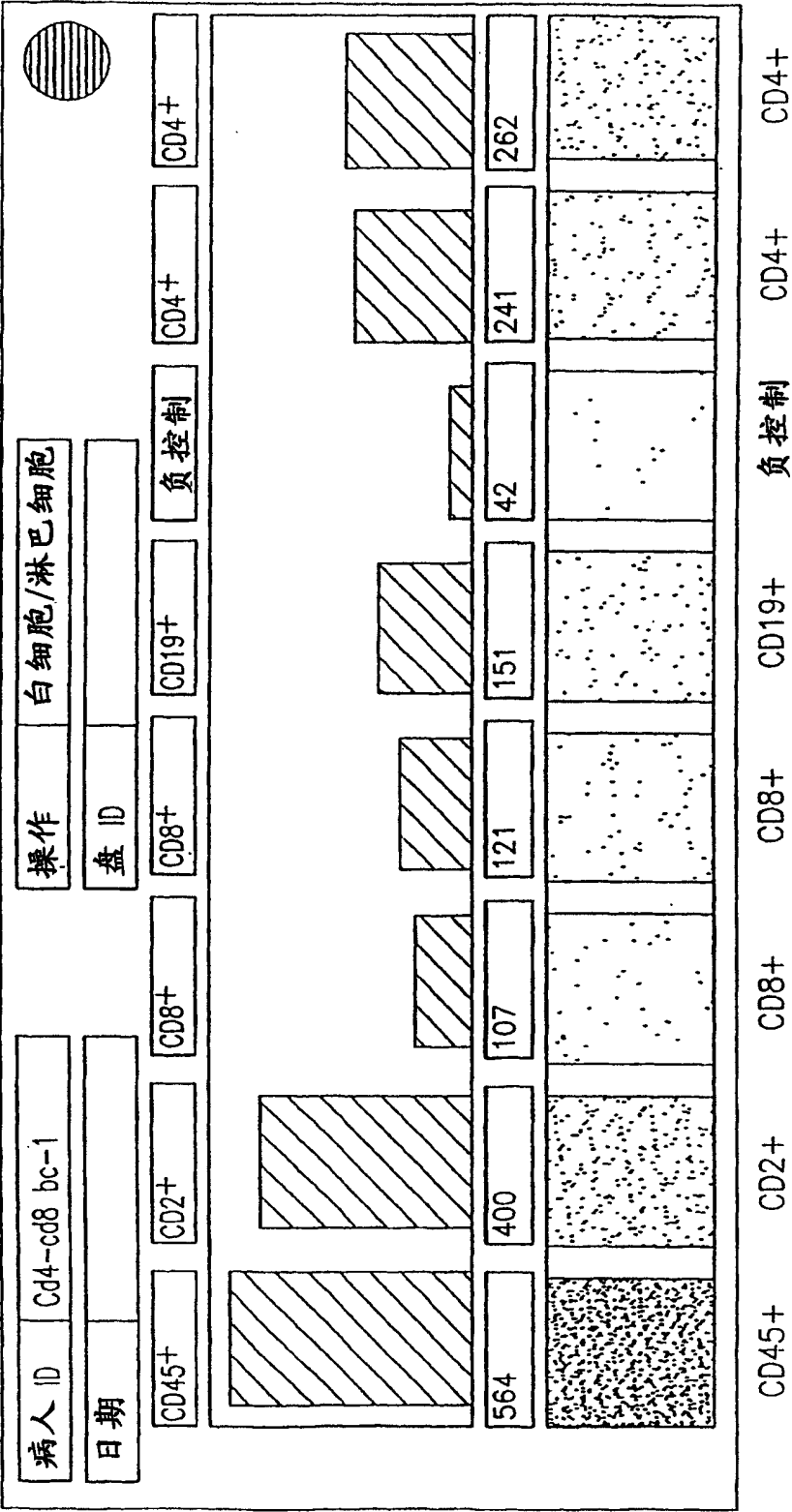


图 52

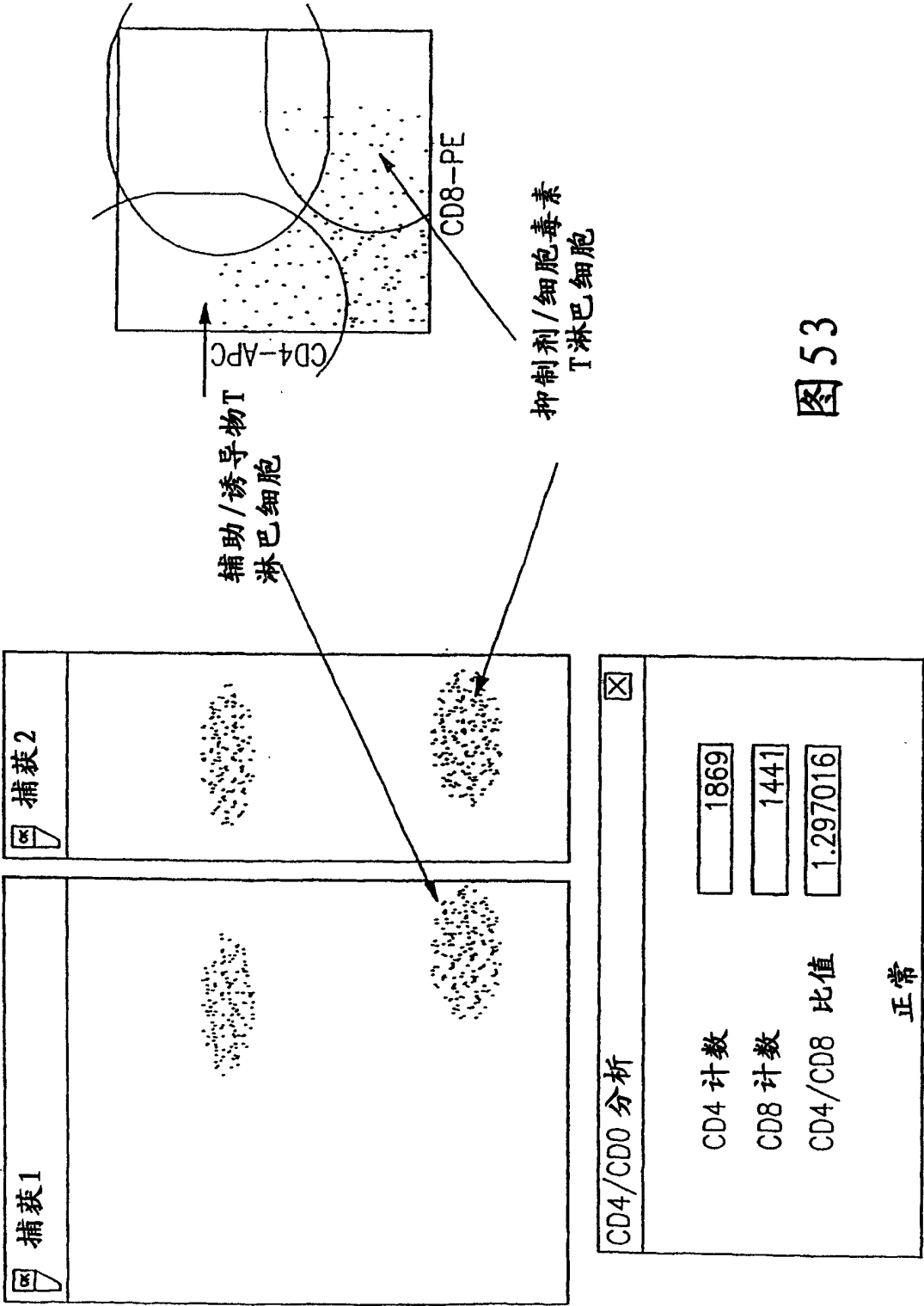
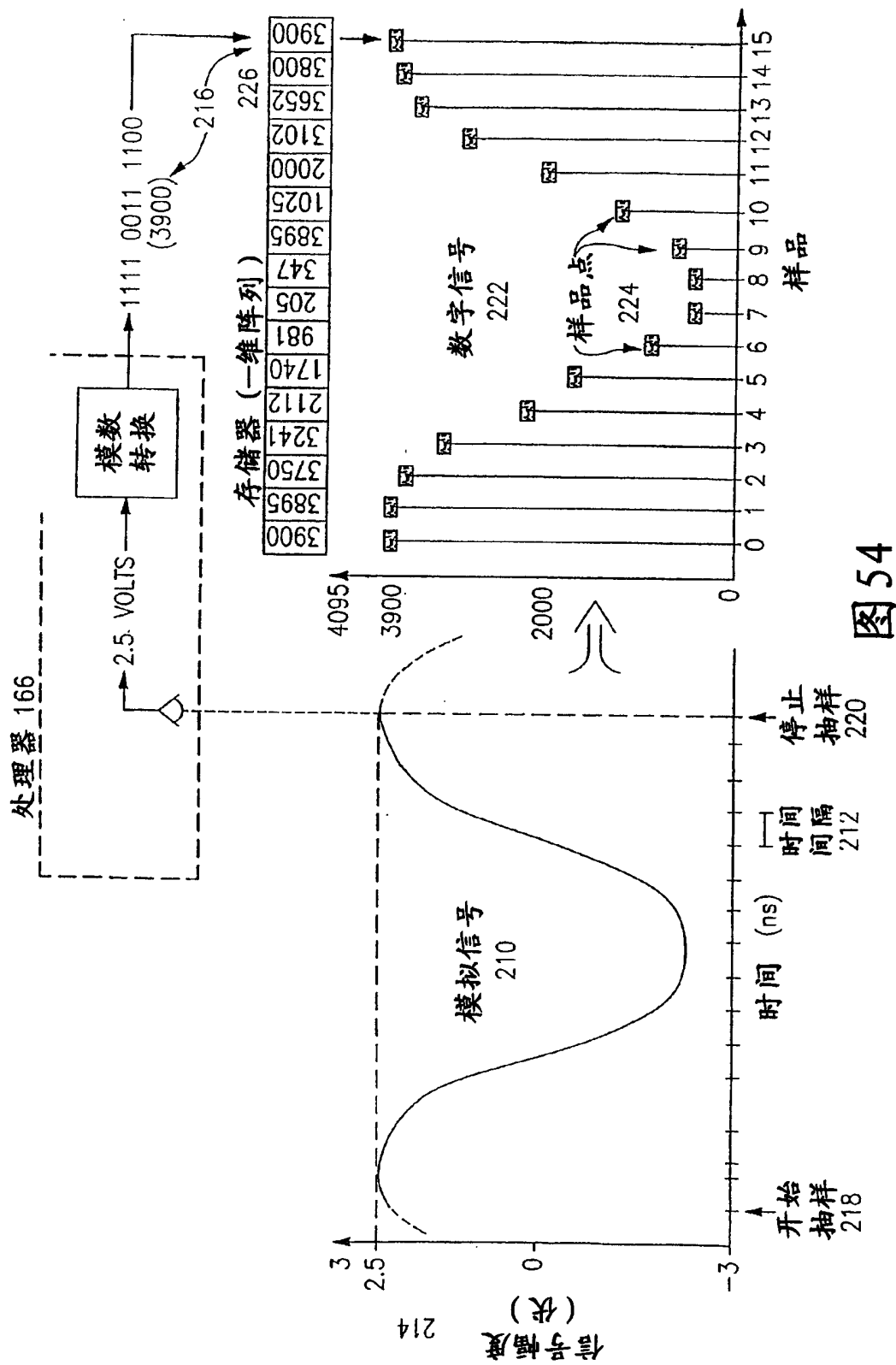


图 53



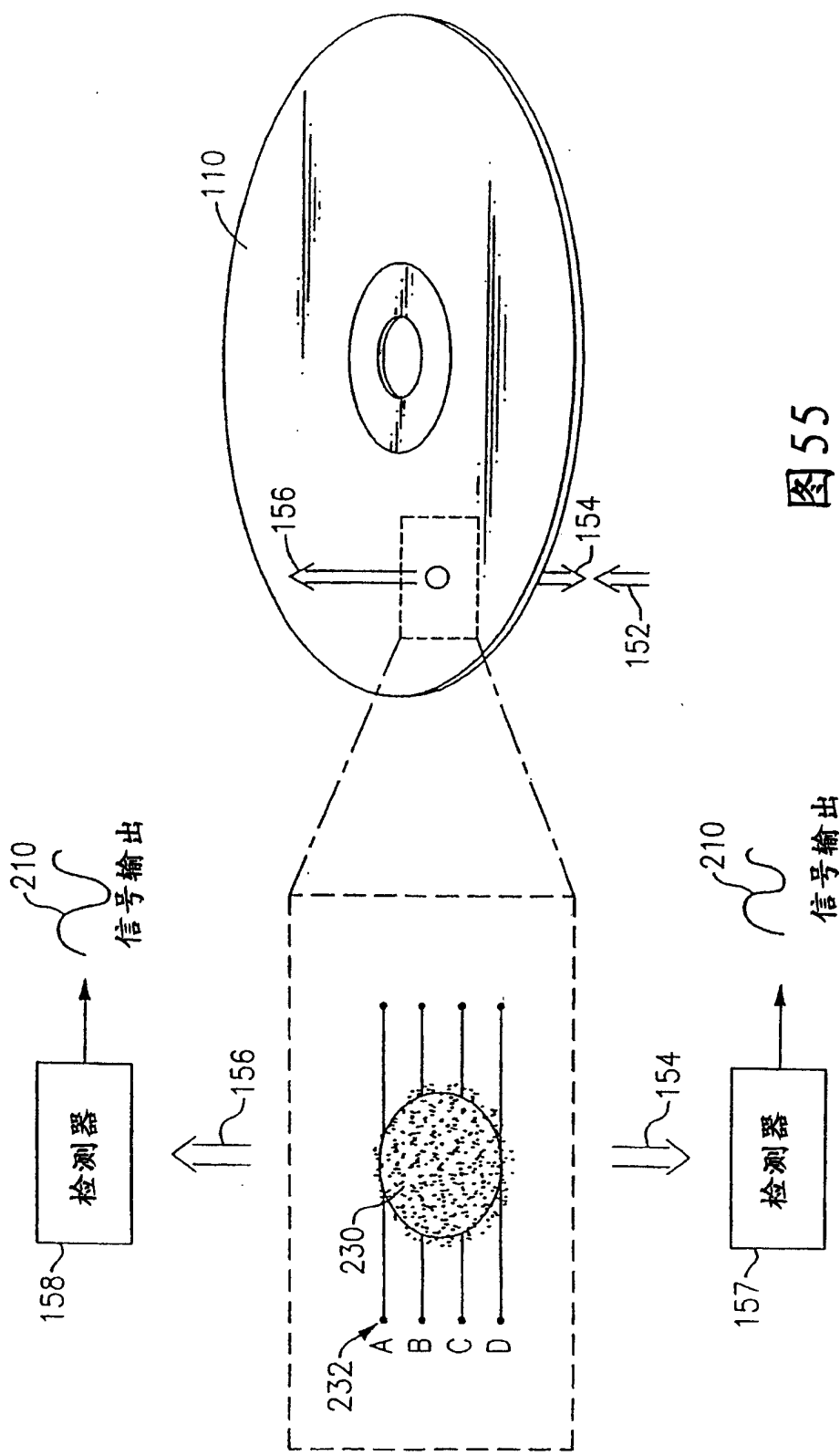


图 55

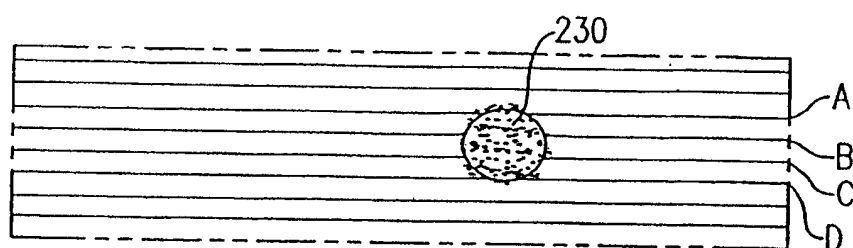


图 56A

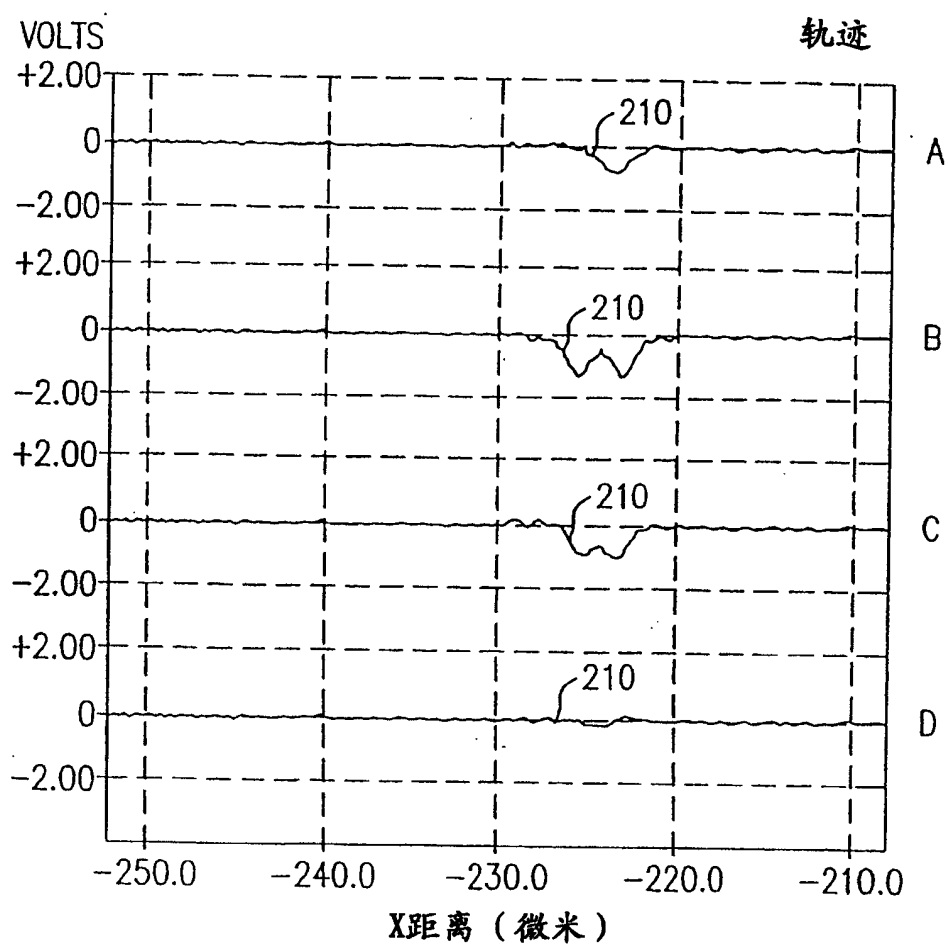


图 56B

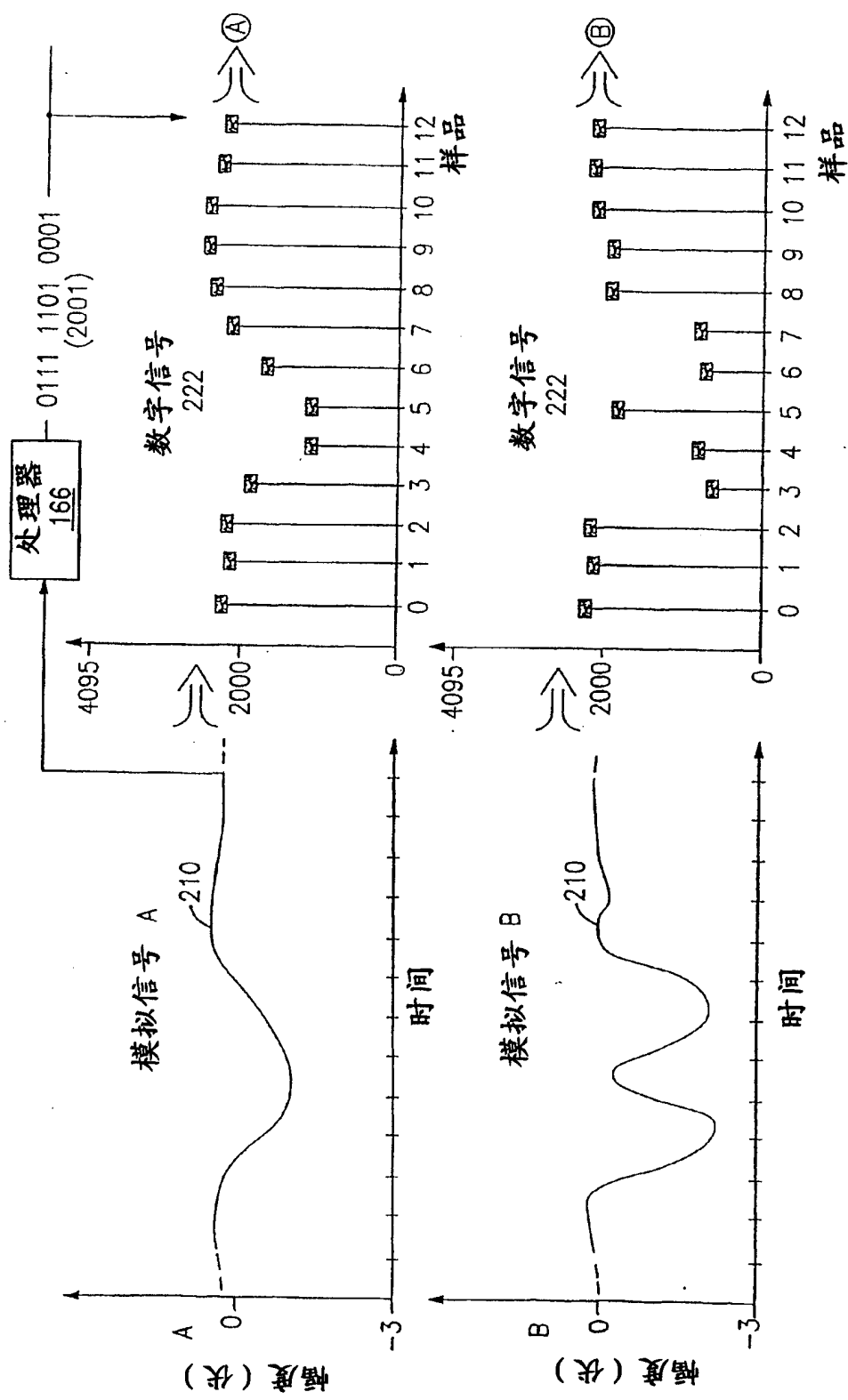


图 57A

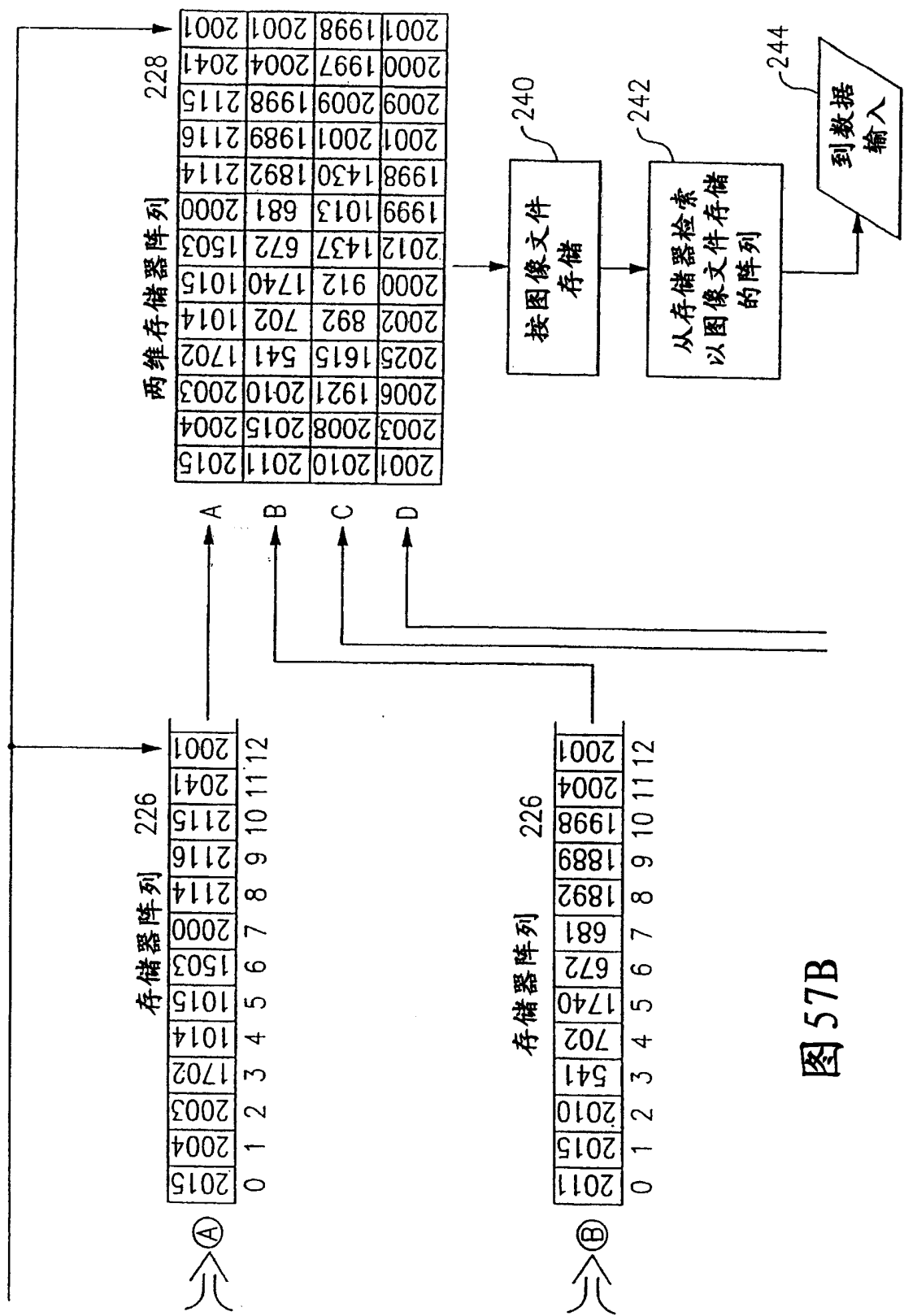


图 57B

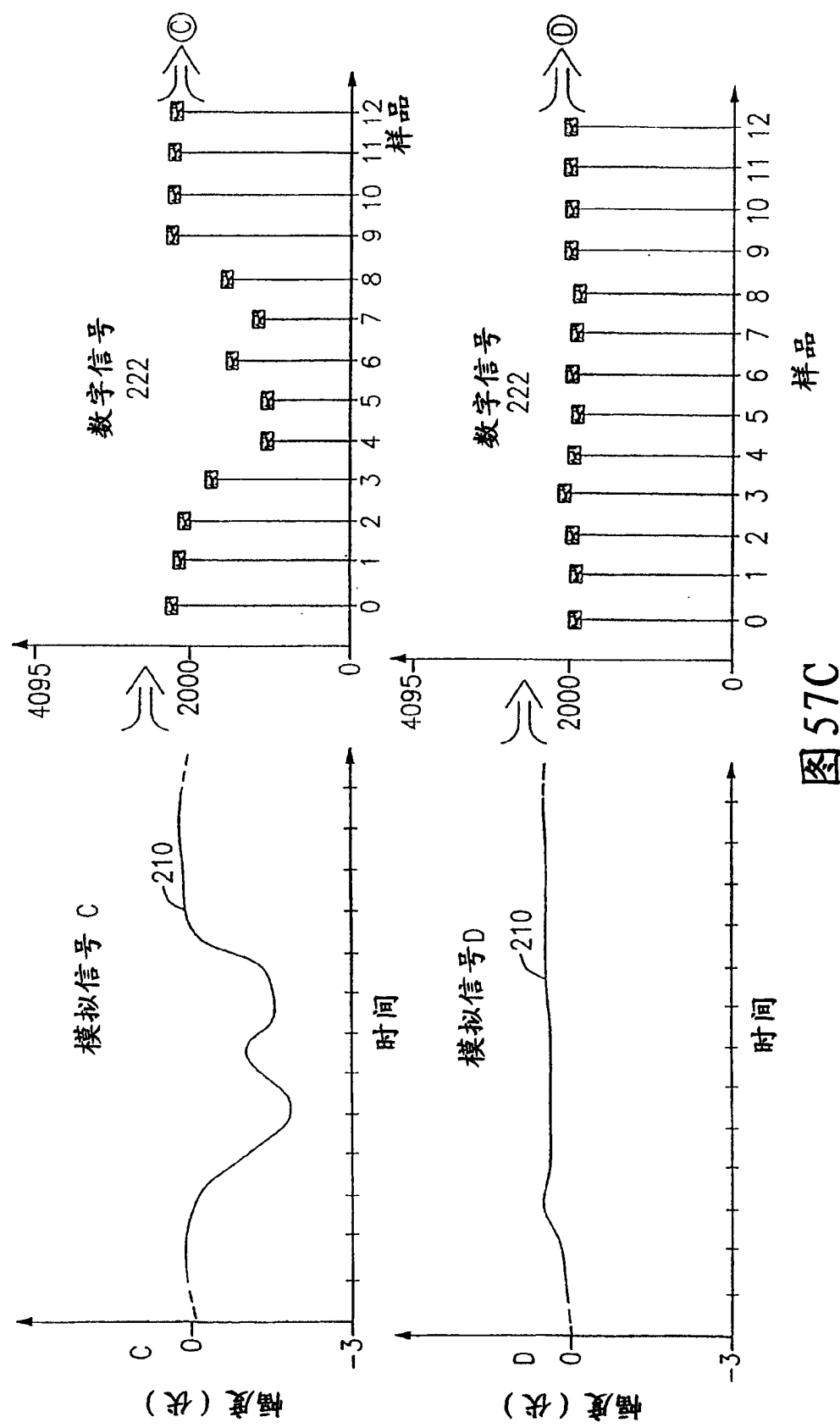


图 57C

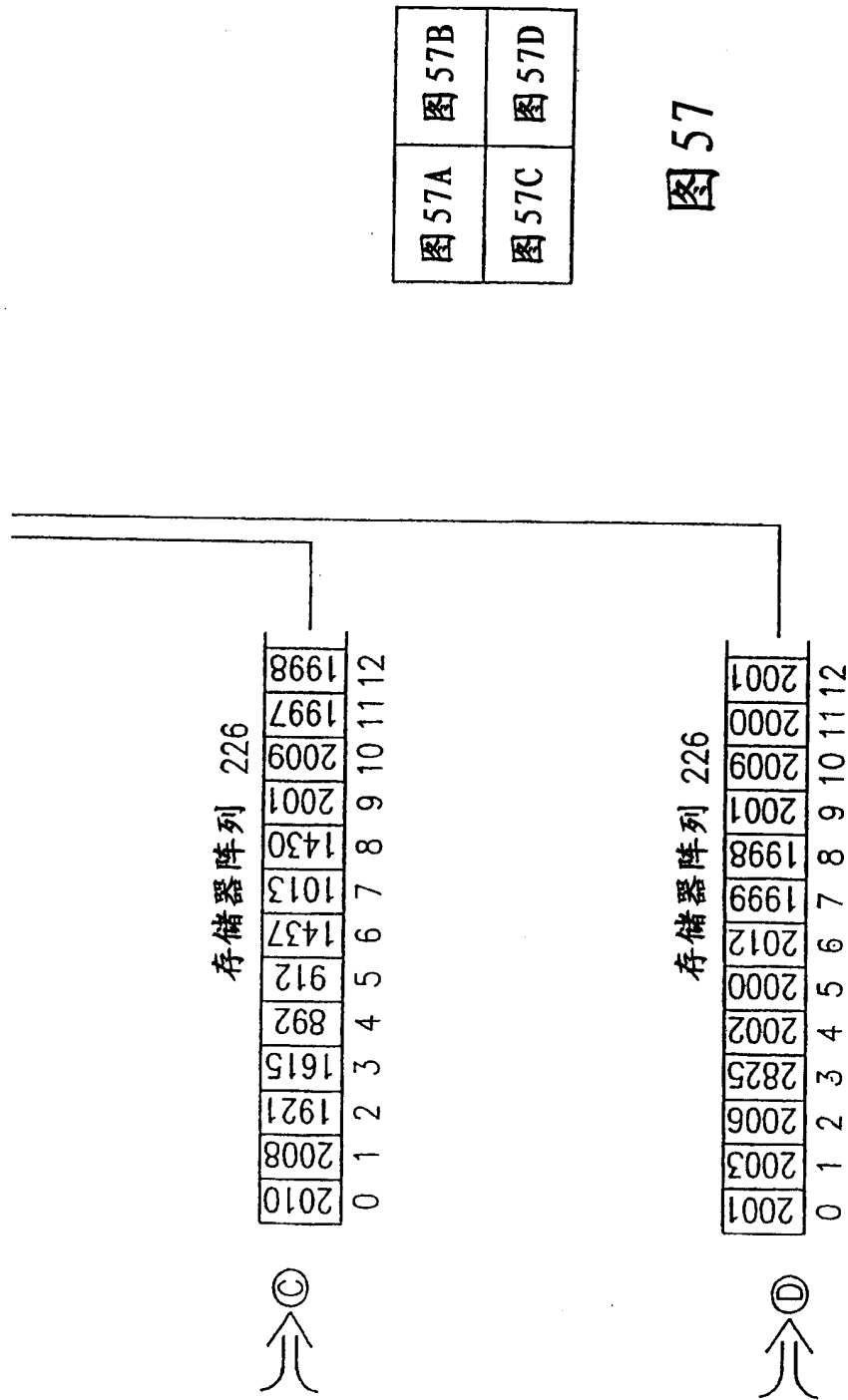
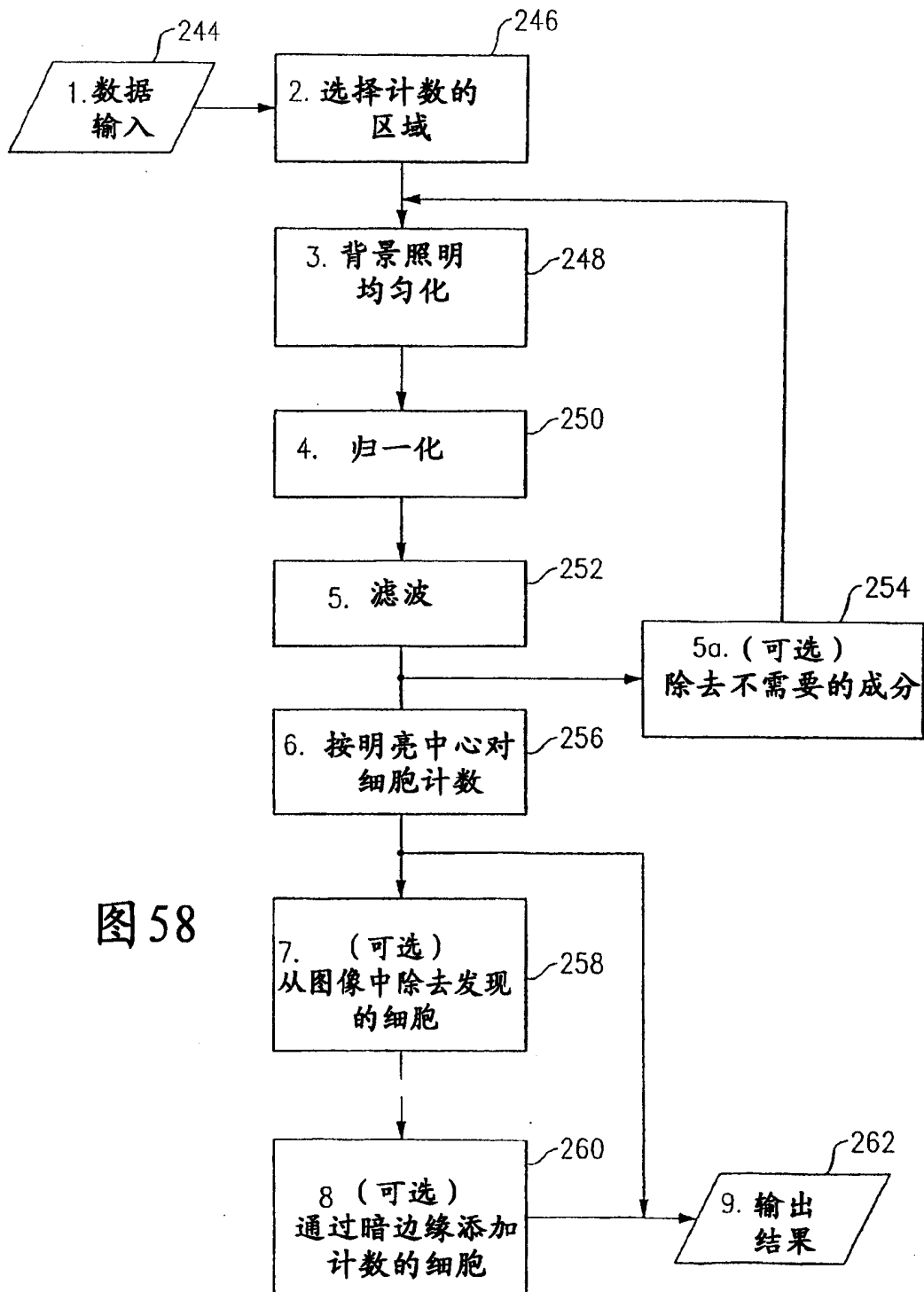


图 57D

图 57A	图 57B
图 57C	图 57D

图 57



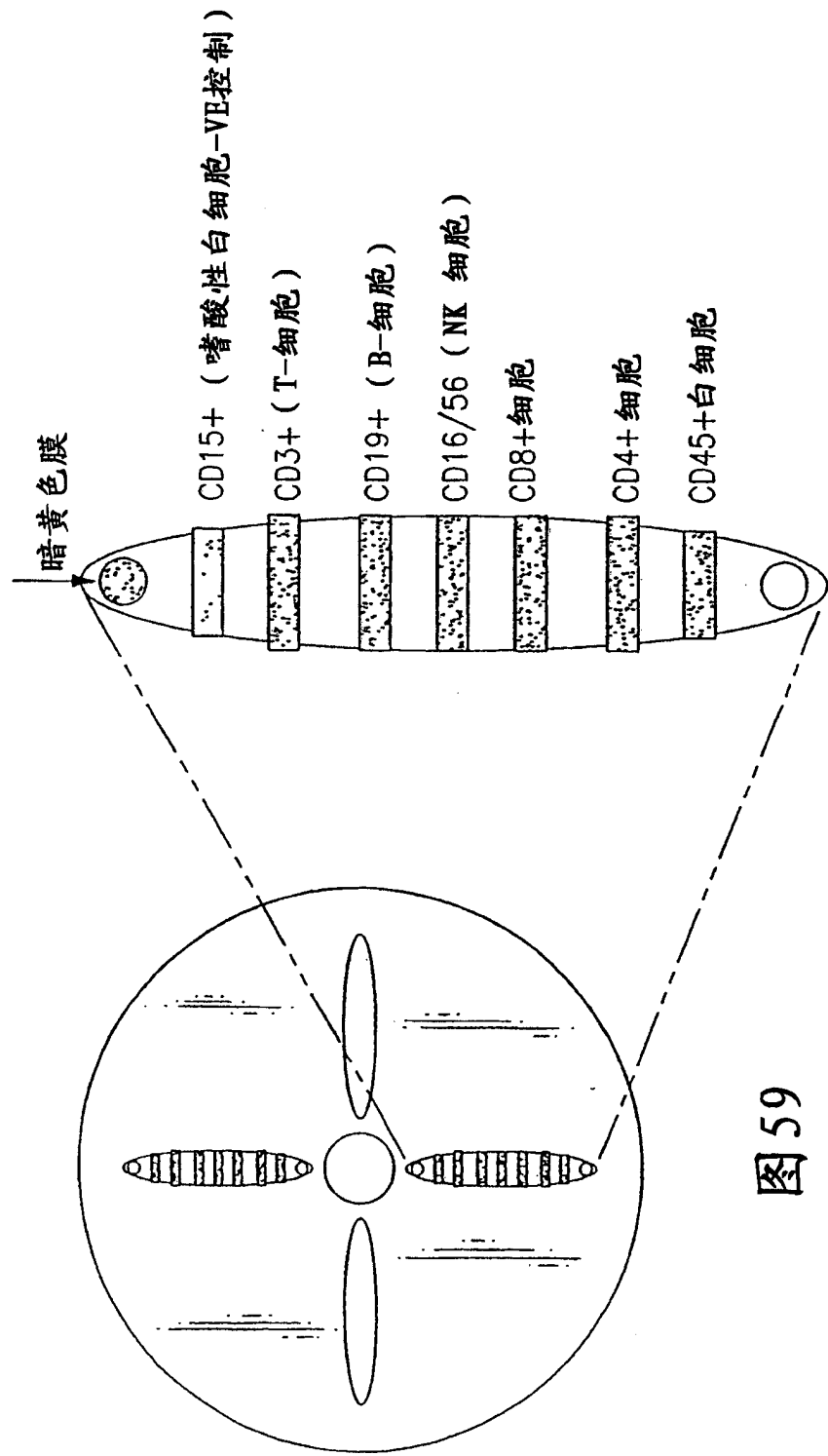


图 59

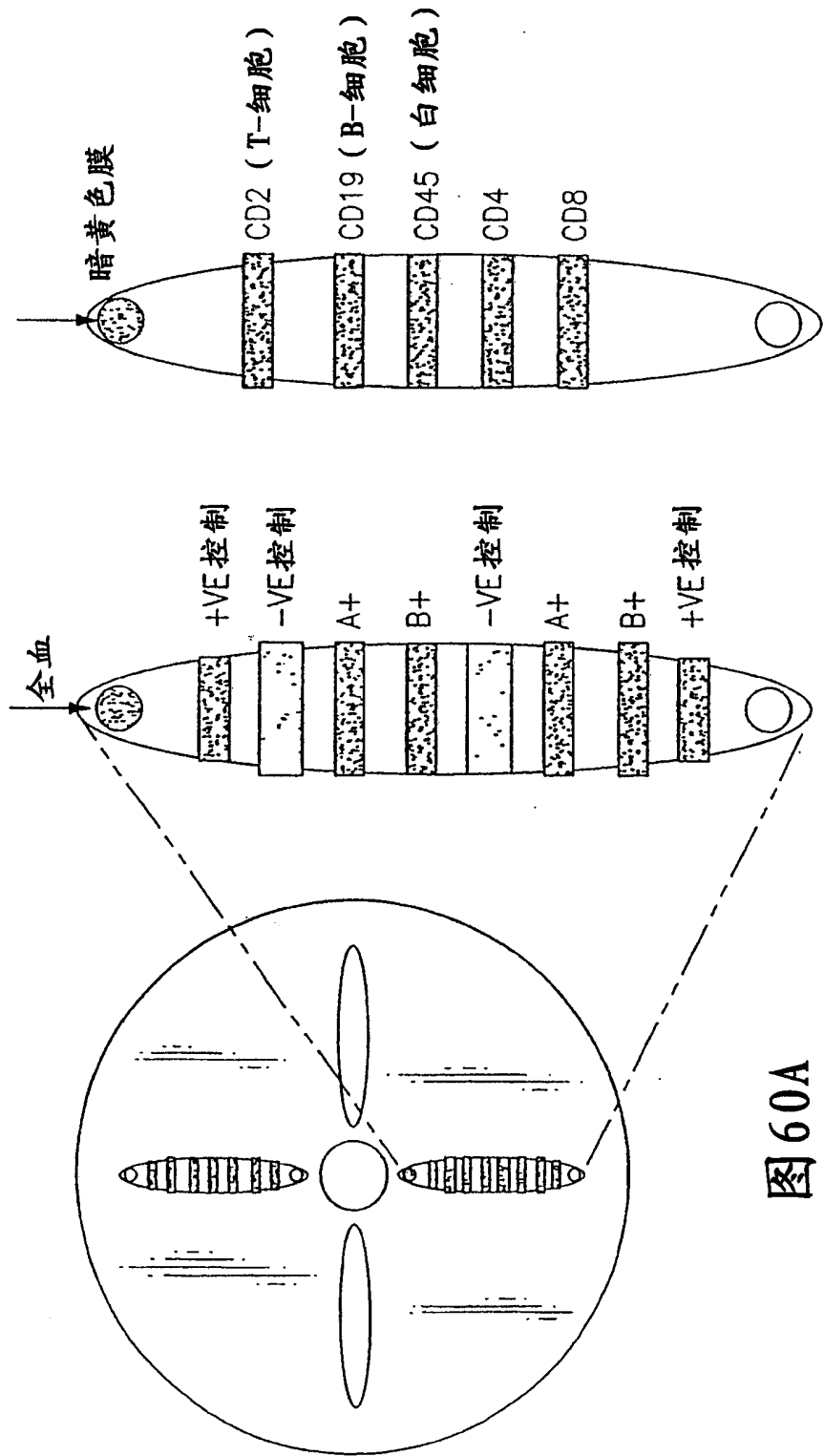


图60A

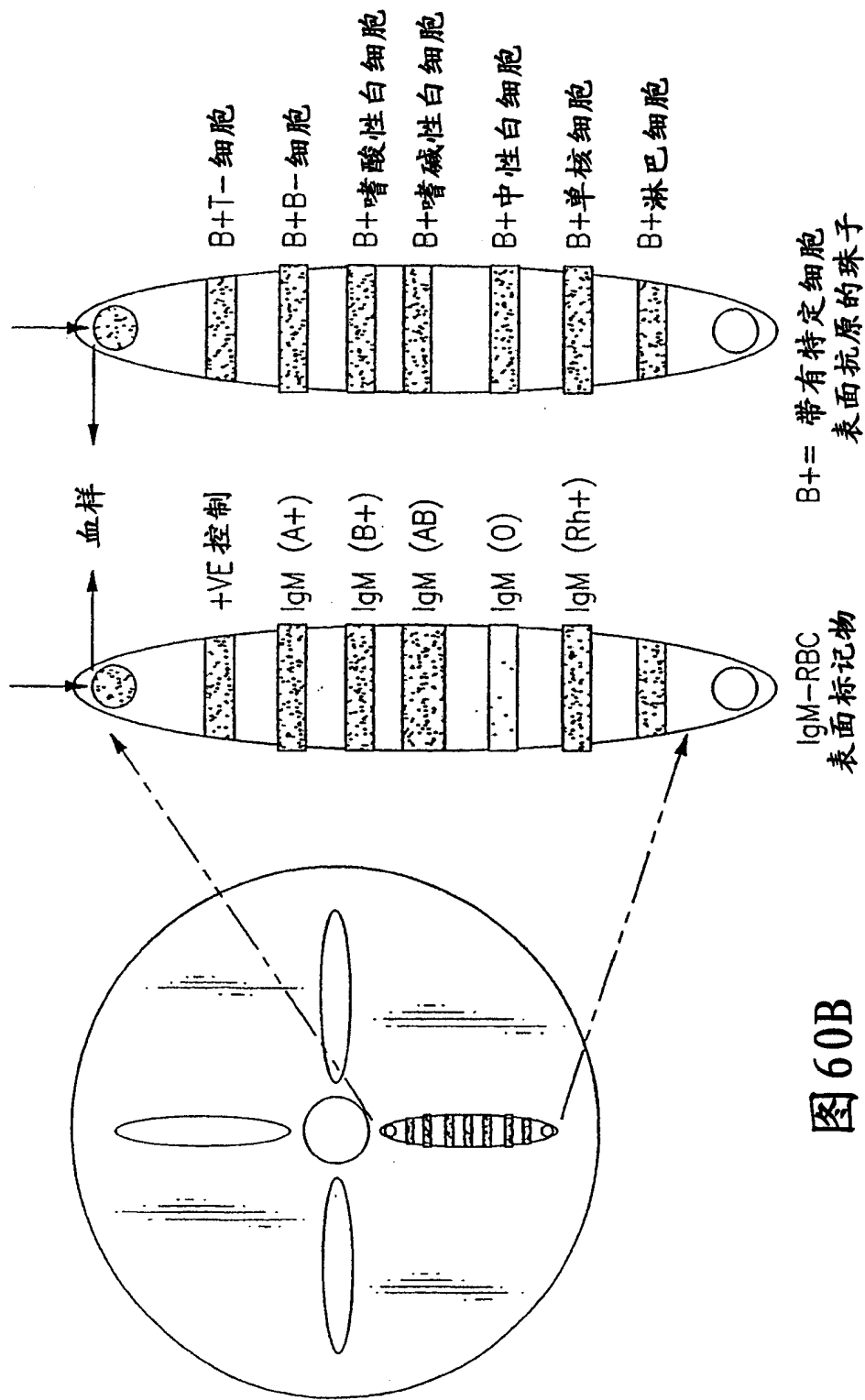


图60B

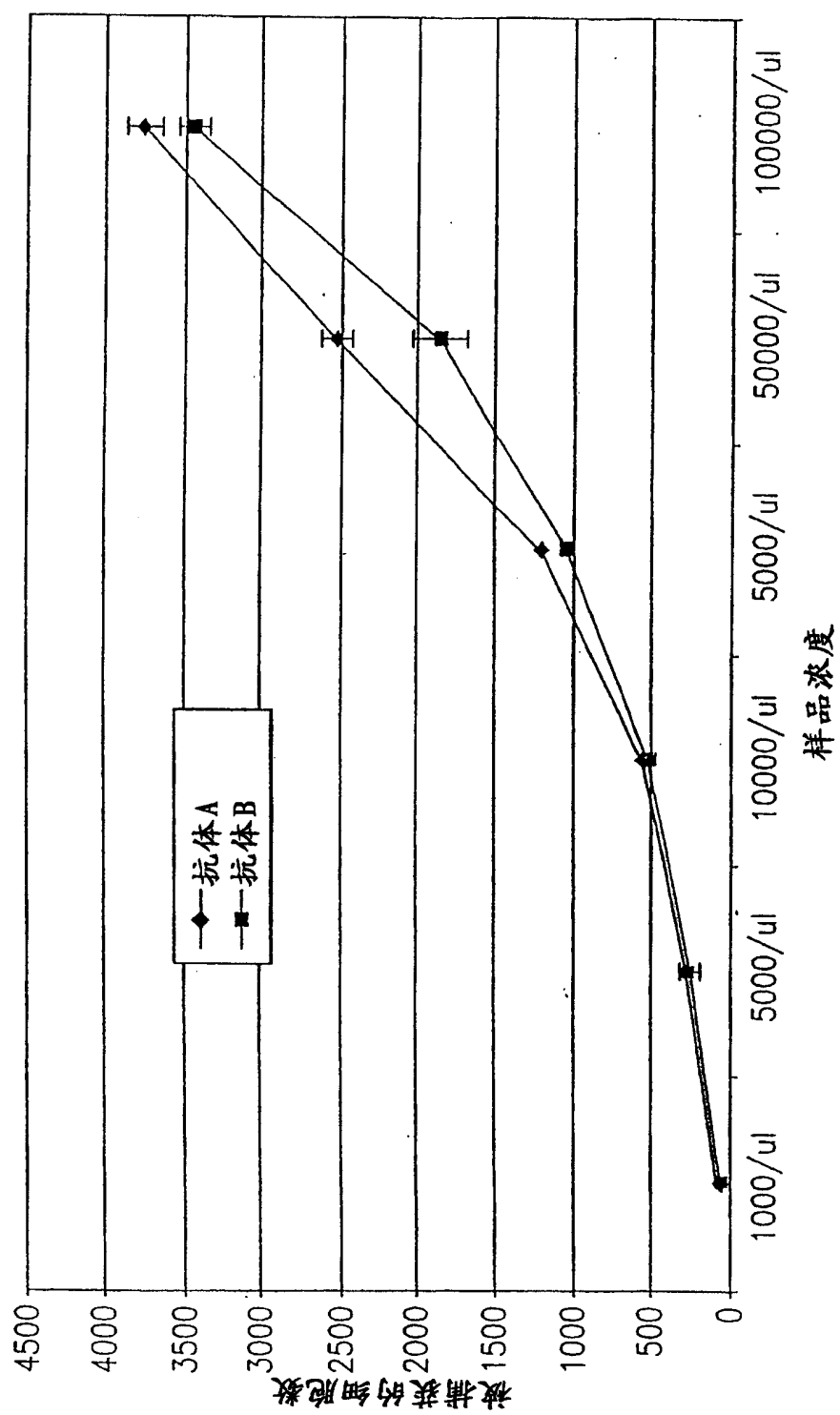


图61

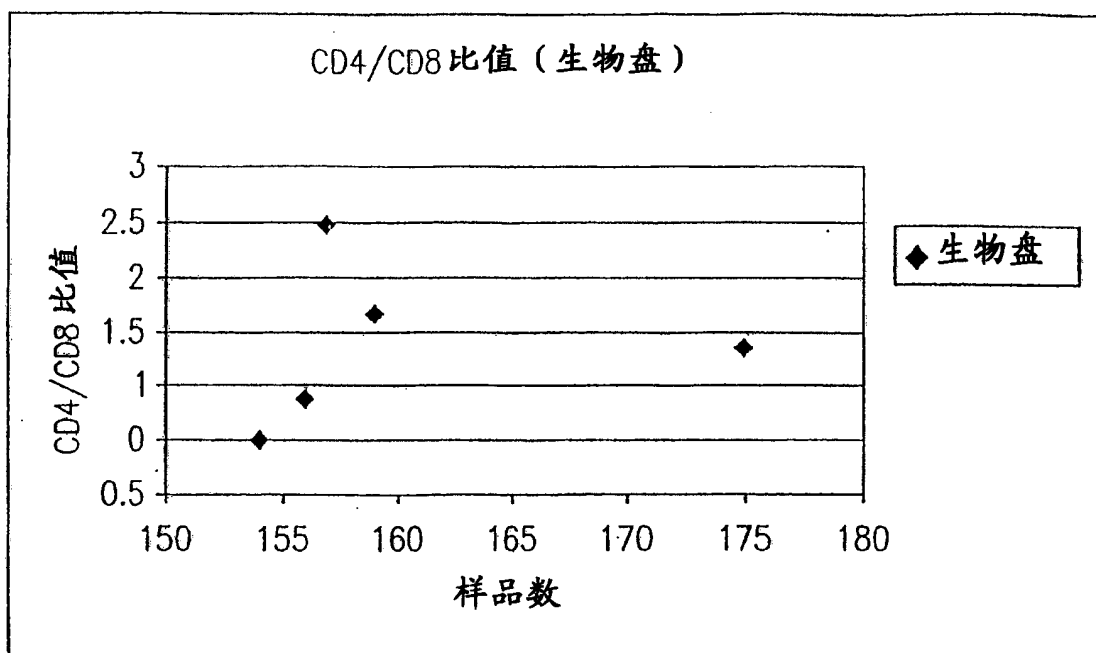


图 62A

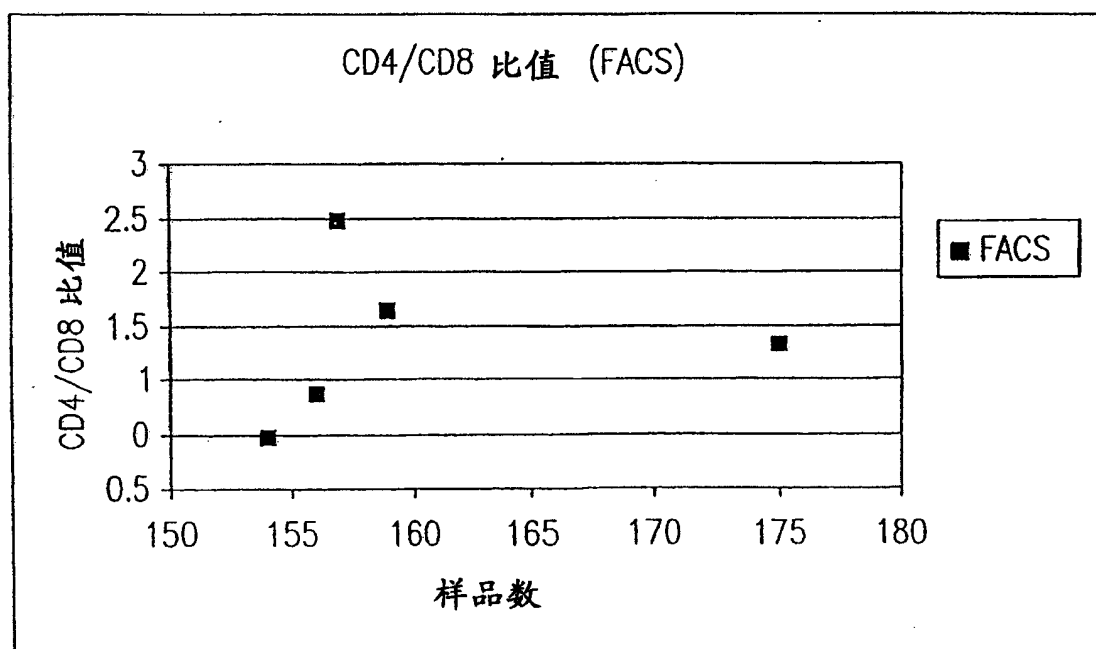


图 62