



등록특허 10-2090776



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년03월18일
(11) 등록번호 10-2090776
(24) 등록일자 2020년03월12일

- (51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 21/17 (2006.01) *G01N 21/03* (2006.01)
G01N 21/05 (2006.01) *G01N 21/64* (2006.01)
G01N 33/569 (2017.01) *G02B 7/09* (2006.01)
- (52) CPC특허분류
G01N 21/17 (2013.01)
G01N 21/0303 (2013.01)
- (21) 출원번호 10-2015-7004737
- (22) 출원일자(국제) 2013년07월25일
심사청구일자 2018년07월25일
- (85) 번역문제출일자 2015년02월25일
- (65) 공개번호 10-2015-0036757
- (43) 공개일자 2015년04월07일
- (86) 국제출원번호 PCT/US2013/052141
- (87) 국제공개번호 WO 2014/018805
국제공개일자 2014년01월30일
- (30) 우선권주장
61/675,811 2012년07월25일 미국(US)
(뒷면에 계속)
- (56) 선행기술조사문헌
KR101167649 B1
KR1019950700542 A
KR1020070107743 A
KR1020120080056 A

전체 청구항 수 : 총 14 항

심사관 : 박준영

(54) 발명의 명칭 생체시료의 이미지 분석 및 측정

(57) 요약

생체시료에 대한 측정과 이미지 분석을 위한 방법, 장치, 시스템, 및 기구가 제공되어 있습니다.

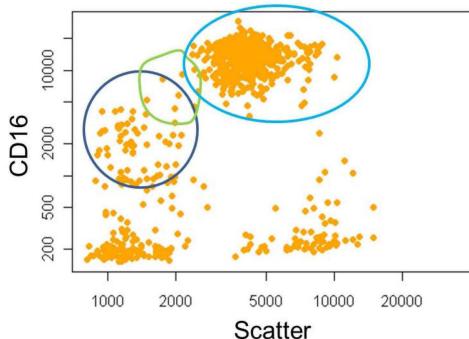
대 표 도 - 도1a

그림 1A

(52) CPC특허분류

G01N 21/05 (2013.01)
G01N 21/645 (2013.01)
G01N 33/56972 (2013.01)
G02B 21/088 (2013.01)
G02B 7/09 (2013.01)

(30) 우선권주장

61/676,178 2012년07월26일 미국(US)
61/766,116 2013년02월18일 미국(US)
61/802,194 2013년03월15일 미국(US)

명세서

청구범위

청구항 1

시료 분석을 위한 시스템으로서,

시료를 고정하도록 구성된 시료 소실(sample chamber)을 포함하는 시료 홀더(600)로서, 상기 시료 홀더의 적어도 일부분은 광투과성 재료를 포함하고, 상기 광투과성 재료는 광투과성 표면과 반사성 표면을 포함하는 것인 시료 홀더(600); 및

상기 광투과성 표면을 비추고 그를 통과하는 빛을 제공하도록 구성된 조명 광원(illumination source)(654);

시료를 이미지화하기 위해 사용되는 대물 렌즈(670)

를 포함하며,

상기 시료 홀더는, 상기 조명 광원으로부터의 빛이 시료 홀더 내의 시료에 에피조명과 트랜스조명 둘 다를 동시에 제공하는 데 효과적으로 구성되고, 에피조명은, 시료 홀더의 광투과성 재료의 표면에서 반사되지 않고 상기 조명 광원으로부터 상기 시료로 이동하는 빛을 포함하고, 트랜스조명은, 상기 조명 광원으로부터 나와 광투과성 재료 내에서 상기 광투과성 재료의 적어도 한 표면으로부터 적어도 한 번 반사된 후에 시료로 이동하는 빛을 포함하며,

상기 대물 렌즈는 에피조명과 트랜스조명 둘 다로부터의 시료로부터의 빛을 모으도록 구성되고,

상기 대물 렌즈는, 시료 홀더의, 조명 광원과 동일한 측에 위치하고, 상기 트랜스조명은 표면에서 빛의 내부 전반사에 의해 적어도 부분적으로 제공되는 것인 시스템.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 시료 홀더는, 시료를 고정하도록 구성된, 연장된 채널을 갖는 큐벳을 포함하는 것인 시스템.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 시료 홀더는 하나 이상의 광비투과성 표면을 포함하는 것인 시스템.

청구항 4

제2항에 있어서, 상기 큐벳은 직사각형 가로 단면 모양으로부터 선택되는 모양을 갖는 것인 시스템.

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 시료 홀더는 상기 조명 광원에 대해 상대적으로 복수의 위치로 이동 가능하며, 시료 홀더의 상기 광투과성 표면은 각각의 상기 위치에서 조명 광원에 의해 조명될 수 있는 것인 시스템.

청구항 6

제1항에 있어서, 상기 조명 광원은 환형광(ringlight)을 포함하는 것인 시스템.

청구항 7

제1항에 있어서, 지지대 구조물을 추가로 포함하며, 상기 지지대 구조물은 시료 홀더의 광투과성 표면과 맞물리는 모양으로 되어 있는 광투과성 표면을 포함하는 것인 시스템.

청구항 8

제1항에 있어서, 탐지기를 추가로 포함하며, 상기 탐지기는 시료 홀더 내의 채널의 적어도 일부분을 이미지화하도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 9

제8항에 있어서, 상기 시료 홀더는 시료의 적어도 일부분을 포함하도록 구성된 연장된 채널을 포함하며, 상기 탐지기는 시료 홀더 내의 연장된 채널 전체를 이미지화하도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 10

제8항에 있어서, 상기 시료 홀더는, 이미지화하는 동안, 시료를 정적인, 흐르지 않는 상태로 고정하도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 11

제8항에 있어서, 이미지화하는 동안, 시료 홀더는 시료의 한 부분을 정적인, 흐르지 않는 상태로 고정하고, 다른 부분은 흐르는 상태로 고정하도록 구성되는 것인 시스템.

청구항 12

제8항에 있어서, 상기 시료 홀더는, 시료 홀더에 완전히 가두어진 유체 회로(fluid circuit)를 추가로 포함하고, 상기 시료는, 시료가 상기 탐지기로부터 떨어져 있도록 하기에 효과적으로 상기 유체 회로 내에 위치하는 것인 시스템.

청구항 13

제12항에 있어서, 상기 시료 홀더는 탐지기에 대해 상대적으로 이동 가능한 것인 시스템.

청구항 14

제12항에 있어서, 상기 탐지기는 시료 홀더에 대해 상대적으로 이동 가능한 것인 시스템.

청구항 15

삭제

청구항 16

삭제

청구항 17

삭제

청구항 18

삭제

청구항 19

삭제

청구항 20

삭제

청구항 21

삭제

청구항 22

삭제

청구항 23

삭제

청구항 24

삭제

청구항 25

삭제

청구항 26

삭제

청구항 27

삭제

청구항 28

삭제

청구항 29

삭제

청구항 30

삭제

청구항 31

삭제

청구항 32

삭제

청구항 33

삭제

청구항 34

삭제

청구항 35

삭제

청구항 36

삭제

청구항 37

삭제

청구항 38

삭제

청구항 39

삭제

청구항 40

삭제

청구항 41

삭제

청구항 42

삭제

청구항 43

삭제

청구항 44

삭제

청구항 45

삭제

청구항 46

삭제

청구항 47

삭제

청구항 48

삭제

청구항 49

삭제

청구항 50

삭제

청구항 51

삭제

청구항 52

삭제

청구항 53

삭제

청구항 54

삭제

청구항 55

삭제

청구항 56

삭제

청구항 57

삭제

청구항 58

삭제

발명의 설명

기술 분야

배경기술

[0001] 피험자의 생체시료 분석은 건강 관련 진단이나 피험자의 감시 및/또는 치료를 위해 중요합니다. 생체시료 분석을 위한 다양한 방법이 알려져 있습니다. 그러나, 피험자에 대해 보다 좋은 진단, 감시 및/또는 치료를 위해 생체시료 분석을 개선할 필요가 있습니다.

참조를 통한 결합(INCORPORATION BY REFERENCE)

[0003] 본 명세서(문서)에서 언급된 모든 출판물, 특히 및 특허 신청은, 각각이 참조를 통해 결합되었다고 개별적으로 명시된 것과 동일한 정도로, 참조를 통해 결합되어 있습니다.

발명의 내용

[0004] 본 문서에서 서술된 방법, 장치, 시스템, 및 기구는 생체시료의 광학 및 이미지 분석 및/또는 측정에 유용한 것들입니다.

[0005] 본 문서에서 공개된 구현물에는, 생체시료를 포함하여 시료를 보관하는 데 적합하고, 광학적 검사, 광학적 측정, 및 기타 검사와 측정에 적합한 시료 홀더가 포함되어 있습니다. 구현에는, 광학적으로 투과되는 부분이 있고, 시료 홀더 내에서 빛의 내부 반사를 제공하도록 구성된 부분이 있는, 시료 홀더가 제공되어 있습니다. 구현에서, 내부 반사에는 빛의 부분 내부반사가 포함될 수도 있고, 빛의 내부 전반사가 포함될 수도 있습니다. 외부 광원으로부터의 입사광과 시료 홀더의 측면에서 들어 오는 입사광은, 다양한 방향에서, 시료 홀더 내의 시료에 조명을 제공하는 데 효과적입니다. 구현에서, 시료 홀더의 한 측면에 배치된 외부 광원은 시료 홀더 내의 시료에 대해 에피조명(epi-illumination)을 제공할 수도 있으며, 시료 홀더 내에서 시료에 대해 트랜스조명(trans-illumination)을 제공할 수도 있고, 시료 홀더 내에서 시료에 대해 에피조명과 트랜스조명 모두를 제공할 수도 있습니다.

[0006] 본 문서에서 노출된 구현에는 시료를 고정하는 데 알맞은 시료 홀더 같은 시스템이 포함되어 있습니다. 이런 시스템은 생체시료를 포함하여 시료를 검사하고 측정하는 데 적합합니다. 이런 검사와 측정에는, 예를 들어, 광학적 검사, 광학적 측정 및 기타 검사 및 측정 등이 포함됩니다. 구현에서, 광학적으로 전달되는 부분이 있고, 시료 홀더 내에서 빛의 내부 반사를 제공하도록 구성된 부분이 있는, 시료 홀더로 이루어진 시스템이 본 문서에서 공개되어 있습니다. 구현에서, 본 문서에서 공개된 시스템의 시료 홀더 내의 내부 반사는 빛의 내부 부분반사를 포함할 수도 있고, 빛의 내부 전반사를 포함할 수도 있습니다. 본 문서에서 공개된 시스템에는 광원이 포함될 수도 있습니다. 시료 홀더 외부의 광원으로부터의 입사광과 시료 홀더의 측면에서 들어 오는 입사광은, 다양한 방향에서, 시료 홀더 내의 시료에 조명을 제공하는 데 효과적입니다. 구현에서, 시료 홀더의 한 측면, 외부에 배치된 광원은 시료 홀더 내의 시료에 대해 에피조명(epi-illumination)을 제공할 수도 있으며, 시료 홀더 내에서 시료에 대해 에피조명과 트랜스조명 모두를 제공할 수도 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템에는 탐지기 한 대 또는 여러 대가 포함될 수 있습니다. 이런 탐지기에는 광학 탐지기가 포함될 수 있으며 다른 탐지기들도 포함될 수 있습니다. 이런

탐지기들은 시료와 대상물의 측정, 시료 홀더 내의 시료와 대상물의 특성 및 측정에 알맞으며, 이런 것들을 측정하도록 구성되어 있습니다. 이런 측정에는 정량적 측정과 정성적 측정이 포함될 수 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템의 구현에는 필터, 조리개, 격자, 렌즈 및 기타 광학 소자가 포함될 수 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템의 구현에는 시료 홀더, 광원, 렌즈, 필터 또는 본 문서에 공개된 시스템의 기타 소자 및 부품의 위치를 설정하고, 이동하고, 조정하기 위한 기계적 장치가 포함될 수 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템의 구현에는 시료를 전달, 균등 분할, 고정, 가열, 혼합, 착색(또는 염색), 조절 또는 기타 준비, 조작 또는 변형 등을 위한 부품이나 소자가 포함될 수 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템의 구현에는 시료를 이전, 고정, 충전(filling), 또는 기타 조작하기 위한 부품 및 소자가 포함될 수 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템의 구현에는 시료의 물리적 조작 및 취급, 시료 홀더의 물리적 조작을 위한 부품과 소자가 포함될 수도 있습니다. 이런 부품과 소자가 포함된 경우, 제한 없이, 피펫, 펌프, 원심 분리기, 시료, 시료 홀더, 피펫 텁, 용기와 시료용 시약 등을 이동 및 조작하기 위한 기타 기계적 장치가 포함될 수 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템의 구현에는 시료에 대한 화학적 분석, 핵산 분석, 단백질 분석, 일반 화학 분석, 전기화학적 분석 및 기타 분석을 위한 부품과 소자가 포함될 수 있습니다.

[0007] 본 문서에 공개된 시료 홀더와 시스템 및 방법은 임상 검사실(또는 연구실), 연구실, 임상실, 병원, 진료실, 서비스 제공 현장 및 기타 적합한 장소에서 사용되거나 수행될 수 있습니다. 본 문서에 공개된 시료 홀더로 고정된 시료, 본 문서에 공개된 시스템과 방법을 사용하여 검사되는 시료에는 모든 생체시료(biological sample)가 포함되거나 작은 (양의) 생체시료가 포함될 수 있습니다. 구현에서, 시료는 소량의 혈액 채취 또는 뇨 시료(소변 샘플)가 될 수 있으며, 부피가 약 250 μL 이하 이거나 약 150 μL 이하 이거나 약 100 μL 이하 이거나 약 50 μL 이하 이거나 약 25 μL 이하 이거나 약 15 μL 이하가 될 수 있으며, 팁거스틱(finger-stick)으로 채취한 혈액양과 같거나 작을 수도 있습니다.

[0008] 한 구현에서, 시료 세포 모집단의 세포들 중에서 관심 성분을 측정하기 위한 방법이 다음과 같이 제공됩니다. a) 시료 세포 집단의 세포들 중에서 표지자(marker) 존재를 정량적으로 측정합니다; b) 부분 a)의 측정을 기반으로, 컴퓨터를 이용하여, 시료 세포 집단에서 세포의 근사적인 양을 결정하고; c) 부분 b)의 결과를 기반으로, 시료에 추가할 시약의 양을 선택합니다. 여기에서 시약은 세포 집단의 세포들 중에서 관심 성분과만 결합하고 즉시 탐지 가능하도록 구성되어야 합니다; d) 부분 c)의 결과를 기반으로, 선택한 양의 시약을 시료에 추가합니다; e) 관심 성분과 결합한 시약에 대해 시료의 세포를 분석 검사합니다; f) 관심 성분과 결합한 시약의 양을 기반으로, 시료 세포 집단의 세포들 중에서 관심 성분의 양을 결정합니다. 해당 방법의 구현에서, 부분 c)의 시약은 항체입니다.

[0009] (특히) 신청자는 시료 세포 집단의 세포들 중에서 관심 성분의 측정 방법을 본 문서에서 다음과 같이 추가 공개합니다: a) 시료 세포 집단의 세포들 중에 표지자의 존재 양 또는 세포들의 특성을 정량적으로 측정합니다; b) 부분 a)의 측정을 기반으로, 컴퓨터를 이용하여 시료 세포 집단에 존재하는 세포의 근사적인 양을 결정합니다; c) 시료에 세포 표지자(cell marker)의 특정 양을 추가합니다. 여기에서 추가된 세포 표지자의 양은 부분 b)의 결과를 기반으로 하며, 세포 표지자는 세포 집단의 세포들 중에서 관심 성분과만 결합하고 즉시 탐지할 수 있어야 합니다; d) 관심 성분과 결합한 표지자에 대해 시료의 세포를 분석 검사(assay)합니다; e) 관심 성분과 결합한 표지자의 양을 기반으로 시료 세포 집단의 세포들 중에서 관심 성분의 양을 결정합니다.

[0010] 한 다른 구현에서, 현미경의 초점을 맞추는 다음과 같은 방법이 제공되었습니다; a) 시료와 기준 입자가 들어 있는 혼합물을 만들기 위해, 현미경 분석용 대상물이 들어 있는 시료와 크기를 알고 있는 기준 입자를 혼합합니다; b) 단계 a)의 혼합물을 현미경의 광로(light path)에 넣습니다; c) 기준 입자를 시작적으로 표시하도록(눈에 보이도록) 구성된 광선(light beam)에 단계 a)의 혼합물을 노출합니다; d) 혼합물 내의 기준 입자의 위치를 기반으로 또는 기준 입자의 이미지 선명도를 기반으로 현미경의 초점을 조정합니다.

[0011] 한 다른 구현에서, 다수의 세포가 포함되어 있는 시료에서 특정 세포를 식별하기 위해 다음과 같은 방법이 제공되어 있습니다: a) 다음 중 적어도 하나에 대해 다수 세포들 중에서 특정 세포를 분석 검사합니다: (i) 세포 표면 항원의 존재; (ii) 세포 표면 항원의 양; 또는 (iii) 세포 크기; b) 다음 중 적어도 하나에 대해 a)의 세포를 분석 검사합니다: (i) 핵 크기; 또는 (ii) 핵 모양; 및 c) 정량적 세포 빛 산란 양에 대해 a)와 b)의 세포를 분석 검사합니다, 여기에서 다수의 세포가 들어 있는 시료에서 세포를 식별하기 위해 단계 a), b) 및 c)에서 얻은 정보를 조합하여 사용합니다.

[0012] 다른 한 구현에서, 검사할 시료를 고정하는 시료 홀더용 탐지기 어셈블리 시스템이 제공되어 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 시료 홀더는 특정 위치에서 탐지기 어셈블리와 맞물려 이동할 수 있도록 해주는 기능 및/또는

재료가 들어 있는 큐벳(cuvette)입니다. 일부 구현에서, 탐지기 어셈블리에는 첫째 표면이 있습니다. 이 첫째 표면은, 둘 사이의 접점(interface)이 탐지기 어셈블리에서 시료 홀더의 시료로 통하는 광로에서 광학적 간섭을 일으키지 않는 방식으로, 시료 홀더의 면이 맞물리도록 구성되어 있습니다. 한 구현에서, 탐지기 어셈블리에는 하나 이상의 시료 홀더를 위한 하나 이상의 위치가 있을 수 있습니다. 일부 구현에는 각 위치에 대해 동일한 시료 홀더가 있을 수 있습니다. 선택적으로, 일부 구현에는 탐지기 어셈블리와 연관된, 적어도 몇몇 위치에 대해 다른 시료 홀더가 있을 수 있습니다.

[0013] 본 문서에 설명된 한 구현에서, 다음과 같은 기능 또는 특성(그러나 이것들에만 국한하지 않음)을 갖고 있는 큐벳이 들어 있는 시료 홀더가 제공되어 있습니다. 이 큐벳에는 광학적 특성, 치수, 재질(또는 재료), 및/또는 물리적 특성이 있고, 이로 인해 큐벳은 탐지기 어셈블리로 분석할 시료를 고정하고, 시료가 탐지기 어셈블리와 물리적으로 떨어져 있도록 하여 직접 접촉하지 않도록 해줍니다. 이것은 특히 유형 성분(shaped members)이 들어 있는 시료액(sample fluids)에 특히 유용합니다.

[0014] 본 문서에 설명된 한 구현에서, 탐지기 어셈블리에는 하나의 다중채널 현미경 장치가 있을 수 있습니다. 이 다중채널 현미경 장치는, 모든 동일한 장치에서, 시료의 세포 또는 세포들의 모양, 물리적, 광학적, 및 생화학적 특성을 탐지, 확보, 또는 측정하도록 구성되어 있습니다. 이 장치는 정량적 정보와 사실적 정보(descriptive information) 모두를 제공할 수 있습니다. 탐지기 어셈블리의 한 구현에서 동일한 색 또는 동일한 파장의 다수 표지자(markers)을 사용할 수 있습니다. 여기에서, 탐지기 어셈블리는 시료에 들어 있는 이런 표지자(예를 들어, 시료의 세포에 결합되어 있는 표지자)에서 나오는 신호를 분리하여(deconvolute) 어셈블리에서 필요한 분광 채널과 광원의 개수를 감소할 수 있도록 해줍니다.

[0015] 본 문서에 설명된 일부 구현에는 다음과 같은, 그러나 이것에만 국한하지 않고, 큐벳이 들어 있는 시료 홀더가 포함되어 있을 수 있다는 것을 명심해야 합니다. 이 큐벳은, 큐벳 재질의 모양의 물리적 특성으로 인해, 일부 기능은 광반사율(light reflectance)(큐벳 내에서의 광반사율을 포함하나 이것에만 국한되지는 않음)을 제공하고 일부 기능은 기계적 지지(mechanical support)를 위해 선택적으로 구성할 수 있는 곳에서 암시야 조명(darkfield illumination)을 증가시킵니다. 이런 구현에서 일부 기능은 기계적 지지를 제공하면서도 광반사율을 제공합니다. 구현에서, 시료 홀더는 시료 홀더 내의 광반사를 이용하여 시료의 트랜스조명(trans-illumination)을 제공하도록 구성됩니다. 구현에서, 시료 홀더는 시료 홀더 내의 광반사를 이용하여 시료의 트랜스조명(trans-illumination)을 제공하도록 구성됩니다. 이런 반사율은 내부 부분 반사(PIR: partial internal reflection)를 포함할 수도 있고 이런 반사율은 내부 전반사(TIR: total internal reflectance)를 포함할 수도 있습니다. 구현에서, 시료 홀더는 시료 홀더 내의 광반사를 이용하여 시료의 트랜스조명(trans-illumination)을 제공하도록 구성됩니다. 여기에서, 반사광의 광원은 광학 장치가 빛을 탐지 또는 측정하도록 시료 홀더와 같은 쪽에 배치됩니다(즉, 광원은 에피조명(epi-illumination) 광원입니다).

[0016] 여기에서 시스템은 암시야 이미징(darkfield imaging)에서 에피(직접) 조명과 트랜사(반사) 조명 모두에 동시에 사용할 수 있습니다. 이것은, 에피조명이나 트랜스조명 중에서 한 가지만 사용하고 두 종류의 조명 모두를 사용하지 않으며, 단일 광원 또는 단일 방향이나 위치에서 나오는 두 종류의 조명 모두를 사용하지 않는 기준의 암시야 이미징과는 다릅니다. 그러므로, 본 문서에서 공개된 에피조명과 트랜스조명의 조합은 기준에 알려져 있는 시스템과는 다릅니다. 여기에서 트랜스조명은 에피조명과 동일한 광원에서 생성된 것입니다. 선택적으로, 큐벳 같은 모양이 있는 시료 홀더를 사용하여 트랜스조명을 제공할 수 있습니다. 구현에서, 모양이 있는 시료 홀더를 구성하여 반사광으로 트랜스조명을 제공하도록 구성할 수 있습니다. 구현에서, 모양이 있는 시료 홀더는 시료 홀더 내의 광반사를 이용하여 시료의 트랜스조명을 제공하도록 구성됩니다. 구현에서, 하나 이상의 크기, 모양, 표면, 재질 또는 기타 특성이 있는 유형(모양이 있는) 시료 홀더는 유형 시료 홀더 내에서 빛의 내부 부분반사(PIR: partial internal reflection)를 제공하는 데 효과적입니다. 구현에서, 하나 이상의 크기, 모양, 표면, 재질 또는 기타 특성이 있는 유형(모양이 있는) 시료 홀더는 유형 시료 홀더 내에서 빛의 내부 전반사(TIR: total internal reflection)를 제공하는 데 효과적입니다. 선택적으로, 트랜스조명의 세기는 무시할 수 없습니다. 구현에서, 유형 시료 홀더에는 트랜스조명의 광도(빛의 세기, light intensity)를 증가하는 데 효과적인 반사 표면(reflective surface)이 포함되어 있습니다. 암시야 광원은 발광 다이오드(LED), 레이저 또는 원하는 조명 및/또는 여기 파장(excitation wavelength)을 제공할 수 있는 기타 조명 광원이 될 수 있습니다.

[0017] 한 구현에서, 현미경의 대물부(microscope objective)와 (암시야 현미경용) 환형광(ringlight) 같은(그러나 이것에만 국한되지 않고) 광원을 이것들 사이에 물리적 거리로 떨어져 있게 결합하면 탐지기 어셈블리를 소형으로

구성할 수 있습니다. 한 구현에서, 원하는 과장 또는 원하는 과장 범위 내의 빛만 시료에 도달하도록 합니다. 한 구현에서, 빛은 비편광(non-polarized light)입니다. 다른 구현에서, 빛은 편광(polarized light)입니다.

[0018] 다른 한 구현에서, 혈구계산 분석표(cytometry assay, 이하 번역에서 cytometry는 세포계산(학), assay는 분석 검사로 번역함)에 들어 있는, 시료 준비 단계 및/또는 분석 단계의 정보는 다음(2차) 절차를 유도하거나 시작하는 데 사용됩니다. 구현에서, 이런 2차 절차는 사람이 직접 검토하도록 주의를 주기 위한 것일 수도 있습니다. 구현에서, 이런 2차 절차는 분석 검사(assay)의 성능을 향상하기 위해 절차의 시료 준비 단계 동안 획득한 예상 세포 개수 또는 기타 정보를 사용하기 위한 것일 수도 있습니다. 여기에서 이런 분석 검사는 해당 절차의 나중 단계의 분석 검사가 될 수도 있으며 다른 절차의 분석 검사가 될 수도 있습니다.

[0019] 세포 개수를 계산하는 기법은 불규칙한 모양 및/또는 소실 표면(chamber surface, 이하 chamber는 소실로 번역)이 있는 시료 홀더를 처리하는 방식을 제공할 수도 있습니다. 한 가지 방법은 다음과 같이 구성됩니다: a) 시료의 알려진 용적을 분석 영역(시료 홀더 속에 채널 같은 것)에 도입하기 위해 용적이 표시된(volume-metered) 채널 기법을 사용합니다. 이 방법은 시료 홀더에 들어 있는 모든 세포들의 개수를 셀 수도 있습니다. 시료의 용적(부피)을 알고 있으므로, 용적 내의 세포 농도도 알 수 있습니다(이것은 소수성(hydrophobic) 용기나 큐벳 또는 이런(소수성) 표면으로 된 소실이 있는 시료 홀더에서 수행할 수 있습니다). 다른 한 가지 방법은 다음으로 구성됩니다: b) 시료를 알려진 양의 비드(bead)와 혼합하기 위한 비율 기반 측정 기법(ratio-based metric technique)입니다. 이것은 관찰 대상 비드의 개수를 기반으로 시료 내의 세포 농도를 계산하는 데 사용됩니다.

[0020] 본 문서에 설명된 다른 한 구현에서, 적혈구(RBC)를 구모양(spherical shapes)으로 상당히 간주하여 혈액 시료 속의 적혈구 같은(그러나 이것에만 국한되지 않고) 형성된 성분을 측정하고, 암시야 현미경으로 적혈구를 측정하는 방법이 제공되어 있습니다.

[0021] 본 문서에 설명된 다른 한 구현에서, 혈소판 용적(부피)을 측정하는 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법에는 형광 염료(fluorescent dye)로 혈소판을 착색하고 관찰된 혈소판의 크기를 측정하는 방법이 포함되어 있습니다. 알려진 크기의 비드(bead)를 시료에 추가하고, 혈소판 크기를 측정하고 시료 내의 혈소판 용적(부피)을 측정하기 위한 척도(calibration)로 비드를 사용하고, 비드의 관찰된 크기를 혈소판의 관찰된 이미지와 비교합니다.

[0022] 본 문서에 설명된 다른 구현에서, 시료 내의 세포 모양(cell morphology)을 탐지하고 측정하는 방법이 제공되어 있습니다. 입자를 탐지하고 입자 개수를 측정하고 결정(crystal) 조직을 탐지하고 결정 개수를 측정하고 세포군(cell aggregates)을 탐지하고 세포군의 개수를 측정하고 시료 내의 기타 특성과 수량을 측정합니다.

[0023] 따라서, 신청자는 본 문서에서 다음을 공개합니다:

[0024] 시료 분석용 시스템은 다음과 같이 구성됩니다: 시료 홀더는 해당 시료를 담기 위한 시료 소실(chamber)로 구성되어 있으며, 해당 시료 홀더의 적어도 한 부분은 광전달성(optically transmissive) 재질로 구성되고, 해당 광전달성 재질은 광전달성 표면과 반사성(reflective) 표면으로 구성됩니다. 조명 광원은 해당 광전달성 표면을 조명 및 투과하는 빛을 제공하도록 구성되어 있습니다. 여기에서, 해당 시료 홀더는, 해당 조명 광원으로부터 발생한 해당 빛이 에피조명과 트랜스조명 모두를 시료 홀더의 시료에 동시에 제공하는 데, 효과적이도록 구성되어 있습니다. 여기에서, 에피조명은, 해당 조명 광원에서 해당 시료로, 시료 홀더의 광전달성 재질의 표면에서 반사되지 않고 전달되는 빛으로 구성되고, 트랜스조명은, 광전달성 재질 내에서 시료로, 해당 광전달성 재질의 적어도 한 표면에서 적어도 한 번은 반사되는 빛으로 구성됩니다. 구현에서, 본 문서에서 공개된 기능을 갖춘 시스템의 시료 홀더에는 시료를 고정하기 위한 연장된 채널(elongated channel)이 있을 수 있습니다. 구현에서, 시료 홀더에는 한 개 이상의 광비전달성(optically non-transmissive) 표면이 있을 수 있습니다.

[0025] 본 문서에 공개된 시스템의 구현에서, 해당 트랜스조명은 표면에서 빛의 내부 반사를 통해 적어도 부분적으로 제공되었을 수도 있으며, 큐벳 내부에서 빛의 내부 전반사(total internal reflection)로 적어도 부분적으로 제공되었을 수도 있습니다. 본 문서에 공개된 시스템의 구현에서, 해당 트랜스조명은 표면에서 빛의 내부 부분반사를 통해 적어도 부분적으로 제공되었을 수도 있으며, 큐벳 내부에서 빛의 내부 부분반사로 적어도 부분적으로 제공되었을 수도 있습니다.

[0026] 구현에서, 시료 홀더에는 시료를 보관하기 위해 둘 이상의 시료 소실(sample chamber)이 있을 수 있습니다. 본 문서에서 공개된 기능이 구비된 시료 홀더(예: 큐벳)는 사각형 가로 단면 모양, 또는 원형 가로 단면 모양, 또는 톱니 세로 단면, 또는 계단 세로 단면, 또는 기타 다른 모양으로 되어 있을 수 있습니다.

[0027] 구현에서, 시료 홀더는 조명 광원에 대해 상대적으로 이동할 수 있으며 다수의 위치로 이동할 수도 있습니다.

여기에서, 시료 홀더의 광전달성 표면은 각 위치에서 조명 광원에 의해 조명될 수도 있습니다.

[0028] 구현에서, 조명 광원에는 환형광(ring light)이 포함될 수도 있습니다. 구현에서, 환형광은 발광 다이오드(LED) 기반 환형광과 레이저 기반 환형광 중에서 선택할 수도 있습니다.

[0029] 구현에서, 본 문서에 공개된 시스템에는 시료 홀더의 광전달성 표면과 맞물리도록 모양이 형성된, 광전달성 표면이 있는 지지 구조물이 포함되어 있을 수 있습니다.

[0030] 구현에서, 본 문서에 공개된 시스템에는, 원하는 위치에서 조명 광원으로 조명하기 위해, 시료 홀더를 유지하도록 구성된 압축 장치가 있을 수 있습니다.

[0031] 구현에서, 본 문서에 공개된 시스템에는 시료 홀더의 채널의 적어도 한 부분에 대해 이미지를 확보하도록 구성된 탐지기가 있을 수 있습니다.

[0032] 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 홀더에는 시료의 적어도 한 부분을 포함하도록 구성된 확장된 채널이 있을 수 있습니다. 여기에서, 탐지기는 시료 홀더에서 전체 확장된 채널에 대해 이미지를 확보하도록 구성되어 있습니다.

[0033] 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 홀더는 이미지를 확보하는 동안 정적 및 고정(non-flowing) 방식으로 시료를 고정하도록 구성할 수 있습니다. 구현에서, 시료 홀더는 정적 및 고정된 방식으로 시료의 일부분을 고정하고 유동(flowing) 방식으로 다른 부분을 고정하도록 구성할 수도 있습니다.

[0034] 구현에서, 본 문서에 공개된 조명 광원은 시료 홀더에 대해 상대적으로 이동할 수 있습니다.

[0035] 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 홀더는 이미지를 확보하는 동안 유동(flowing) 방식으로 시료를 고정하도록 구성할 수 있습니다.

[0036] 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 홀더에는 시료 홀더에 완전히 제한된 유체 회로(fluid circuit)가 들어 있을 수 있습니다. 여기에서, 시료는 해당 유체 회로 내에 위치하고, 해당 시료는 해당 탐지기에서 떨어진 상태로 유지됩니다.

[0037] 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 홀더는 탐지기에 대해 상대적으로 이동할 수 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 탐지기는 시료 홀더에 대해 상대적으로 이동할 수 있습니다.

[0038] 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 홀더와 조명 광원은 적어도 광학 분석 장치(optical analysis unit)의 일부분을 구성하고, 이 시스템에는 시료에 대해 임상 분석을 수행하도록 구성된 임상 분석 장치(clinical analysis unit)가 추가로 포함되어 있습니다.

[0039] 구현에서, 본 문서에 공개된 시스템은 단일 시료의 부분 표본(aliquot)을 광학 분석 장치와 임상 분석 장치에 제공하도록 구성됩니다. 이렇게 하여, 임상 분석 장치와 광학 분석 장치는 시료의 일부분에 대해 광학 분석(optical analysis)과 임상 분석(clinical analysis)을 동시에 수행할 수 있습니다. 구현에서, 이런 임상 분석은 일반 화학 분석, 핵산 분석, 효소 연결 결합 분석(enzyme-linked binding analysis) 중에서 선택할 수 있습니다.

[0040] 구현에서, 본 문서에 공개된 시스템에는 다수의 임상 분석 장치가 포함될 수도 있습니다. 여기에서, 각각의 임상 분석 장치는 일반 화학 분석, 핵산 분석, 및 효소 연결 결합 분석 중에서 선택하여 임상 분석을 제공하도록 구성될 수 있습니다.

[0041] 신청자들은 시료를 담기 위한 시료 소실(sample chamber)이 있는 큐벳을 추가로 제공하고, 해당 큐벳의 적어도 일부분은 광전달성 재질로 구성되고, 해당 광전달성 재질은 광전달성 표면과 반사성 표면으로 구성됩니다. 여기에서, 해당 광전달성 표면과 해당 반사성 표면은, 광전달성 표면을 통과한 빛이 시료 소실 속의 해당 시료에 에피조명과 트랜스조명 모두를 동시에 제공하도록, 효과적으로 구성됩니다. 여기에서 에피조명은, 해당 조명 광원에서 시료로, 광전달성 재질의 표면에서 반사되지 않고 이동하는 빛으로 구성되고, 트랜스조명은, 광전달성 재질 내에서 시료로, 해당 광전달성 재질의 적어도 한 표면에서 적어도 한 번을 반사되어 전달되는 빛으로 구성됩니다.

[0042] 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 확장 채널이 있는 시료 소실이 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 시료를 보관하기 위해 둘 이상의 시료 소실이 있습니다.

[0043] 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 한 개 이상의 광비전달성(optically non-transmissive) 표면이 있을 수

있습니다.

[0044] 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 트랜스조명이 제공되어 있을 수 있습니다. 이 큐벳 내부에는 적어도 부분적으로 빛의 내부 반사가 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 트랜스조명이 제공되어 있을 수 있습니다. 이 큐벳의 표면에서 적어도 부분적으로 빛의 내부 반사가 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 트랜스조명이 제공되어 있을 수 있습니다. 이 큐벳의 표면에서 적어도 부분적으로 빛의 내부 전반사가 있습니다.

[0045] 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 사각형 가로 단면 모양이 있을 수 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 원형 가로 단면 모양이 있을 수 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 텁니 세로 단면 모양이 있을 수 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 큐벳에는 계단형 세로 단면 모양이 있을 수 있습니다.

[0046] 신청자들은 본 문서에서 방법들을 공개합니다. 예를 들어, 다음과 같이 신청자들은 다수의 세포들이 들어 있는 시료에서 세포를 식별하는 방법을 공개합니다: (a) 시료를 담기 위한 시료 소실이 있는 시료 홀더에 해당 시료를 넣습니다. 해당 시료 홀더의 적어도 한 부분에는 광전달성 재질이 있고, 해당 광전달성 재질에는 광전달성 표면과 반사성 표면이 있습니다. 여기에서, 해당 광전달성 표면과 해당 반사성 표면은 시료 소실에 들어 있는 시료에 에피조명과 트랜스조명을 동시에 제공하도록 효과적으로 구성되어 있습니다. 여기에서, 에피조명은, 해당 조명 광원에서 시료로, 광전달성 재료의 표면에서 반사되지 않고 전달되는 빛으로 구성되고, 트랜스조명은, 광전달성 재료 내에서 시료로, 해당 광전달성 재료의 적어도 한 표면에서 적어도 한 번은 반사하여 전달되는 빛으로 구성됩니다. (b) 해당 시료 홀더에 대한 조명은 시료에 대해 에피조명과 트랜스조명 모두를 동시에 제공하는 데 효과적이며 (c) 시료 내의 특정 세포를 식별합니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 방법들에는, 해당 시료 소실의 적어도 한 부분을 이미징하도록 구성된 탐지기를 사용하여, 해당 세포를 식별하는 방법이 포함되어 있습니다. 본 문서에 공개된 구현에서, 이런 방법에 사용할 시료 소실에는 확장 채널이 있을 수 있습니다.

[0047] 본 문서에서 신청자들은 현미경의 초점을 맞추는 다음과 같은 방법을 추가로 공개합니다; a) 시료와 기준 입자가 들어 있는 혼합물을 만들기 위해, 현미경 분석용 대상물이 들어 있는 시료와 크기를 알고 있는 기준 입자를 혼합합니다; b) 단계 a)의 혼합물을 현미경의 광로에 넣습니다; c) 기준 입자를 시각적으로 표시하도록 구성된 광선(light beam)에 단계 a)의 혼합물을 노출합니다; d) 혼합물 내의 기준 입자의 위치를 기반으로 또는 기준 입자의 이미지 선명도를 기반으로 현미경의 초점을 조정합니다.

[0048] 다음과 같이 신청자들은 다수의 세포들이 들어 있는 시료에서 세포를 식별하는 방법을 공개합니다: (a) 적어도 다음 중 하나에 대해 다수의 세포들 중에서 한 세포를 분석 검사합니다: (i) 세포 표면 항원의 존재; (ii) 세포 표면 항원의 양; 또는 (iii) 세포 크기; b) 다음 중 적어도 하나에 대해 a)의 세포를 분석 검사합니다: (i) 핵 크기; 또는 (ii) 핵 모양; 및 c) 정량적 세포 빛 산란에 대해 a)와 b)의 세포를 분석 검사합니다. 여기에서 다수의 세포가 들어 있는 시료에서 세포를 식별하기 위해 단계 a), b) 및 c)에서 얻은 정보를 조합하여 사용합니다.

[0049] 본 문서에 설명된 적어도 하나의 구현에서, 시료에 대한 이미지를 확보하기 위한 시스템은 다음으로 구성됩니다: 해당 시료를 담는 시료 용기(sample vessel), 광학적으로 투명한 표면으로 된 시료 용기 수납기(sample vessel receiver)가 있는 스테이지(stage); 시료의 형성된 성분을 스테이지를 통해 조명하기 위한 광원, 여기에서, 시료 용기에는 시료 용기 수납기의 광학적으로 투명한 표면과 맞물리도록 구성된 접촉면(interface surface)이 있습니다. 여기에서, 접촉면은, 접촉면을 통과하는 빛이 크게 왜곡되지 않도록, 광학적으로 투명한 표면과 일치합니다.

[0050] 본 문서의 구현에서, 다음 기능들 중 하나 이상이 포함되도록 구성할 수 있음을 명심해야 합니다. 예를 들어, 시료 용기의 접촉면은 폴리머 재질(polymer material)로 만들 수 있습니다. 선택적으로, 이것은 투명 물질이 될 수도 있습니다. 선택적으로, 시료 용기의 접촉면은 시료 용기 수납기의 광학적으로 투명한 표면을 만드는 데 사용하는 재질보다 더 부드러운 재질로 만들 수 있습니다. 선택적으로, 접촉면이, 시료 용기 수납기의 광학적 투명 표면과 일치하도록 구성된 모양에 알맞게, 압력을 가하기 위한 압축(또는 압력) 장치가 제공됩니다. 선택적으로, 시료 용기를 스테이지에 올리거나 내리기 용이하도록 하기 위해, 시료 용기와 결합되는 취급 장치(handling unit)를 구성할 수 있습니다. 이렇게 하여 시료 용기의 기계적인 견고성을 향상시킵니다. 선택적으로, 취급 장치는, 시료 용기와 결합하기 위해, 광학적으로 불투명한 장치가 될 수도 있습니다. 선택적으로, 취급 장치는, 로보트 조작기, 피펫 장치(pipette unit), 또는 기타 기계적 이동 장치 등과의 결합이 용이하도록 하기 위해, 물리적 기능, 들판부 또는 이런 것들로 만들 수 있습니다. 선택적으로, 취급 장치는 결합 및/또는 탈착이 용이하도록 하기 위해 자석, 전자석 또는 기타 기능을 갖도록 만들 수 있습니다. 선택적으로,

빛이 한 면을 통과하여 탐지기에 대해 마주보는 다른 면으로, 상당히 직선으로 통과하도록 하지 않으면서도 모든 시료의 이미지를 확보할 수 있습니다. 선택적으로, 시료 용기의 반대 편에 있는 탐지기에 빛을 전달하기 위해 광원이 시료 용기의 한 쪽에 위치해 있지는 않습니다.

[0051] 본 문서에 공개된 구현은 본 문서에 설명된 하나 이상의 기능을 갖도록 변형될 수도 있음을 명심해야 합니다.

[0052] 본 요약에는 선별된 개념들이 간략하게 소개되어 있습니다. 아래에 있는 [상세 설명]에는 더 자세하게 설명되어 있습니다. 본 요약은 청구된(또는 주장된, claimed) 주제의 핵심 기능이나 필수 기능을 식별하기 위한 용도가 아니며, 청구된 주제의 범위를 제한하기 위한 용도로 작성된 것도 아닙니다.

도면의 간단한 설명

[0053] 그림 1은 다음을 보여줍니다: (A) 세포 혼합물의 분산 강도(x축) 대 형광 강도 도표, 세포 혼합물은 자연살생세포(natural killer cells)와 CD16 인식 형광 결합체(fluorescent binder)로 표시된 호중구(neutrophil)로 구성됨; (B) 자연살생세포("NK")와 호중구("Neu")의 전체 세포 면적에 대한 핵 영역의 비율을 보여주는 막대 그래프; (C) anti-CD16 항체로 착색된 자연살생세포(왼쪽 열)와 핵염료(오른쪽 열); anti-CD16 항체로 착색된 호중구(왼쪽 열)와 핵염료(오른쪽 열).

그림 2는 다음을 보여줍니다: (A) 형광 결합 CD41과 CD61로 표시된 혈소판(밝은 점); (B) 형광 표시된 혈소판 이미지의 강도 분포, 왼쪽 10X 배, 오른쪽 20X 배; (C) 형광 표시된 혈소판 이미지의 강도 분포, 측정 강도(밝은 회색)와 측정 강도에 대한 곡선 맞춤(어두운 회색)을 보여줌;

그림 3은 다음을 보여줍니다: 표준 입자의 공칭 지름(단위 μm , x축)과 형광 강도 기반 크기 측정, 단위 a.u., y축 사이 관계를 보여주는 곡선 그래프. 그림에는 곡선 상의 다른 점에서 대표 비드가 표시되어 있습니다.

그림 4는 다음을 보여줍니다: 큐벳과 암시야 혼미경으로 찍은 구형 적혈구, 큐벳에는 (A) 에피조명만 사용하거나 (B) 에피조명과 트랜스조명 혼합을 사용할 수 있도록 해주는 기능이 있습니다.

그림 5는 다음을 보여줍니다: (A) anti-CD16 항체와 핵염료로 염색된 추정 띠호중구(band neutrophils); (B) anti-CD16 항체와 핵염료로 염색된 추정 분엽호중구(segmented neutrophil).

그림 6A는 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템의 일부로 적합하며, 모범적인 광학 장치(예를 들어, 환형광으로 표시된 광원 및 대상물), 큐벳, 및 이미지 확보를 위해 큐벳을 고정하고 위치를 설정하도록 구성된 지지 구조물 등을 포함하여, 본 문서에서 공개된 방법을 위해 사용하는 데 적합한, 광학 시스템의 구현을 보여줍니다. 이 구현에서 큐벳에는 직사각형 가로 단면이 있습니다.

그림 6B는 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템의 일부로 적합하며, 모범적인 광학 장치(예를 들어, 환형광으로 표시된 광원 및 대상물), 큐벳, 및 이미지 확보를 위해 큐벳을 고정하고 위치를 설정하도록 구성된 지지 구조물 등을 포함하여, 본 문서에서 공개된 방법을 위해 사용하는 데 적합한, 광학 시스템의 구현을 보여줍니다. 이 구현에서 큐벳에는 원형 가로 단면이 있습니다.

그림 7A는 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템에 적합하며, 본 문서에 공개된 방법에 적합한, 광학 시스템의 소자들을 구현한 것을 보여줍니다.

그림 7B는 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템에 적합하며, 본 문서에 공개된 방법에 적합하며, 탐지기에 도달하는 분산된 빛의 각도 범위를 제한하는 데 알맞은 추가 렌즈와 조리개(aperture)가 포함된, 광학 시스템의 소자들을 구현한 것을 보여줍니다.

그림 8A는 시료의 이미지 확보용 큐벳을 고정하기 위한 지지 구조물이 있는, 광학 장치의 구현을 보여줍니다. 이 광학 장치에서, 환형광 조명에서 나온 빛은 시료에 직접 비춰지고(에피조명), 빛은 또한 큐벳에서 반사되어 트랜스조명을 제공합니다. 표시된 것처럼, 입사광은 표면에서 완전 반사되거나(내부 전반사, TIR) 또는 입사광은 표면에서 부분만 반사될 수도 있습니다(내부 부분반사, PIR). 이 구현에서 큐벳에는 톱니 모양 세로 단면이 있습니다.

그림 8B는 시료의 이미지 확보용 큐벳을 고정하기 위한 지지 구조물이 있는, 광학 장치의 구현을 보여줍니다. 이 광학 장치에서, 환형광 조명에서 나온 빛은 시료에 직접 비춰지고(에피조명), 빛은 또한 큐벳에서 반사되어 트랜스조명을 제공합니다. 표시된 것처럼, 입사광은 표면에서 완전 반사되거나(내부 전반사, TIR) 또는 입사광은 표면에서 부분만 반사될 수도 있습니다(내부 부분반사, PIR). 이 구현에서 큐벳에는 톱니 모양 세로 단면이 있습니다.

그림 8C는 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템의 일부로 적합하며, 모범적인 광학 장치(예를 들어, 환형광으로

표시된 광원 및 대상물), 큐벳, 및 이미지 확보를 위해 큐벳을 고정하고 위치를 설정하도록 구성된 지지 구조물을 포함하여, 본 문서에서 공개된 방법을 위해 사용하는 데 적합한, 광학 시스템의 구현을 보여줍니다. 본 구현에서, 큐벳과 큐벳 내의 시료에 조명을 제공하는 광로에 영향을 주는 기능이 큐벳에 포함되어 있습니다.

그림 8D는 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템의 일부로 적합하며, 모범적인 광학 장치(예를 들어, 가로 방향으로부터 빛의 방향을 바꾸는 광원), 큐벳, 및 이미지 확보를 위해 큐벳을 고정하고 위치를 설정하도록 구성된 지지 구조물을 포함하여, 본 문서에서 공개된 방법을 위해 사용하는 데 적합한, 광학 시스템의 구현을 보여줍니다. 본 구현에서, 큐벳과 큐벳 내의 시료에 조명을 제공하는 광로에 영향을 주는 기능이 큐벳에 포함되어 있습니다.

그림 8E는 시료 준비 위치에서 광학 탐지기 가까이에 있는 시료 관찰 위치로 큐벳의 이동을 도식적으로 보여줍니다.

그림 8F는 시료 준비 위치에서, 광학 탐지기 가까이에 있는 시료 관찰 위치로 큐벳을 이동하기 위한, 이동 장치가 들어 있는 시스템을 더욱 자세하게 도식적으로 보여줍니다.

그림 9는 다른 이미지 확보 기술과 염료를 사용하여, 전혈(whole blood)에서 얻은 혈액 세포의 대표 이미지를 보여주는 합성 이미지입니다. 그림 9A는 암시야 이미지입니다; 그림 9B는 단핵구(monocytes)에 달라 붙은 anti-CD14 항체로부터의 현광을 보여주는 이미지입니다; 그림 9C는 호염기구(basophils)에 달라 붙은 anti-CD123 항체로부터의 현광을 보여주는 이미지입니다; 그림 9D는 호중구(neutrophils)에 달라 붙은 anti-CD16 항체로부터의 현광을 보여주는 이미지입니다; 그림 9E는 백혈구(leukocytes)에 달라 붙은 anti-CD45 항체로부터의 현광을 보여주는 이미지입니다; 그림 9F는 혁염료 DRAQ5®로 염색된 백혈구와 혈소판을 보여주는 이미지입니다(핵이 없는 적혈구 세포는 DRAQ5®로 염색되지 않습니다).

그림 10은 전혈(whole blood)에서 혈구의 대표 이미지를 보여는 합성 이미지입니다. 단핵구, 림프구, 호산구 및 호중구가 표시되어 있습니다.

그림 11은 서로 다른 표지자(표식이 붙은 항체가 다른 세포 표면 또는 다른 표지자에 적용되었음)로 표시된 세포에서 탐지된 형광을 보여줍니다. 이런 다수 표식은 세포를 식별하는 데 편리합니다. 그림 11A는 CD14 표식 강도(FL-17) 대 분산 강도(FL-9)를 도표화하여 단핵구 식별을 보여줍니다. 그림 11B는 CD123 강도(FL-19) 대 CD16 강도(FL-15)를 도표화하여 호염기구 식별을 보여줍니다. 그림 11C는 CD16 강도(FL-15) 대 CD45 강도(FL-11)를 도표화하여 림프구 식별을 보여줍니다. 그림 11D는 CD16 강도(FL-15) 대 분산 강도(FL-9)를 도표화하여 호중구 식별을 보여줍니다.

그림 12는 현재 방법과 다른 방법(상용 혈액 분석기)으로 얻은, 동일한 혈액 시료의 표본으로 측정한 세포 개수를 비교하여 보여줍니다. 그림 12A는 현재 방법으로 얻은 백혈구 개수 대 다른 상용 혈액 분석기로 얻은 백혈구 개수를 도표로 보여줍니다. 그림 12B는 현재 방법으로 얻은 적혈구 개수 대 다른 상용 혈액 분석기로 얻은 적혈구 개수를 도표로 보여줍니다. 그림 12C는 현재 방법으로 얻은 혈소판 개수 대 다른 상용 혈액 분석기로 얻은 혈소판 개수를 도표로 보여줍니다. 그림 12D는 현재 방법으로 얻은 호중구 개수 대 다른 상용 혈액 분석기로 얻은 호중구 개수를 도표로 보여줍니다. 그림 12E는 현재 방법으로 얻은 단핵구 개수 대 다른 상용 혈액 분석기로 얻은 단핵구 개수를 도표로 보여줍니다. 그림 12F는 현재 방법으로 얻은 림프구 개수 대 다른 상용 혈액 분석기로 얻은 림프구 개수를 도표로 보여줍니다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0054]

본 문서에 공개된 장치, 시스템 및 방법의 장점과 완전한 적용 범위를 이해하는 데 도움되는 설명과 공개는 다음 특허에서 찾아볼 수 있습니다; 미국 특허 7,888,125; 미국 특허 8,088,593; 미국 특허 8,158,430; 미국 특허 8,380,541; 미국 특허 신청 일련 번호 13/769,798, 2013년 2월 접수; 미국 특허 신청 일련 번호 61/802,194, 2013년 2월 접수; 미국 특허 신청 일련 번호 13/769,779, 2013년 2월 접수; 미국 특허 신청 일련 번호 13/244,947, 2011년 9월 16일 접수; PCT/US2012/57155, 2012년 9월 25일 접수; 미국 특허 신청 일련 번호 13/244,946, 2011년 9월 26일 접수; 미국 특허 신청 13/244,949, 2011년 9월 26일 접수; 및 미국 특허 신청 일련 번호 61/673,245, 2011년 9월 26일 접수, 특허와 특허 신청의 공개는 그자체로서 참조에 의해 완전히 통합됩니다.

[0055]

상기된 일반 설명과 아래에 있는 상세 설명은 예시 및 설명하기 위한 용도이며, 청구된 것처럼, 발명에 대해 제한적인 것이 아님을 명심해야 합니다. 상세 설명(명세서)과 첨부된 청구항에 사용된 단수형은 문맥상 별도로

명시하지 않은 경우, 복수에도 해당됩니다. 그러므로, 예를 들어, "단일 물질 또는 재질"이라는 말은 물질들(또는 재질들)의 혼합물에도 해당되고, "단일 화합물"이라는 말은 다수의 화합물에도 해당합니다. 본 문서에서 인용된 참조는, 본 상세 설명서에서 명시된 내용과 충돌할 경우에는 제외하고, 그 자체로 완전하게 참조에 의해 통합됩니다.

[0056] 본 상세 설명과 후속 청구항(claims)에서, 여러 가지 용어에 대한 참조가 있으며, 다음과 같은 뜻을 갖는다고 정의됩니다:

[0057] "선택적" 또는 "선택적으로"라는 말은 다음에 설명된 상황이 발생하거나 발생하지 않을 수 있으며, 해당 설명에서 상황이 발생하는 경우와 상황이 발생하지 않는 경우가 포함됩니다. 예를 들어, 특정 장치에 시료 수집 장치가 선택적으로 들어 있을 경우, 이 장치에 시료 수집 장치가 있을 수도 있으며 없을 수도 있습니다. 그러므로, 해당 설명에는 시료 수집 장치가 있는 구조물과 시료 수집 장치가 없는 구조물 모두가 들어 있습니다.

[0058] 본 문서에서 사용된 "상당한(substantial)"이라는 용어는 초소한의 또는 중요하지 않을 정도의 양 이상을 의미하고 "상당히(substantially)"라는 말은 초소한의 정도(minimally) 또는 중요하지 않을 정도(insignificantly) 이상을 뜻합니다. 그러므로, 예를 들어, 본 문서에서 사용된 "상당히 다른" 이란 말은 두 숫자 값들 사이에 충분히 높은 정도로 차이가 있음을 나타내고, 해당 기술 분야 지식을 가진 자가, 해당 값으로 측정된 특성의 문맥 내에서, 두 값들 사이의 차가 통계적으로 중요한 의미가 있다고 생각할 수 있는 정도라야 합니다. 그러므로, 서로 상당히 다른 두 값들 사이의 차이는 기준값 또는 비교값 역할을 하려면 일반적으로 약 10% 이상, 약 20% 이상, 약 30% 이상, 약 40% 이상, 약 50% 이상 더 커야 합니다.

[0059] 본 문서에서 사용된 "내부 반사"는, 물질(첫번째 물질) 내에서, 첫번째 물질과 다른 물질(두번째 물질) 사이의 경계점에서 빛의 반사를 뜻합니다. 예를 들어, 첫번째 물질은 유리 또는 플라스틱 같은 고체이고 두번째 물질은, 예를 들어, 공기가 될 수 있습니다. 내부 반사된 빛은 반사되기 전에 첫번째 물질 내에서 이동합니다. 내부 반사는 부분 반사(내부 부분반사: PIR) 또는 전반사(내부 전반사: TIR)가 될 수 있습니다. 그러므로, 표면에 입사된 모든 빛이 첫번째 물질 내에서 다시 반사되는 내부 반사는 내부 전반사(TIR)이고, 표면에 입사된 모든 빛이 첫번째 물질 내에서 반사되지 않는 내부 반사는 내부 부분반사(PIR)입니다. (내부 부분반사(PIR)의 경우, 일부 빛은 경계면을 통과하고 일부 빛은 표면에서 다시 물질로 반사됩니다.) 입사각은 내부 반사의 정도를 결정하는 데 중요한 요소입니다; 입사각은 입사광의 각도를 경계면에 대한 수직선을 기준으로 측정한 값입니다. 내부 전반사(TIR)의 발생 여부는 첫번째 물질과 두번째 물질 사이의 경계면에 대한 입사광의 입사각, 첫번째 물질의 굴절률, 두번째 물질의 굴절률 및 기타 요인(예를 들어, 일반적으로 굴절률은 괴장에 따라 달라지므로 빛의 괴장은 내부 전반사(TIR)에 영향을 줍니다)에 의해 달라집니다. 빛이 내부 전반사되는 각도를 임계각이라고 부릅니다. 입사광이 임계각 보다 큰 입사각을 갖고 있으면 내부 전반사가 일어나고 물질 내에 머물게 되어 내부 전반사(TIR)가 될 수 있습니다. 그러나, 내부 부분반사(PIR)의 경우, 입사광이 임계각보다 작은 입사각을 갖고 있으면, 입사광의 일부가 내부 반사될 수 있습니다(나머지 입사광은 굴절되어 첫번째 물질에서 나와 두번째 물질로 통과하게 됩니다).

[0060] 본 문서에서 설명된, "시료"는 혈액 채취, 뇨 시료 또는 기타 생체시료(생물학적 샘플)가 될 수 있으나, 이런 것들에만 국한되지는 않습니다. 시료(또는 샘플, 표본)는, 예를 들어, 혈액 채취(예를 들어, 평거스틱 또는 정맥천자로 얻은 시료, 또는 동맥혈 시료, 전혈(whole blood), 혈청, 혈장, 또는 기타 혈액 샘플), 뇨 시료, 생검(biopsy) 시료, 조직 조각, 대변 시료, 기타 생체시료; 물 시료, 흙 시료, 음식 시료, 공기 시료; 또는 기타 시료(예를 들어, 비강(코) 면봉 시료 또는 코인두 세척액(nasopharyngeal wash), 타액, 뇨, 눈물, 위액, 척수액, 점액(mucus), 땀, 귀지(earwax), 오일, 샘 분비액(glandular secretion), 뇌척수액, 조직, 정액, 자궁경부액, 질액, 윤활액(synovial fluid), 인두면봉, 호흡, 머리, 손가락, 손톱, 피부, 생검, 태반액, 양수, 제대혈, 림프액, 공동액(cavity fluids), 가래, 점액(mucus), 고름, 미생물 시료, 태변, 모유 및/또는 배설물) 등이 될 수 있습니다.

[0061] 그러므로, 여기에 사용된 "시료"에는 혈액, 뇨, 또는 기타 생체시료가 포함되며, 적당한 크기 또는 부피가 될 수 있으며, 작은 크기 또는 부피가 선호됩니다. 본 문서에서 공개된 시스템, 분석 검사(assay) 및 방법의 일부 구현에서, 소량의 혈액 시료를 사용하여 측정할 수도 있으며, 소량의 혈액 시료 이하를 사용하여 측정할 수도 있습니다. 여기에서 소량은 약 5 mL 이하가 될 수 있습니다; 약 3 mL 이하가 될 수도 있습니다; 약 2 mL 이하가 될 수도 있습니다; 약 1 mL 이하가 될 수도 있습니다; 약 500 μ L 이하가 될 수도 있습니다; 약 250 μ L 이하가 될 수도 있습니다; 약 100 μ L 이하가 될 수도 있습니다; 약 75 μ L 이하가 될 수도 있습니다; 약 50 μ L 이하가 될 수도 있습니다; 약 35 μ L 이하가 될 수도 있습니다; 약 25 μ L 이하가 될 수도 있습니다; 약 20 μ L 이

하가 될 수도 있습니다; 약 15 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 10 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 8 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 6 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 5 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 4 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 3 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 2 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 1 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 0.8 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 0.5 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 0.3 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 0.2 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 0.1 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 0.05 μL 이하가 될 수도 있습니다; 약 0.01 μL 이하가 될 수도 있습니다.

[0062] 구현에서, 팁거스틱(finger-stick)으로 수집한 시료의 양(부피)은, 예를 들어, 약 250 μL 또는 그 이하, 또는 약 200 μL 또는 그 이하, 약 150 μL 또는 그 이하, 약 100 μL 또는 그 이하, 약 50 μL 또는 그 이하, 약 25 μL 또는 그 이하, 약 15 μL 또는 그 이하, 약 10 μL 또는 그 이하, 약 5 μL 또는 그 이하, 약 3 μL 또는 그 이하, 약 1 μL 또는 그 이하가 될 수 있습니다.

[0063] 여기에서 사용된 "서비스 제공 현장"은 피험자가 서비스(예를 들어, 검사, 감시, 치료, 진단, 지도, 시료 수집, 신원 확인, 의료 서비스, 비의료 서비스 등)를 받는 장소이며 다음을 포함하나 이것들에만 국한되지는 않습니다: 피험자의 집, 피험자의 직장, 보건 서비스 공급자의 장소(예, 의사), 병원, 응급실, 수술실, 진료소, 전문의 진료실, 검사실, 소매점(예, 약국, 소매 약국, 진료소 약국, 병원 약국, 약방, 슈퍼마켓, 식료품점 등), 교통 수단(예, 자동차, 트럭, 버스, 비행기, 오토바이, 앰뷸런스, 이동 장치, 소방차, 소방 트럭, 응급 차량, 법 집행 차량, 경찰차 또는 기타 피험자를 한 장소에서 다른 장소로 운반하는 운송 수단), 이동식 진료소, 이동 장치, 학교, 어린이집, 보안 검색 장소, 전투 장소, 보건 보조 거주지, 정부 사무실, 사무실 빌딩, 텐트, 체액 시료 수집 장소(예, 헌혈 수집 장소), 피험자가 들어 가고 싶어하는 장소의 입구 근처, 피험자가 사용하고 싶어 하는 기계가 있는 장소(예, 피험자가 컴퓨터를 사용하고 싶어할 경우, 컴퓨터가 있는 곳), 시료 처리 기기가 시료를 받는 장소, 또는 본 문서의 기타 위치에서 설명된 기타 서비스 제공 현장.

[0064] 생체시료 맥락에서 사용된 "세포(또는 세포들)"이라는 용어는 일반적으로 비슷한 크기의 세포들로 구성된 시료를 말하며, 리포솜 같은 소포(vesicles), 세포, 비리온(virions), 및 비드(beads), 나노 입자(nanoparticles), 마이크로스피어(microspheres) 같은 작은 입자에 붙어 있는 물질 등을 포함하나, 이것들에만 국한되지는 않습니다.

[0065] 본 문서에 사용된 "결합(binds)"이라는 용어는 두 물질 사이의 반응 또는 상호작용을 뜻하며, 이로 인해 두 물질의 단단한 결합체가 됩니다. 예를 들어, 리간드(ligand)와 수용체 간의 반응은(여기에서 리간드는 수용체에 단단하게 결속됨) 결합의 한 예입니다. 항체와 항체의 표적 항원(target antigen)과의 결합, 운반 단백질과 비타민 B12가 있는 내인자 같은 운반 대상체와의 결합 등은 한 물질이 다른 물질로 결합하는 반응의 예입니다.

[0066] 본 문서에서 사용된 "결합체(binder)"라는 용어는 일반적으로 화합물이나, 표적과 단단하게 결합하는 항체 같은, 고분자를 뜻합니다. 결합체에는 다음을 포함하나 이것들에만 국한되지는 않습니다: 항체(단클론항체 또는 다클론항체, 항체 조각, 면역접합체, 및 기타 이런 항체의 변형물 및 유사물), 천연 결합 단백질(예, 비타민 B12에 특정적인 내인자 단백질), 표적 수용체와 결합하는 리간드(ligands), 특정 효소와 결합하는 기질(substrates), 아비딘(avidin)과 바이오틴(biotin) 같은 결합쌍, 표적 분자와 단단하게 결합하는 저분자 등등. 박테리아, 바이러스, 합성 골격(synthetic scaffolds), 및 특정 표적물과 결합하는 대상물 및 물질도 결합체로 사용할 수 있습니다. 결합체는 염료(dye), 형광단(fluorophore), 또는 탐지 가능한 모이어티(moietiy) 같은 표지자이거나, 이것들과 결합할 수 있습니다.

[0067] 본 문서에서 사용된 "표지자(marker)"는 탐지 가능한 물질로 표적물이 보이거나 탐지 가능하도록 만들어 줍니다. 특정 위치에 표지자가 있으면 표적물이 해당 위치에 있음을 알려줍니다. 표지자는 세포, 구조체, 입자 또는 기타 표적물에 표식을 붙이는 데 사용할 수 있고 표적이나 시료의 특성의 존재, 위치, 식별, 수량 또는 기타 측정값을 탐지 및 결정하는 데 편리합니다. 표지자는, 제한 없이, 착색제, 염료, 리간드, 항체, 입자 및 특정 표적물과 결합하거나 표적물의 위치를 탐지할 수 있는 기타 물질이 될 수 있으며, 박테리아, 바이러스 또는 특정 표적물의 크기를 키우거나 위치를 탐지할 수 있도록 해주는 세포가 될 수 있으며, 위치도 표지자로 사용될 수 있습니다. 세포 또는 기타 표적물의 탐지 가능한 속성 또는 특성도 표지자로 사용할 수 있습니다.

[0068] 본 문서에 사용된 "착색제"와 "염료"는 서로 교환하여 사용할 수 있으며(즉, 같은 뜻으로 사용되며), 착색제나 염료로 처리하지 않았을 때보다 시료의 대상물 또는 성분을 더 잘 탐지할 수 있도록 해주는 원소, 화합물 및 고분자를 뜻합니다. 예를 들어, 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide) 같은 DNA 염료로 혈액 시료를 처리하면 유핵 세포의 핵을 더 잘 보이게 만들 수 있으며, (적혈구 같은 무핵 세포가 있을 때도), 이런 세포들을 처리하지 않은 것 보다 더 쉽게 탐지하고 정량화(측정) 할 수 있습니다.

- [0069] 본 문서에 사용된 "탐지기"는 시료 같은 표적물의 신호, 이미지 또는 기타 정보를 제공해 주는 모든 기기, 도구 또는 장치가 될 수 있습니다. 탐지 가능한 신호 및 정보는, 예를 들어, 광학적 신호, 전기적 신호, 기계적 신호, 화학적 신호, 물리적 신호 또는 기타 신호가 될 수 있습니다. 탐지기는, 예를 들어, 광학 탐지기, 전기 탐지기, 화학 탐지기, 전기화학 탐지기, 소리 탐지기, 온도 탐지기, 기계적 탐지기 또는 기타 탐지기가 될 수 있습니다.
- [0070] 본 문서에서 사용된 "광학 탐지기"는 전자기파 방출(예, 빛)를 탐지합니다. 광학 탐지기는 이미지를 탐지하거나 이미지와 함께 사용하거나 이미지와 관계 없이 빛의 강도(또는 세기)를 탐지하거나 둘 모두(이미지와 빛의 강도)를 탐지할 수 있습니다. 광학 탐지기는 빛의 세기를 탐지 또는 측정할 수 있습니다. 일부 광학 탐지기는 특정 파장 또는 파장 범위에 대해 민감하거나 제한되거나 탐지하거나 측정할 수 있습니다. 광학 탐지기는, 예를 들어, 포토다이오드 탐지기, 광전자 증폭관(photomultiplier), 전하 결합 소자(charge-coupled device), 레이저 다이오드, 분광 광도계(spectrophotometer), 카메라, 현미경 또는 빛의 강도(빛의 단일 파장, 다수 파장, 또는 파장 범위) 측정, 이미지 형성, 또는 둘 모두를 수행하는 장비가 될 수 있습니다.
- [0071] 본 문서에서 사용된 "배수성(ploidy)"라는 용어는 단일 세포 내의 DNA 양을 뜻하거나 시료에 들어 있는 세포의 DNA 양에 대한 분석 검사 및 측정을 뜻합니다. 배수성 측정은 단일 세포 또는 세포군에 들어 있는 정상 또는 비정상 DNA의 양을 측정합니다. 세포 분할 동안 DNA가 복제되므로 세포군의 비정상 세포의 개수도 증가됩니다. 배수성 측정은 특정 DNA 염료로 염색한 시료에서 유핵 세포를 염색한 후에 이미지 기법으로 측정됩니다.
- [0072] 정량적 현미경법**
- [0073] 일부 구현에서, 정량적 현미경 검사법을 위해 방법, 시스템 및 장치가 제공되어 있습니다. 정량적 현미경 검사법에는 하나 이상의 정량적 형광 현미경법, 정량적 암시야 현미경법, 정량적 명시야 현미경법 및 하나 이상의 세포 특성을 측정하기 위한 정량적 위상 대비 현미경법(quantitative phase contrast microscopy)이 포함될 수 있습니다. 상기 모든 방법은 세포에 대한 형태계량(morphometric) 정보를 제공할 수 있습니다. 이런 정보는 정량적으로 측정할 수 있습니다. 일부 구현에서, 정량적 현미경법을 위해, 둘 이상의 정량적 형광 현미경법, 정량적 암시야 현미경법, 정량적 명시야 현미경법, 및 정량적 위상 대비 현미경법으로 시료를 분석합니다. 정량적 현미경법에는, 현미경법으로 얻은 이미지를 처리하기 위해 이미지 분석 기법이나 통계적 학습 및 분류 방법이 사용될 수도 있습니다.
- [0074] 정량적 현미경법을 수행하는 동안 다수의 서로 다른 세포 특성을 측정할 수도 있습니다. 측정할 수 있는 세포 특성에는 다음이 포함되나 이것들에만 제한되지는 않습니다:
- [0075] 물리적 속성: 예를 들어, 세포 크기, 부피, 전도성, 저 및 고 각도 분산, 및 밀도. 측정되거나 정량화되는 기타 물리적 특성에는 다음이 포함되나 이것들에만 국한되지는 않습니다: 세포 또는 입자의 원형 모양; 세포 또는 입자의 가로 세로 비율(aspect ratio); 세포 또는 입자의 둘레 길이; 세포 또는 입자의 볼록함 정도; 세포 또는 입자의 입자성; 세포 또는 입자의 이미지의 강도; 세포 또는 입자의 높이(예, 다수 초점 면을 통과하는 크기); 세포 또는 입자의 편평도; 기타 물리적 특성.
- [0076] 형태적 속성: 예를 들어, 세포 모양, 면적, 크기, 및 소엽성(소엽의 유무, lobularity); 핵 모양 면적, 크기, 및 소엽성; 미토콘드리아 모양, 면적, 크기, 및 소엽성; 세포 부피에 대한 핵 부피의 비율.
- [0077] 세포내 특성: 예를 들어, 핵 중심 / 세포 중심 거리(즉, 핵 중심과 세포 중심 간의 거리), 핵엽 중심 거리(즉, 핵의 서로 다른 엽의 중심 사이 거리), 세포 내의 단백질 분포(즉, 액틴, 튜뷸린, 등), 세포 내의 소기관 분포(즉, 리소솜, 미토콘드리아, 등), 다른 단백질과 소기관과의 공존, 및 기타 속성.
- [0078] 생화학적 속성: 예를 들어, 세포 단백질의 발현 수준, 세포 표면 단백질, 세포질 단백질, 핵 단백질, 세포 핵산, 세포 표면 핵산, 세포질 핵산, 핵 핵산, 세포 당질, 세포 표면 당질, 세포질 당질, 및 핵 당질.
- [0079] 일부 구현에서, 시료의 세포에서 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 속성을 정량적으로 측정하기 위해, 방법, 시스템, 및 장치가 제공되어 있습니다. 여기에서, 속성은 물리적 속성, 형태적 속성, 세포내 속성 및 생화학적 속성 중에서 선택됩니다. 일부 구현에서, 시료의 세포에서 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 속성을 정량적으로 측정하기 위해, 방법, 시스템, 및 장치가 제공되어 있습니다. 여기에서, 속성은 다음 중에서 선택됩니다: 세포 크기, 세포 부피, 세포 전도성, 세포 저각도 광 분산, 세포 고각도 광 분산, 세포 밀도, 세포 모양, 세포 면적, 세포 소엽성, 핵 모양, 핵 면적, 핵 크기, 핵 소엽성, 미토콘드리아 모양, 미토콘드리아 면적, 미토콘드리아 크기, 미토콘드리아 소엽성, 세포 부피에 대한 핵 부피의 비율, 핵 중심 / 세포 중심 간의 거리, 세포엽 중심 거

리, 세포내의 단백질 분포(예, 액틴, 투블린, 등), 세포내 소기관의 분포(예, 리소ーム, 미토콘드리아 등), 세포 단백질의 발현 수준, 세포 표면 단백질의 발현 수준, 세포질 단백질의 발현 수준, 핵 단백질의 발현 수준, 세포 핵산의 발현 수준, 세포 표면 핵산의 발현 수준, 세포질 핵산의 발현 수준, 핵 핵산의 발현 수준, 세포 당질의 발현 수준, 세포 표면 당질의 발현 수준, 세포질 당질의 발현 수준 및 핵 당질의 발현 수준.

[0080]

일부 구현에서, 현미경법으로 생체시료의 세포 속성을 중 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상을 정량적으로 측정하기 위한 방법이 제공되어 있습니다. 여기에서, 방법에는 다음과 같은 하나 이상의 단계 또는 요소가 포함되어 있습니다. 정량적으로 측정된 세포의 속성은 바로 위에 있는 단락에 나열된 속성들 중에서 선택할 수 있습니다. 생체시료는 현미경법으로 검사하기 전에 처리될 수도 있습니다. 선처리(Pre-treatment)에는 현미경법으로 시료를 분석하는 데 도움되는 다음과 같은 절차가 포함될 수도 있습니다: 관심 세포를 현미경법으로 검사하는 데 알맞도록 시료에 대한 처리, 현미경법에 간섭을 일으킬 수도 있는 시료의 성분을 제거하기 위한 시료의 처리, 현미경법으로 시료 분석을 용이하게 하기 위해 시료에 물질 추가(예, 희석액, 세포에 대해 염료 착색을 방하는 것을 줄이기 위한 분자 차단). 선택적으로, 현미경법 전에, 시료는 특정 세포 성분과 결합하는 하나 이상의 결합체와 접촉할 수도 있습니다. 결합체는 결합체의 가시성을 위해 염료 또는 기타 입자에 직접적으로 결합될 수도 있습니다. 시료는 세포 성분과 결합하는 결합체와 결합하는 2차 결합체와 접촉될 수도 있습니다. 2차 결합체는 결합체의 가시성을 위해 염료 또는 기타 입자에 직접적으로 결합될 수도 있습니다. 현미경법 전에 시료는 분광 광도계에서 분석 검사될 수도 있습니다. 현미경법을 위해, 현미경 분석용 대상물이 들어 있거나 들어 있을 것으로 의심되는 생체시료를 슬라이드 또는 큐벳 같은 시료 홀더에 넣을 수도 있습니다. 시료에 대해 정량적 현미경법을 수행하도록 구성된 장치에 시료가 담겨 있는 시료 홀더를 넣을 수도 있습니다. 현미경의 대물부(objective)을 통해 생성되는 이미지를 캡처하기 위해 현미경에 이미지 센서를 장착할 수도 있습니다. 이 장치에서, 시료의 다수 이미지를 현미경법으로 얻을 수 있습니다. 정량적 형광 현미경법, 정량적 암시야 현미경법, 정량적 명시야 현미경법, 및 정량적 위상 대비 현미경법 들 중에서 하나 이상을 사용하여 시료의 이미지를 얻을 수 있습니다. 선택적으로, 시료 홀더에 들어 있는 전체 시료의 이미지는 현미경법으로 얻을 수도 있습니다. 시료 홀더의 전체 시료의 이미지를 캡처하는 데 현미경의 다수 시야가 필요할 수도 있습니다. 시료 홀더에 들어 있는 시료의 서로 다른 부분을 검사하기 위해, 서로 다른 시야를 생성하기 위해, 시료 홀더를 현미경에 대해 상대적으로 이동하거나 현미경을 시료 홀더에 대해 상대적으로 이동해야 할 수도 있습니다. 시료 홀더에 들어 있는 시료에 대한 동일한 시야의 다수 이미지를 얻을 수도 있습니다. 선택적으로, 시료에 대해 다른 정보를 담고 있는, 동일한 시료의 다른 이미지를 얻기 위해, 동일한 종류의 현미경법과 시료의 동일한 시야에 대해 다수의 필터를 사용할 수도 있습니다. 사용 가능한 필터에는 대역 통과 필터와 롱 패스 필터가 있으나 이것들에만 국한되지는 않습니다. 필터는 특정 파장의 빛은 통과시키고 다른 파장의 빛은 차단합니다. 선택적으로, 시료에 대해 다른 정보를 담고 있는, 동일한 시료의 다른 이미지를 얻기 위해, 시료의 동일한 시야의 이미지를 얻기 위해 다수의 현미경법(예, 형광, 암시야, 명시야 등)을 사용할 수도 있습니다. 선택적으로, 현미경 이미지를 수집하기 위해 비디오를 사용할 수도 있습니다. 선택적으로, 3차원으로 현미경 이미지를 수집할 수도 있습니다. 본 문서에 설명된 현미경법에 대해, 시료의 한 이미지에 들어 있는 세포에 관련된 정보를 시료의 다른 이미지에 들어 있는 동일한 세포와 연결 짓도록 장치나 시스템을 구성할 수도 있습니다. 동일 시료 및/또는 동일 세포의 서로 다른 이미지를 기반으로, 시료에 들어 있는 세포의 다수 속성을 결정할 수도 있습니다. 어떤 면에서, 시료에 들어 있는 세포에 대한 다수 정보와 속성의 조합을 사용하여, 세포의 단일 속성만으로 얻은 정보를 기반으로는 불가능한, 해당 세포에 대한 임상적 결정이나 결론을 내릴 수 있습니다.

[0081]

일부 구현에서, 현미경법으로 생체시료에 들어 있는 세포의 둘, 셋, 넷, 다섯 또는 그 이상의 세포 속성을 정량적으로 측정하기 위해, 장치 및 시스템이 제공되어 있습니다. 일부 구현에서, 장치 또는 시스템에는 현미경 또는 세포계산기(cytometer) 및 분광 광도계 모두가 포함되어 있습니다. 장치 또는 시스템에는 유체 취급 기구(fluid handling apparatus)가 추가로 들어 있을 수 있습니다. 유체 취급 기구는 분광 광도계와 현미경 또는 세포계산기 사이에 시료를 이동하도록 구성되어 있습니다. 일부 구현에서, 본 문서에서 공개된 방법을 수행하기 위한 장치와 시스템은 미국 특허 신청 번호 13/244,947 및 미국 특허 신청 일련 번호 13/769,779에 설명된 대로 구성되어 있습니다. 이것들은 그 자체로 완전하게 참조에 의해 각각 통합되어 있습니다. 상기 설명은 세포 맥락에서 설명되었지만, 상기 내용의 일부 또는 전체는 결정, 입자, 필러멘트 또는 시료에서 발견할 수도 있는 세포 크기의 대상물(object)에도 적용할 수 있습니다.

[0082]

동적 희석

[0083]

일부 구현에서, 세포가 들어 있는 시료를 동적으로 희석하기 위한 방법, 시스템 및 장치가 제공되어 있습니다.

[0084]

비제한적인 예로, 시료를 동적으로 희석하는 한 방법에는 하나 이상의 다음과 같은 단계 또는 요소를 포함하여,

시료에 들어 있는 세포 또는 대상물의 원하는 개수나 농도를 결정하고 이 정보를 후속 시료 처리를 조정하기 위한 요소로 사용합니다. 비제한적인 예에서, 하나 이상의 착색제 또는 염료를 세포가 들어 있는 생체시료에 추가할 수 있습니다. 착색제와 시료의 혼합물을 배양할 수도 있습니다. 착색제와 시료의 혼합물에 들어 있는 세포는 세척하여 과잉(결합되지 않은) 착색제를 제거할 수도 있습니다. 염색하고 세척한 세포는 추가 분석을 위해 원하는 부피(양)으로 준비할 수 있습니다. 염색하고 세척한 세포를 분석하여 시료 또는 시료의 일부분에 들어 있는 세포의 대략적인 개수와 농도를 결정할 수 있습니다. 시료 또는 시료의 일부분에 들어 있는 염색된 세포의 개수와 농도를 기반으로, 추가 분석을 위한 시료 부피를 얻을 수 있고, 추가 분석할 세포의 원하는 개수와 농도를 얻을 수 있습니다. 일부 구현에서, 시료는 미국 특허 신청 번호 13/355,458에 따라 희석할 수 있습니다. 이 특허는 그 자체로 완전하게 참조에 의해 통합되었습니다.

[0085] 본 문서에 설명된 한 구현에서, 세포 계수기를 사용하는 대신에 세포 농도를 추정하기 위해, 세포 개수를 계산하는 형광 기반 방법(이것에만 국한되지 않음) 같은 다른 탐지 기법을 제공하는 것이 바람직합니다. 환자 시료의 정확하고 재현 가능한 착색을 위해, 세포의 특정 개수 및 농도에 대해 때때로 착색제(DNA 염료/항체/결합체/등)를 최적 적정 농도로 만들 필요가 있기 때문에, 이 추정 방법이 설명되었습니다. 예를 들어, 착색제의 알려진 농도가 세포의 특정 개수에 적용됩니다(예, 1000개의 백혈구(WBC)에 대해 착색제 0.2 μg). 배양 기간 후에 시료를 세척하여 과잉(결합되지 않은) 염료를 제거하고, 적절한 세포 밀도로 준비하여 이미지를 얻습니다.

[0086] 이 비제한적인 예에서, 표적 세포 종류의 세포 농도를 추정하기 위해, 시료는, 혈구 계산 분석을 위한 시료 처리에 영향을 주기 위해, 혈구 계산에 사용한 것과는 다른, 분광 광도계(그러나 이것에만 국한하지 않고) 같은, 방식으로 비파괴적으로 측정합니다. 이 방법은 관심 세포군에 대해 고유한 다른 표지자를 선택합니다. 비제한적인 한 예에서, B 세포에 대해 CD20을 선택할 수도 있습니다. 이 처리에서, CD5와는 다른 색의 형광단(fluorophore)과 결합된 anti-CD20 결합체로 시료에 표식을 붙입니다. 그런 다음 비파괴적으로 형광 분광 광도계 같은(그러나 이것에만 국한되지 않고) 장치를 신속하게 사용하여 이 시료의 형광 신호를 측정합니다. 교정을 통해, 추정치를 제공하기 위해 제한적인 정확도로 B 세포의 농도를 예측할 수 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 교정(calibration)은 신호 강도를 해당 종류의 신호에 대해 세포 개수와 연관성을 수 있습니다. 이런 교정 곡선을 만들어 세포 또는 대상물의 개수를 추정하는 데 사용할 수 있습니다. 전반적인 신호 강도를 기반으로 세포 개수를 추정하기 위해, 광학적, 전기적, 음향적, 또는 등등 같은 기타 기법들(그러나 이것들에만 국한되지 않음)이 배제되지 않습니다. B 세포의 근사적인 농도를 기반으로, 시스템은 anti-CD5 결합체의 적절한 양과 농도를 추정할 수 있으므로 CD5 발현과 CD5 형광 사이에 비례 관계가 유지됩니다. 이런 방식으로 착색제와 착색 절차를 특정 세포 개수에 대해 최적화 및 표준화할 있습니다.

[0087] 환자 시료(평거스틱으로 얻은 혈액으로, 부피가 약 120 μL 이거나 이하인, 양이 작은 시료)를 최대한 이용하기 위해, 주어진 혈액 부피에 들어 있는 백혈구(WBC) 개수를 계산할 수 있는 방법을 개발하는 것이 바람직합니다(예를 들어, 농도 WBCs/ μL 결정). 이렇게 하면, 착색제를 추가하기 전에 백혈구(WBC)의 개수를 결정하거나 적어도 추정할 수 있습니다. 일단 결정하고 나면, 착색제의 알려진 농도로 배양하기 위해 세포의 원하는 개수를 표본으로 선택할 수 있으므로 세포 부분집단의 최적 양을 얻을 수 있습니다.

[0088] 세포의 배수성을 측정할 필요가 있을 경우, 시료의 세포를 DNA 염료로 염색할 수 있으므로 염색 강도를 정량화 할 수 있습니다(여기에서 "염색 강도"는 염료로 인한 광학 신호의 강도를 뜻합니다). 이런 염색으로 인한 염료 신호의 강도는 DNA/염료 비율에 따라 달라집니다(즉, 추가한 염료의 양에 대한 염료로 염색된 DNA의 양의 비율). 시료의 특성과는 무관하게, 모든 시료에 미리 정해진 양의 염료를 추가할 경우, 세포 농도가 매우 높은 시료는 세포 농도가 낮은 시료와 비교하여 덜 밝습니다. 이런 상황은 각 세포에 들어 있는 DNA 양에 대한 정량화를 어렵게 만듭니다. 본 문서에 공개된 것처럼, 염료를 추가하기 전에 시료에 들어 있는 유핵 세포의 추정량을 알 수 있으면 염료의 양을 조정할 수 있으므로, 시료에 들어 있는 DNA 양과 세포 당 DNA의 양을 정량화(계산)할 수 있습니다. 그러므로, 예를 들어, 정량화할 세포(들)을 표시해 주는 세포 표면 표지자에 적용하는 착색제 또는 염료로 시료 또는 시료의 표본을 처리할 수 있으므로, 시료의 세포 농도를 비파괴적으로 추정하기 위해 표면 표지자를 사용할 수 있습니다. 이렇게 추정한 농도는, 이후의 측정을 위해 일정한 DNA - 염료 비율(몰 대 몰)을 항상 유지하기 위해, 추가할 염료의 양을 계산하는 데 사용할 수 있습니다.

[0089] 세포를 계산하기 위한 형광 기반 방법의 첫번째 예에서, 세포의 배수성을 결정하는 방법도 있을 수 있습니다(예를 들어, 형광단 결합 항체로 염색하여 세포 계산). 이 비제한적인 예에서, 특정 개수의 백혈구(WBC)를 미리 결정된 DNA 염료의 농도로 염색할 수 있도록 하기 위해 혈액 시료 내의 백혈구(WBC)의 개수를 계산하는 것이 바람직합니다(예를 들어, 4'-6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), 또는 1,5-bis{[2-(di-methylamino)ethyl]amino}-4, 8-dihydroxyanthracene-9,10-dione (DRAQ5®), 또는 프로피디움 아이오다이드, 또는 기타 DNA

착색 염료). 이 예의 방법에서 형광단 결합 항체와 분광 광도계를 사용하여 백혈구(WBC)를 계산합니다. 이 접근 방식은 DNA 염료로 세포를 염색하고 배수성을 결정할 때 도움됩니다. 여기에서 DNA 염료 농도에 대한 세포 개수의 비율(세포 개수 대 DNA 염료)은 비교 가능 및 일관성 있는 데이터를 생성하는 데 바람직합니다. 혈액 1 μL 당 세포 개수가 건강한 집단 내에서 변한다고 할 때, 배수성을 위해 염색하기 전에 1 μL 당 백혈구(WBC)의 개수를 결정하는 것이 일반적으로 바람직합니다.

[0090] 한 구현에서, 절차는 형광단 결합 항체(여기에서 항체는 CD45 같은 편재 발현 항원에 적용되거나 T 세포용 CD3 같은 부분집단 특정 항원에 적용되는 것이 좋음)나 모든 세포를 표시하는 형광 염료(예를 들어, 에오신(eosin) 같은 막 또는 세포질 착색제나 렉틴(lectin) 또는 기타 착색제 또는 염료)를 사용하여 세포를 먼저 염색합니다. 여기에서 형광단의 형광 파장은 DNA 염료의 방출 파장과는 스펙트럼적으로 분명하게 (사이 거리가 멀수록 좋음) 구분됩니다. 배양 기간 후에, 시료를 세척하여 과잉(결합되지 않은) 항체를 제거하고 적당한 양으로 준비하여 분광 광도계로 분석합니다. 결과로 얻은 데이터를 사용하여 혈액 시료에 들어 있는 백혈구(WBC)의 개수를 결정할 수 있으므로, 혈액의 특정 양을 표본(원하는 특정 개수의 백혈구)으로 취하여 DNA 염료로 염색할 수 있습니다. 결과로 얻은 데이터는, 설명한 것처럼 형광단 결합 항체를 사용하여 결정한 백혈구의 개수에 따라, 시료를 염색하는 데 사용할 DNA 염료의 양을 계산하고 조절하는 데 유용합니다.

[0091] 추가 구현에서, 세포의 표면 염색 전에 (DNA 염색을 통해) 세포의 개수를 결정합니다. 더 자세한 내용은 아래에 있는 본 문서의 세포 계산 단원에 설명되어 있습니다. 때때로 혈액 시료의 백혈구를 계산할 필요가 있습니다. 이렇게 하면, 특정 개수의 백혈구를 항체의 최적 농도로 염색할 수 있습니다. 한 구현에서, 위에서 설명한 것처럼 DNA 염료와 분광 광도계를 사용하여 백혈구의 개수를 계산하는 방법이 있습니다.

[0092] 다른 대안으로, 염색하기 전에 1 μL 당 세포 개수를 결정한 경우, (i) 건강한 집단 내의 편차와 (ii) 질병 상태에 관계 없이, 각 시료에 대해 세포의 알고 있는 개수로 표본을 얻어 염색할 수 있습니다. 혈액 1 μL 당 세포 개수를 결정하기 위해, DAPI, DRAQ5®, 또는 프로피디움 아오다이드(propidium iodide) 같은 DNA 염료를 사용할 수도 있습니다. 선택적으로, 결합되지 않은 염료는 씻어낼 수 있습니다. 분광 광도계를 사용하여 혈액 1 μL 당 유핵 세포(예, DRAQ5® 양성)의 개수를 결정할 수 있습니다.

[0093] 동일 크기 표본에 들어 있는 백혈구의 개수와 농도는 피험자(subject)마다 다릅니다. 그러나, 혈액 시료에 들어 있는 백혈구를 올바르게 분석하려면, 충분한 양의 시약(특정 백혈구 항원을 표적으로 하는 항체)을 추가해야 하며 충분한 양의 시약은 혈액 시료에 들어 있는 백혈구의 개수와 농도에 따라 다릅니다. 시료에 충분한 항체 시약을 추가하기 위해 "동적 회석"이라는 절차를 사용할 수도 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 세포들을 완전히 염색하기 위해, 시료에 사용할 시약(예를 들어, 백혈구를 염색하기 위한 항체 칵테일(혼합물))의 올바른 양을 측정하는 데 사용할, 임시 세포 개수를 얻기 위해, 이 절차는 혈액 세포를 처리합니다. 이 절차에서, 세포는 DNA 염료(예를 들어, DAPI, DRAQ5®, 또는 프로피디움 아오다이드)로 염색됩니다. DNA 염료는 다음 단계나 분석 검사에서 사용되는 형광단 결합 항체의 방출과는 스펙트럼적으로 뚜렷하거나 거리가 멂니다. 선택적으로, 배양 기간 후에 시료를 세척하여 과잉(결합되지 않은) DNA 염료를 씻어 낼 수 있습니다. 배양 기간 후에, 시료를 적당한 양으로 준비하여, 분광 광도계를 사용하여 이미지를 취하거나 측정할 수 있습니다. 결과로 생긴 데이터를 사용하여 시료의 알고 있는 양에 들어 있는 백혈구의 개수를 계산할 수 있고, 혈액의 특정 양을 표본(원하는 특정 개수의 백혈구)으로 취하여 올바른 양의 항체(즉, DNA 염료를 사용하여 백혈구의 추정 개수를 기반으로 항체를 완전하게 염색하는 데 필요한 항체의 양을 결정할 수 있음)로 염색할 수 있습니다. 그러므로, DNA 염색으로 제공된 추정치를 사용하여, 시료 표본에 들어 있는 백혈구의 개수에 필요한 항체 염료의 적당한 양을 계산하여 추가할 수 있습니다.

동적 회석 프로토콜

[0095] 한 구현에서, 동적 회석 프로토콜은, 시료 분석에 필요한 백혈구를 표적으로 하는 항체가 들어 있는 시약의 양을 추정하기 위해, 백혈구가 들어 있는 혈액 시료의 표본을 확보해야 합니다.

[0096] 이 비제한적인 예에서, 알고 있는 양의 혈액 시료를 확보합니다. 알고 있는 양의 핵 염료(예를 들어, 프로피디움 아오다이드, DAPI 또는 Draq5® 같은 DNA 착색 염료)를 이 알고 있는 양의 시료에 추가합니다. 그런 다음, 이 혼합물을 25°C ~ 40°C 온도에서 2 ~ 10 분간 배양합니다.

[0097] 그런 다음, 적혈구(RBC) 용해 완충제를 추가합니다. 이 비제한적인 예에서, 그런 다음, 이 혼합물을 25°C ~ 40°C 온도(더 낮은 온도를 사용할 수도 있음)에서 2 ~ 10 분간 배양합니다. 알맞은 용해 완충제는, 예를 들어, 저장식염수(hypotonic saline solution), 저장자당용액(hypotonic sucrose solution), 염화암모늄 등장액

(isotonic ammonium chloride solution), 사포닌 같은 순한 표면활성제(gentle surfactant)가 들어 있는 등장액(isotonic solution) 등이 될 수 있습니다. 구현에서, 이런 용해 완충제에는 백혈구 안정화에 도움되는 파라포름알데히드(paraformaldehyde) 같은 고정제가 포함되어 있습니다. 사포닌 같은 표면활성제는 세포 막에 수많은 구멍이 형성되도록 합니다. 적혈구는 막의 고유한 특성으로 인해 이런 구멍 형성에 특히 예민하고, 완전히 용해되어 내용물이 주위 액체로 흘러 나옵니다. 고정제가 존재하여 백혈구가 의도하지 않게 용해되는 것을 방지합니다. 또한 혈소판도 용해되지 않습니다. 이 단계의 목적은 적혈구가 백혈구보다 약 1000:1로 개수가 더 많을 경우, 혼합물에서 적혈구를 제거하는 것입니다. 혈소판은 이미지 확보에 간섭을 일으키지 않으므로 본 과정에서는 고려하지 않습니다. 구현에서, 용해 완충제에는 알고 있는 농도로 비형광 비드(bead)가 들어 있을 수 있습니다. 이 비드들은 크기 및/또는 농도 표지자 역할을 할 수도 있습니다. 적혈구의 용해는, 이 프로토콜의 다음 단계에서, 이미지 확보에 대해 모든 적혈구 간섭을 상당히 제거하거나 또는 백혈구 광학 측정에 대한 간섭을 상당히 제거합니다.

[0098] 그런 다음, 처리된 시료는 분리됩니다. 여기서 처리된 시료는 적당한 방법으로, 예를 들어, 원심 분리기 1200xg에서 3분간 회전하여 분리합니다. 그러나 이 방법만 있는 것은 아닙니다.

[0099] 분리한 후에(예를 들어, 원심 분리), 상청액(supernatant)이 제거됩니다. 나머지 침전물은 재현탁(resuspended)됩니다. 구현에서, 침전물은 일부 또는 모든 상청액 속에서 재현탁됩니다. 재현탁된 침전물이 들어 있는, 알려진 양의 용액은 이 단계의 결과로 만들어집니다.

[0100] 원활 경우, 추가 분리와 추가 재현탁 단계를 수행할 수도 있습니다. 이들 단계는 약 10배 농축된 세포가 들어 있는 농축 시료를 제공합니다(각 단계에서 세포 손실 무시).

[0101] 그런 다음, 재현탁 및 농축 시료에 들어 있는 DNA 착색 염료의 양을 측정합니다. 예를 들어, DRAQ5® 같은 형광 DNA 착색 염료의 형광 광도계로 측정할 수 있습니다. 구현에서, 시료는 632 nm 파장(DRAQ5®의 여기 파장)의 빛으로 조명할 수 있으며, 세포 혼탁액에서 방출된 빛은 650 nm 길이 패스 필터로 걸러 내고, 방출된 빛은 분광 광도계로 측정할 수 있습니다. 이 방출 측정값을 이전에 생성한 교정 곡선(calibration curve)과 연관시켜 세포 혼탁액에 들어 있는 백혈구의 대략적인 농도를 추정합니다. 일반적으로 세포 농도의 범위는 1 μL 당 1000 세포에서 1 μL 당 100,000 세포까지입니다. 이런 방식으로 얻은 백혈구의 추정 개수는, 이후에 양 측정에 사용될 때, 시료의 세포 농도를 미리 지정된 표적 농도의 범위(예를 들어, 두 배 또는 기타 범위) 내로 제한하기 위해, 적절한 희석 양을 계산하는 데 사용할 수도 있습니다. 그런 다음, 시료는 원하는 농도 범위 내의 백혈구 시료를 제공하기 위해 계산된 희석 양에 따라 희석됩니다.

[0102] 이 "동적 희석" 단계의 목적은 시료에서 백혈구의 농도가 너무 높거나 너무 낮지 않도록 하기 위함입니다. 세포 농도가 너무 높으면 이미지 처리 알고리즘의 정확도가 손상되고, 세포 농도가 너무 낮으면 시료의 세포 개수가 불충분합니다. 여기에 공개된 농축 시료의 희석은 원하는 범위 내에서 백혈구 농도를 제공하고 분석하는 동안 시료에서 나온 신호가 탐지와 분석을 위해 최적의 범위 내에 들어 오도록 합니다.

[0103] 또한, 이런 방식으로 얻은 백혈구 개수의 추정을 사용하여 추가 분석 검사에 필요한 시약의 양을 계산(작은 범위 내에)할 수 있고 방법 단계를 시료에 적용할 수 있습니다. 시료의 백혈구 개수가 변할 수 있지만, 다양한 분석 검사(assay)에 필요한 시약의 양은 분석 검사할 시료의 백혈구 개수에 따라 달라집니다. 예를 들어, 동적 희석 프로토콜에 의해 백혈구 개수를 추정한 후에 추가할 시약에는 다른 종류의 백혈구에서 발견되는 특정 항원을 표적으로 하는 항체가 포함되고 또는 다수 종류의 백혈구에서 발견되는 항원이 다른 종류의 백혈구에서 양이 다를 경우에 이런 항원을 표적으로 하는 항체도 포함됩니다. 시료의 백혈구 개수에 대한 이런 추정이 없을 경우, 시료에 대한 이후의 분석 검사에서 미리 결정된 양의 염료 또는 다른 시약을 사용해야 하며, 부정확한 시약의 양 또는 부정확 또는 불완전한 분석 검사 결과를 얻게 됩니다. 그러므로, 동적 희석 프로토콜은 환자의 혈액 시료를 완전 분석할 때 중요하고 유용한 초기 단계 역할을 수행하고, 다른 방법으로 가능한 것 보다 더 정확하고 정밀하게 측정할 수 있도록 해줍니다.

동적 염색

[0105] 일부 구현에서, 세포가 들어 있는 시료를 동적으로 염색하기 위한 방법, 시스템 및 장치가 제공되어 있습니다.

[0106] 세포 집단의 세포들 중에서 관심 성분 측정

[0107] 한 구현에서, 세포 시료를 동적으로 염색하는 방법은 시료 속의 세포 집단의 세포들에서 관심 성분을 측정하기 위한 방법과 관련되어 있습니다.

- [0108] 여기에 사용된 "관심 성분"은 모든 종류의 분자로 세포도 될 수 있습니다. "관심 성분"에는 단백질, 탄수화물 및 핵산이 포함됩니다. 일반적으로 "관심 성분"은 특정 항원 같은 특정 종류의 분자입니다. "관심 성분"의 비제한적인 예는 다음과 같습니다: CD5 단백질, CD3 단백질, 등.
- [0109] 여기에서 사용된 "세포 집단"은 하나 이상의 특성을 기반으로 임의의 세포군입니다. "세포 집단"은 임의의 범위로, 많은 수의 세포이거나 적은 수의 세포가 될 수 있습니다. "세포 집단"의 비제한적인 예에는 다음이 포함됩니다: 적혈구(RBC), 백혈구, B 세포, CD34+ B 세포 등.
- [0110] 일부의 경우, 피험자 시료의 특정 세포 집단에서 세포의 관심 성분을 정량적으로 측정할 필요가 있습니다. 예를 들어, 만성 램프구백혈병이 있는 피험자의 세포 시료 중에서, B 세포들("세포 집단")에서의 CD5("관심 성분") 발현 정도를 측정할 필요가 있습니다. 관심 성분 수준을 탐지하거나 측정할 때, 항체 또는 또는 scFv(single chain variable fragment) 같은 특정 관심 성분에 대해 친화성을 갖고 있는 결합체 분자를 사용해야 할 수도 있습니다. 결합체 분자를 사용하는 방법으로 세포에서 특정 관심 성분의 수준을 정확하게 측정하려면, 표적 관심 성분에 대한 결합체 분자의 특정 비율 또는 비율 범위로, 세포를 결합체 분자에 노출하는 것이 이롭습니다. 예를 들어, 특정 양의 결합체를 세포 수집에 제공하여 세포들의 관심 성분의 양과 세포들 중의 관심 성분과 결합하는 결합체의 양 사이에 선형적(1차원적) 관계가 있도록 하는 것이 바람직합니다. 예를 들어, 너무 작은 양의 결합체(세포들 중의 모든 관심 성분과 결합하기에 결합체가 충분하지 않습니다)를 갖도록 하거나 너무 많은 양의 결합체(결합체가 모든 세포와 결합합니다)를 갖도록 하는 것은 바람직하지 않습니다.
- [0111] 재래식 방법을 사용하여, 세포 집단의 크기 및/또는 시료의 관심 성분의 크기가 시료들마다 크게 다를 수 있기 때문에, 시료 내의 세포 집단의 관심 성분의 양을 정확하게 측정하기 위해 시료에 적정 수준의 결합체를 제공하는 것은 어렵습니다. 그에 반해서, 다양한 범위의 세포 집단과 관심 성분이 들어 있는 시료에 알맞게, 세포 시료를 동적으로 염색하기 위한 방법, 장치 및 시스템이 여기에 제공되어 있습니다.
- [0112] 한 구현에서, 시료 내의 세포 집단의 세포들에 들어 있는 관심 성분을 측정하기 위한 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법은 하나 이상의 다음 단계(이것들에만 국한되지 않고)를 포함하고 있습니다.
- [0113] 첫째, 세포 집단의 세포들에 들어 있는 표지자를 정량적 또는 준정량적으로 측정할 수 있습니다. 표지자는 관심 세포 집단에 들어 있는 임의의 표지자가 될 수 있으며, 관심 세포 집단에서 배타적으로 존재하는 표지자가 될 수도 있습니다(즉, 시료의 다른 종류의 세포에는 들어 있지 않음). 표지자 측정은, 시료를 파괴만 하지 않으면 임의의 시스템이나 장치를 사용하는, 임의의 방법으로 수행할 수 있습니다. 표지자를 인식하는 결합체를 시료와 혼합할 수 있습니다. 결합체에는 결합체(예, 형광 표지자)의 탐지를 용이하게 하는 분자가 붙어 있을 수도 있습니다. 한 예에서, 표지자는 형광 분광 광도계를 사용하여 탐지 및/또는 측정할 수 있습니다. 결합체에 형광 표식이 있고 표지자가 형광 분광 광도계로 측정되는 구현에서, 형광 분광 광도계는 시료 또는 시료의 표본에서 개별 세포 대신에 전체 형광을 측정하는 데 사용됩니다.
- [0114] 둘째, 세포 집단의 세포들에 있는 표지자의 정량적 또는 준정량적(semi-quantitative) 측정을 기반으로, 시료에 들어 있는 세포 집단의 세포들의 대략적인 양 또는 농도를 결정할 수 있습니다. 시료에 들어 있는 세포 집단의 세포들의 대략적은 수 또는 농도는, 예를 들어, 교정 곡선(calibration curve)을 사용하여 결정할 수 있습니다. 교정 곡선은 서로 다른 표지자 / 결합체 조합에 대해 준비하거나 사용할 수 있습니다. 교정 곡선은, 예를 들어, 특정 표지자가 있거나 특정 결합체와 결합된 세포들의 알고 있는 개수에서 나오는 신호를 측정하여 작성할 수 있습니다. 일부 구현에서, 시료에 들어 있는 세포 집단의 세포들의 대략적인 양 또는 농도는 컴퓨터를 이용하여 결정할 수도 있습니다. 어떤 면에서, 시료에 들어 있는 세포 집단의 세포들의 대략적인 개수 또는 농도는 결정할 수 있으며, 이런 결정은 약 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 400 이하 이거나 또는 실제 농도의 500% 이하입니다.
- [0115] 셋째, 시료에 들어 있는 세포 집단의 세포들의 결정된 양 또는 농도를 기반으로, 시료에 추가할 시약의 양을 선택할 수 있습니다. 여기에서 시약은 세포 집단의 세포들의 관심 성분에 대해 특정적으로 결합합니다. 시약은 관심 성분에 특정적으로 결합하는 임의의 분자가 될 수 있습니다. 예를 들어, 시약은 항체 같은 결합체가 될 수도 있습니다. 시약은 쉽게 탐지되거나(예를 들어, 형광 또는 발광) 또는 적어도 특정 상황에서 탐지 가능 신호를 방출하도록 구성할 수 있습니다. 일부 구현에서, 시약의 탐지를 용이하게 하기 위해, 시약은 분자에 부착될 수 있습니다. 시료에 추가되는 시약의 양은 임의의 양이 될 수 있습니다. 일부 구현에서, 시료에 특정 양의 시약을 추가하여, 세포 집단들의 개별 세포들의 관심 성분 수준과 세포 집단의 개별 세포들의 관심 성분과 결합된 시약에서 생성되는 신호 사이에 근사적인 선형(1차원적) 관계가 있도록 할 수 있습니다.

- [0116] 넷째, 시료에 추가할 시약의 양을 선택한 후에, 시약의 선택한 양을 시료에 추가할 수 있습니다.
- [0117] 다섯째, 시료의 세포들은 관심 성분과 결합한 시약에 대해 분석 검사할 수 있습니다.
- [0118] 여섯째, 관심 성분과 결합한 시약의 양을 기반으로, 시료의 세포 집단의 세포들의 관심 성분의 양을 결정할 수 있습니다.
- [0119] 일부 구현에서, 다섯째와 여섯째 단계를 함께 수행하여 관심 성분과 결합한 시약의 양을 측정하면 시료의 세포 집단의 세포들에 들어 있는 관심 성분의 양을 식별하는 데 충분합니다.
- [0120] 일부 구현에서, 시료를 동적으로 염색하기 위한 시스템과 장치가 제공되어 있습니다. 시스템과 장치에는 분광 광도계와 형광 현미경이 포함되나 이것들에만 제한되지는 않습니다. 한 구현에서, 시료를 동적으로 염색하기 위한 시스템 또는 방법은 미국 특히 신청 번호 13/244,947 또는 13/355,458에 설명된 대로 구성될 수 있습니다. 이것들은 그 자체로 완전하게 참조에 의해 각각 통합되어 있습니다. 한 구현에서, 세포 집단의 세포들에 들어 있는 표지자의 양을 측정하여, 시료의 세포 집단의 세포들에 들어 있는 관심 성분의 양을 결정하기 위해, 시스템과 장치는 시료에 추가할 시약의 양을 자동으로 결정할 수 있습니다. 다른 한 구현에서, 시료의 세포 집단의 세포들에 들어 있는 두번째 성분의 양을 측정하여, 시료의 세포 집단의 세포들에 들어 있는 첫번째 성분의 양을 결정하기 위해, 시스템과 장치는 시료에 추가할 시약의 양을 자동으로 결정할 수 있습니다.
- [0121] 상황 기반 자동 초점**
- [0122] 일부 구현에서, 상황 기반 현미경 자동 초점을 위해 방법, 시스템, 및 장치가 제공되어 있습니다.
- [0123] 생체시료에 들어 있는, 임상적으로 관련 있는 많은 대상물의 크기(예: 길이, 높이, 또는 기타 측정 수치)는 범위가 광대합니다. 예를 들어, 박테리아는 일반적으로 길이가 약 1 μm 이고, 적혈구는 일반적으로 길이가 약 6-8 μm 이며, 백혈구는 일반적으로 길이가 약 10-12 μm 이며, 상피세포는 길이가 약 100 μm 이고, 원주(cast)와 결정(crystal)은 길이가 약 200-300 μm 입니다. 또한, 스트랜드(strand) 또는 필라멘트(filaments) 형태로 존재하는 비뇨 점액(urinary mucus) 같은, 수많은 무형 요소가 있습니다. 스트랜드나 필라멘트의 길이의 범위는 약 10-400 μm 입니다.
- [0124] 현미경법의 어려운 점은 위에서 설명한 것들과 같은 다양한 크기의, 알려지지 않은, 임의의 대상물들의 합성이 들어 있는, 시야의 정확한 이미지를 얻는 것입니다. 많은 수의 현미경 대물부의 초점 깊이가 제한되어 있고(일반적으로 약 1-10 μm), 다양한 크기의 소자들이 들어 있는 주어진 시야에 대해, 시야 내의 다양한 소자들의 정확하고 선명한 이미지를 얻으려면, 주어진 시야에 대한 다수의 초점 면(focal planes)을 확보해야 합니다. 수많은 재래식 자동 초점 방법의 문제점은, 재래식 자동 초점 방법은 시야 내의 지배적인 특징물에 초점을 맞추도록 설계되어 있고 해당 특징물의 선명도를 최대화할 수 있도록 되어 있습니다. 이런 방법들은 시료에 들어 있는 다양한 크기의 요소를 포착하는 데는 비효과적입니다.
- [0125] 한 구현에서, 상황 기반 현미경 자동 초점을 위한 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법에서, 현미경법을 위해 알고 있는 크기의 기준 입자를 시료와 혼합합니다. 구현에서, 둘 이상의 기준 입자를 시료에 추가합니다. 이런 기준 입자들 모두 또는 상당히 모두는 알고 있는 동일한 크기의 입자들입니다. 구현에서, 시료의 특정 부피에 추가된 기준 입자의 개수는 알고 있습니다. 기준 입자들은 현미경법 동안 탐지되며 초점을 맞추는 데 사용됩니다. 초점을 맞추는데 기준 입자를 사용하면, 전체적인 이미지 합성과는 독립적으로 초점 면들(focal planes)을 선택할 수 있습니다. 한 면에서, 이 방법은 요소들의 알려지지 않은 합성(성분)이 있는 시료에 초점을 맞추는데 편리할 수 있습니다. 다른 면에서, 이 방법은 현미경의 정밀도 또는 현미경 관련 하드웨어와 관계 없이, 초점의 정확한 면을 생성할 수도 있습니다. 예를 들어, 시야 내의 기준 입자의 선명도에서 얻은 피드백을 기반으로 초점 면을 선택할 때, 초점 맞추기 하드웨어[예를 들어, 현미경 대물부 발동 작용, 시료 홀더의 모양(예를 들어, 큐벳 또는 슬라이드)]의 정확성이나 정밀도에 관계없이, 시료 내의 다양한 요소에 대해 정확하게 초점을 맞출 수 있습니다.
- [0126] 한 구현에서, 기준 입자에는 현미경법 동안 입자의 탐지를 용이하게 하는 문자가 포함되거나 문자로 표식될 수 있습니다. 한 예에서, 기준 입자는 형광 문자로 표식되거나 형광 문자가 들어 있을 수 있습니다. 형광 문자는 첫번째 파장의 빛을 흡수할 수 있으며, 첫번째 파장의 흡수에 반응하여 두번째 파장의 빛을 방출할 수 있습니다. 한 구현에서, 기준 입자와 혼합된 시료는 관심 기준 입자에 들어 있는 형광 문자를 여기시킬 수 있는 파장의 빛에 노출될 수 있고 형광 문자에서 방출된 빛을 측정할 수 있습니다. 기준 입자의 특정 형광은 기준 입자를 탐지하는 데 사용할 수 있고, 시료에 들어 있는, 탐지된 기준 입자에서 얻은 정보는 자동 초점 맞추기에

사용할 수 있습니다.

[0127]

기준 입자는 구모양 또는 직육면체 같은 임의의 모양이 될 수 있습니다. 기준 입자에는, 제한 없이, 비드와 마이크로스피어가 포함됩니다. 기준 입자는 임의의 크기가 될 수 있으며, 지름 또는 길이가 약 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 125, 150, 175, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 또는 500 μm 입니다. 기준 입자는 폴리스티렌, 폴리에틸렌, 라텍스, 아크릴 또는 유리 같은 적합한 물질로 만들어 지거나 포함할 수 있습니다. 예를 들어, 기준 입자는 폴리스티렌 비드가 될 수 있습니다. 예를 들어, 지름이 약 0.1 μm ~ 약 50 μm 사이, 약 1 μm ~ 약 20 μm , 약 5 μm ~ 약 15 μm 사이 이거나, 약 10 μm 인 폴리스티렌 비드가 될 수 있습니다.

[0128]

한 구현에서, 현미경의 초점을 맞추는 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법에는 하나 이상의 다음 단계가 포함되어 있습니다. 첫째, 현미경 분석할 대상물(예, 박테리아, 적혈구, 등)가 들어 있는 시료는 기준 입자와 혼합할 수 있습니다. 기준 입자는 형광단(fluorophore) 같은 입자의 탐지를 용이하게 하기 위해, 분자를 포함하거나 분자로 표식될 수 있습니다. 둘째, 기준 입자와 시료가 들어 있는 혼합물은, 예를 들어, 큐벳 또는 슬라이드에서, 현미경의 광로에 배치될 수 있습니다. 선택적으로, 기준 입자는 큐벳 또는 슬라이드 속에서 시료의 바닥으로 가라 앉을 수 있고, 이렇게 하여, 기준 입자는 시료와 접하고 있는 큐벳 또는 슬라이드의 가장 아래면에 얹히게 됩니다. 현미경은, 형광 현미경을 포함하여, 임의의 종류가 될 수 있습니다. 셋째, 기준 입자를 시각화하도록 구성된 광선에 노출될 수도 있습니다. 광선은 임의의 종류가 될 수 있으며 기준 입자에 대해 임의의 방향이 될 수 있습니다. 예를 들어, 광선은 기준 입자 내에 또는 부착된 형광단을 여기시킬 수 있는 파장이 될 수 있습니다. 기준 입자를 광선에 노출하면, 예를 들어, 기준 입자에서 방출된 특정 파장의 빛이 생성되거나 방출되고 기준 입자에서 빛이 분산됩니다. 넷째, 기준 입자에서 방출되었거나 분산된 빛은 현미경으로 탐지할 수 있으며, 이 정보는 혼합물 내에서 기준 입자의 위치를 결정하는 데 사용하거나 현미경의 초점을 맞추는 데 사용할 수 있습니다. 선택적으로, 현미경은 기준 입자와 비슷한 크기의 대상물에 적합한 초점 면으로 초점을 맞출 수 있습니다. 이미지 센서를 사용하여 현미경에서 이미지를 얻을 수 있습니다. 이미지를 저장하고 이미지 분석에 사용할 수 있습니다.

[0129]

일부 구현에서, 복수의 기준 입자를 시료에 추가할 수 있습니다. 기준 입자는 모두 같은 크기이거나 다른 크기가 될 수도 있습니다. 일부 구현에서, 다른 크기의 기준 입자에는 다른 형광단이 들어 있습니다. 다른 형광단은 다른 흡수 파장, 다른 방출 파장 또는 둘 모두를 갖고 있을 수 있습니다.

[0130]

한 구현에서, 현미경의 초점을 맞추기 위한 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법에서, 현미경법을 위해 둘 이상의 알고 있는 크기의 기준 입자를 시료와 혼합하고, 적어도 기준 입자의 둘 이상은 서로 다른 크기이며 서로 다른 형광단을 포함하고 있습니다. 이 방법은 하나 또는 그 이상의 다음 단계를 포함하고 있습니다. 첫째, 현미경으로 분석할 대상물이 들어 있는 시료는 둘 이상의 기준 입자와 혼합할 수 있습니다. 여기서, 적어도 둘 이상의 기준 입자는 크기가 서로 다르고 서로 다른 형광단을 포함하고 있습니다(즉, "첫번째 기준 입자"와 "두번째 기준 입자"). 둘째, 기준 입자와 시료가 들어 있는 혼합물은 현미경의 광로에 배치할 수 있습니다. 현미경은, 형광 현미경을 포함하여, 임의의 종류가 될 수 있습니다. 셋째, 혼합물은 첫번째 기준 입자를 시각화하도록 구성된 광선에 노출될 수 있습니다. 광선은 임의의 종류가 될 수 있으며 첫번째 기준 입자에 대해 임의의 방향이 될 수 있습니다. 예를 들어, 광선은 첫번째 기준 입자 내에 또는 부착된 형광단을 여기시킬 수 있는 파장이 될 수 있습니다. 첫번째 기준 입자를 광선에 노출시키면 첫번째 기준 입자에서 나온 특정 파장의 빛이 생성되거나 방출되거나 또는 분산될 수 있습니다. 넷째, 첫번째 기준 입자에서 방출되었거나 분산된 빛을 탐지할 수 있으며, 이 정보는 혼합물 내에서 첫번째 기준 입자의 위치를 결정하는 데 사용되거나 첫번째 기준 입자와 크기가 같은 대상물에 알맞은 첫번째 초점 면으로 현미경의 초점을 맞추는 데 사용할 수 있습니다. 선택적으로, 이미지 센서를 사용하여 첫번째 초점 면의 이미지를 얻을 수 있습니다. 이미지를 저장하고 이미지 분석에 사용할 수 있습니다. 다섯째, 혼합물은 두번째 기준 입자를 시각화하도록 구성된 광선에 노출될 수 있습니다. 광선은 임의의 종류가 될 수 있으며 두번째 기준 입자에 대해 임의의 방향이 될 수 있습니다. 두번째 기준 입자를 광선에 노출시키면 두번째 기준 입자에서 나온 특정 파장의 빛이 생성되거나 방출되거나 또는 분산될 수 있습니다. 여섯째, 두번째 기준 입자에서 방출되었거나 분산된 빛을 탐지할 수 있으며, 이 정보는 혼합물 내에서 두번째 기준 입자의 위치를 결정하는 데 사용되거나 두번째 기준 입자와 크기가 같은 대상물에 알맞은 두번째 초점 면으로 현미경의 초점을 맞추는 데 사용할 수 있습니다. 선택적으로, 이미지 센서를 사용하여 두번째 초점 면의 이미지를 얻을 수 있습니다. 이미지를 저장하고 이미지 분석에 사용할 수 있습니다.

[0131]

다른 구현에서, 상황 기반 현미경법 자동 초점 맞추기를 위한 시스템과 장치가 제공되어 있습니다. 시스템과 장치에는 형광 현미경이 포함되나 이것에만 제한되지는 않습니다. 한 구현에서, 시스템과 장치는 현미경 분석을

위해 알고 있는 크기의 기준 입자를 시료에 자동으로 추가하여 혼합물을 만듭니다. 이 혼합물을 현미경의 광로에 위치시키고, 기준 입자를 시각화하도록 구성된 광선에 혼합물을 노출시키고, 혼합물 내에서 기준 입자의 위치를 결정하고, 혼합물 내에서 기준 입자의 위치를 기반으로 현미경의 초점을 맞춥니다. 한 구현에서, 상황을 기반으로 현미경의 초점을 자동으로 맞추기 위한 시스템 또는 방법은 미국 특허 신청 번호 13/244,947 또는 13/355,458에 설명된 대로 구성될 수 있습니다. 이것들은 그 자체로 완전하게 참조에 의해 각각 통합되어 있습니다.

[0132] 시료 홀더 위치 지정

일부 구현에서, 시료 홀더의 위치, 시료 홀더의 일부의 위치, 시료 홀더에 있는 색인표식(indicial mark)의 위치 등을 결정(판단)하기 위한 방법, 시스템 및 장치가 제공되어 있습니다. 이런 결정(판단)은, 시료 홀더가 이동되거나 시야가 (예를 들어, 초점 바꾸기 또는 시료 홀더에서 다른 영역 검사 등으로 인해) 변경된 후에도, 정확해야 하며, 세포, 입자 또는 시료 홀더 내의 시야에 들어 있는 다른 대상물을 식별하는 데 유용해야 합니다.

구현에서, 큐벳, 예를 들어, 채널 또는 시료가 들어 있는 다른 영역에서 특정 위치를 정확하게 결정하기 위해 이미지 기반 피드백 시스템을 사용할 수 있습니다(그림 7과 8에서 분석 영역 608 참조). 이런 결정은, 특히 시료 홀더가 이동된 후에 다시 이전 위치로 되돌려졌을 때, 이동 전후의 이미지 비교와 광학 측정 비교를 위해 중요합니다. 다수 출처로부터의 가변성은 이미지 확보 시스템의 측에 대해 상대적으로 시료의 위치에 영향을 줄 수 있습니다. 예를 들어, 큐벳 부품의 가변성, 큐벳 어셈블리의 가변성, 이미지 확보 시스템에서 큐벳 위치의 가변성, 및 기타 가능 출처로 인한 가변성은 시료가 시료 홀더 내에서 동일한 위치에 있을 때에도 이미지 확보 시스템에 대해 시료의 위치에 영향을 줄 수 있습니다. 이미지 확보 시스템에 대해 시료 홀더의 위치를 식별하고 결정하기 위한 방법이 여기에 공개되어 있습니다. 예를 들어, 큐벳 내에서 관심 영역을 정확하고 재현 가능하도록 이미지를 확보하기 위해, 큐벳 등록 프로그램을 실행할 수 있습니다. 구현에서, 프로그램은 시료 홀더 내에서 미리 지정된 위치에서 얻은 이미지를 분석하여 시작됩니다. 미리 지정된 위치는 등록 특징물에 가깝거나 시야 내의 기준 표지자에 가깝거나, 그렇지 않을 경우, 프로그램에 의해 탐지될 수 있습니다. 큐벳 등록 프로그램에는 이미지 처리 프로그램이 들어 있습니다. 이미지 처리 프로그램은 이미지 내에서 기준 표지자의 존재를 검색하고, 예/아니요 대답(검사 영역 내에서 기준 표지자의 발견 여부) 중 하나를 반환하거나 이미지 내에서 표지자의 존재 가능성(확률)을 반환합니다. 검사한 영역 내에서 기준 표지자가 발견되지 않은 경우, 검색 알고리즘이 사용됩니다. 검색 알고리즘은 검사 영역을 시료 홀더 내의 다른 영역으로 이동하고 이미지 확보를 반복합니다. 이 과정은 프로그램이 기준 표지자를 찾을 때까지 반복됩니다(즉, 검사 영역 내에서 기준 표지자의 발견 여부에 대해 "예"를 받거나 또는 해당 영역 내에서 표지자의 존재 가능 확률을 최대화합니다). 시료 홀더의 치수와 배치를 알고 있으므로, 기준 표지자의 위치가 일단 식별되면, 시료 홀더 내의 모든 다른 위치들이 결정될 수 있습니다. 그러므로, 기준 표지자의 위치를 식별한 후에, 관심 지점의 위치를 알기 때문에(즉, 기준 표지자로부터 거리와 방향을 알고, 기준 표지자의 위치를 알기 때문에 관심 지점도 알 수 있으므로), 이미지 확보를 위한 관심 지점을 찾을 수 있고 이미지를 확보할 수 있습니다. 구현에서, 기준 표지자는 큐벳 자체에 특별히 제작된 특징물이거나 이런 특징물을 포함할 수 있습니다. 이 특징물은 모든 부품에 대해 원하는 공차로 동일한 위치에 제작될 수 있습니다. 구현에서, 기준 표지자는, 관심 지점으로부터 항상 고정 거리에 있는, 큐벳의 특징물(예, 채널의 가장자리)이거나 이런 특징물을 포함할 수 있습니다(예를 들어, 기준 표지자가 채널의 가장자리 일 경우, 기준 표지자는 항상 채널의 중심 축에서 고정된 거리입니다).

[0135] 세포 계산 / 세포 개수 계산

일부 구현에서, 시료에 들어 있는 세포를 계산하기 위한 방법, 시스템, 및 장치 등이 제공되어 있습니다.

세포가 들어 있는 시료를 염색하기 위한 특정 재래식 방법에서는 시료(혈액)의 특정 부피를 특정 농도 또는 양의 염료로 염색합니다. 이런 방법을 "부피 기준 염색(volumetric staining)"이라고 부릅니다. 부피 기준 염색에는 다음과 같은 여러 가지 단점이 있습니다: (i) 이 방법은 서로 다른 피험자들 사이에서, 세포 부분집단에 들어 있는 정상적인 변화(차이)를 처리하지 못합니다(예를 들어, 서로 다른 건강한 피험자들은 CD3+ T 세포 같은, 세포 부분집단의 개수가 매우 다릅니다. 여기에서 "CD3+"는 CD3 표지자를 발현시키는 T 세포를 나타냅니다). (ii) 이 방법은 병적인(pathological) 시료가 건강한 시료와 비교했을 때 세포 성분이 매우 다를 수 있다는 것을 처리하지 못합니다(예를 들어, 혈액에 들어 있는 CD3+ T 세포의 백분율과 개수는 건강한 피험자의 백분율과 개수보다 T 세포 백혈병이 있는 환자에게서 훨씬 더 큽니다).

세포가 들어 있는 시료를 정확하고 재현 가능하게 염색하려면, 특정 양의 세포 염료(예를 들어, DNA 염료, 항체, 결합체 등)를 특정 개수 또는 농도의 세포에 추가해야 합니다. 예를 들어, 시료에 들어 있는 1000 개의

백혈구 당 백혈구용 특정 염료 $0.2 \mu\text{g}$ (microgram)을 추가하는 것이 바람직합니다. 염료가 들어 있는 세포를 배양한 후에, 시료를 세척하여 과잉(결합되지 않은) 염료를 제거하고, 현미경 검사와 이미지를 얻기 위해 적당한 세포 농도로 준비할 수 있습니다. 이런 방식으로 착색제와 착색 절차를 특정 세포 개수에 대해 최적화 및 표준화할 있습니다.

[0139]

한 구현에서, 시료에 들어 있는 관심 세포의 개수를 계산하기 위한 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법은 하나 또는 그 이상의 다음 단계 또는 요소를 포함하고 있습니다. 시료에 들어 있는 관심 세포와 결합할 첫번째 염료를 시료에 추가할 수 있습니다. 첫번째 염료와 시료의 혼합물을 배양할 수 있습니다. 첫번째 염료와 시료의 혼합물에 들어 있는 세포를 세척하여 과잉(결합되지 않은) 염료를 제거할 수 있습니다. 첫번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 추가 분석하기 위해 원하는 부피(양)로 준비할 수 있습니다. 첫번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 분광 광도계로 분석할 수 있습니다. 분광 광도계로 얻은 데이터는 시료에 들어 있는 세포들의 대략적인 개수를 계산하는 데 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 첫번째 염료는 핵산과 결합하는 형광 염료가 될 수 있으며 분광 광도계에는 형광 염료의 여기 광장에서 빛을 방출하는 광원이 포함되어 있고, 형광 염료의 방출 광장의 빛을 탐지할 수 있는 광센서가 포함되어 있습니다. 이 예에서, 염료에서 나오는 형광 신호를 기반으로, 시료에 들어 있는 핵산의 대략적인 양을 계산할 수 있고 시료에 들어 있는 핵산의 대략적인 양으로, 시료에 들어 있는 세포의 대략적인 개수를 결정할 수 있습니다. 시료에 들어 있는 세포의 개수를 기반으로, 시료에 들어 있는 관심 세포와 결합하는 두번째 염료를 시료에 추가할 수 있습니다. 구현에서, 시료에 추가된 두번째 염료의 양은, 첫번째 염료를 사용하여 결정된 세포의 대략적인 개수를 기반으로, 결정할 수 있습니다. 구현에서, 시료에 추가된 두번째 염료의 양은 첫번째 염료를 사용하여 결정된 세포의 개수를 사용하여 계산할 수 있습니다. 이렇게 하여, 한 세포 당 두번째 염료의 원하는 비율을 얻을 수 있습니다. 두번째 염료와 시료의 혼합물을 배양할 수 있습니다. 두번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 추가 분석하기 위해 원하는 부피(양)로 준비할 수 있습니다. 두번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 분광 광도계로 분석할 수 있습니다.

[0140]

세포들의 배수성을 결정하기 전에 시료에 들어 있는 세포의 개수 계산

[0141]

한 구현에서, 세포들의 배수성을 결정하기 전에 시료에 들어 있는 세포의 개수를 계산하기 위한 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법에는 하나 이상의 다음과 같은 단계 또는 요소가 들어 있습니다. 시료에 들어 있는 관심 세포와 결합하는 첫번째 염료(이 염료는 DNA 염료에서 방출되는 것과 스펙트럼적으로 분명해야 함)를 시료에 추가할 수 있습니다. 관심 세포는, 예를 들어, 백혈구가 될 수 있습니다. 첫번째 염료는, 예를 들어, 형광단 결합 항체가 될 수 있습니다. 형광단 결합 항체는, 예를 들어, 광범위하게 표출되는 항원(예, CD45)과 결합하거나 세포의 특정 부분집단(예, T 세포용 CD3)에 의해 발현되는 항원과 결합할 수도 있습니다. 첫번째 염료와 시료의 혼합물을 배양할 수 있습니다. 첫번째 염료와 시료의 혼합물에 들어 있는 세포를 세척하여 과잉(결합되지 않은) 염료를 제거할 수 있습니다. 첫번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 추가 분석하기 위해 원하는 부피(양)로 준비할 수 있습니다. 첫번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 분광 광도계로 분석할 수 있습니다. 분광 광도계로 얻은 데이터는 시료에 들어 있는 세포들의 대략적인 개수를 계산하는 데 사용할 수 있습니다. 시료에 들어 있는 세포의 개수를 기반으로, 시료에 들어 있는 관심 세포와 결합하는 두번째 염료를 시료에 추가할 수 있습니다. 두번째 염료는 프로피디움 아이오다이드(propidium iodide) 또는 4',6-diamidino-2-phenylindole ("DAPI") 같은 DNA 염료가 될 수 있습니다. 구현에서, 시료에 추가된 두번째 염료의 양은, 첫번째 염료를 사용하여 결정된 세포의 대략적인 개수를 기반으로, 결정할 수 있습니다. 구현에서, 시료에 추가된 두번째 염료의 양은 첫번째 염료를 사용하여 결정된 세포의 개수를 사용하여 계산할 수 있습니다. 이렇게 하여, 한 세포 당 두번째 염료의 원하는 비율을 얻을 수 있습니다. 두번째 염료와 시료의 혼합물을 배양할 수 있습니다. 두번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 추가 분석하기 위해 원하는 부피(양)로 준비할 수 있습니다. 두번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 현미경법으로 배수성에 대해 분석할 수 있습니다.

[0142]

세포들의 배수성을 결정하기 위한 방법들에서, 세포들의 배수성에 대해 정확하고 일관성 있는 데이터를 생성하려면, 배수성 분석을 위해, 주어진 개수의 세포들을 특정 양 또는 농도의 DNA 염료와 결합하는 것이 중요합니다. 한 예에서, 혈액 부피 당 백혈구의 개수는 건강한 집단 내에서 변할 수 있기 때문에, 배수성 분석을 위해, 백혈구를 염색하기 전에, 특정 양(부피)의 혈액에 들어 있는 백혈구의 개수를 결정하는 것이 바람직합니다.

[0143]

세포들의 배수성을 결정하기 위해, 위에서 제공된 방법들은, 세포의 핵산 내용물과 연관된 특성을 결정하기 전에 시료에 들어 있는 세포의 개수를 계산하는 임의의 방법에 대해 수행할 수도 있습니다. 예를 들어, 세포 핵의 모양, 세포 핵의 크기, 전체 세포 면적에 대한 핵 면적의 비율 등을 결정하기 전에, 상기 방법은 시료에 들

어 있는 세포의 개수를 계산하는 데 사용한 방법과 함께 사용할 수 있습니다.

[0144] 세포 표면을 염색하기 전에 시료에 들어 있는 세포 계산

한 구현에서, 세포 표면을 염색하기 전에 시료에 들어 있는 세포를 계산하는 방법이 제공되어 있습니다. 이 방법에는 다음 단계 또는 요소가 하나 이상 포함되어 있습니다. 시료에 들어 있는 관심 세포와 결합하고, 관심 세포의 표면을 염색하는 데 사용하는 염료에서 방출되는 것과 스펙트럼적으로 분명히 구분되는 첫 번째 염료를 시료에 추가할 수 있습니다. 관심 세포는, 예를 들어, 백혈구가 될 수 있습니다. 첫번째 염료는, 예를 들어, DNA 염료(예, 프로피디움 아이오다이드, DRAQ5® 또는 DAPI)가 될 수 있습니다. 첫번째 염료와 시료의 혼합물을 배양할 수 있습니다. 첫번째 염료와 시료의 혼합물에 들어 있는 세포를 세척하여 과잉(결합되지 않은) 염료를 제거할 수 있습니다. 첫번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 추가 분석하기 위해 원하는 부피(양)로 준비할 수 있습니다. 첫번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 분광 광도계로 분석할 수 있습니다. 분광 광도계로 얻은 데이터는 시료에 들어 있는 세포들의 대략적인 개수를 계산하는 데 사용할 수 있습니다. 시료에 들어 있는 세포의 개수를 기반으로, 시료에 들어 있는 관심 세포와 결합하는 두번째 염료를 시료에 추가할 수 있습니다. 구현에서, 시료에 추가된 두번째 염료의 양은, 첫번째 염료를 사용하여 결정된 세포의 대략적인 개수를 기반으로, 결정할 수 있습니다. 구현에서, 시료에 추가된 두번째 염료의 양은 첫번째 염료를 사용하여 결정된 세포의 개수를 사용하여 계산할 수 있습니다. 이렇게 하여, 한 세포 당 두번째 염료의 원하는 비율을 얻을 수 있습니다. 두번째 염료는, 예를 들어, 형광단 결합 항체는, 예를 들어, 광범위하게 표출되는 항원(예, CD45)과 결합하거나 세포의 특정 부분집단(예, T 세포용 CD3)에 의해 발현되는 항원과 결합할 수도 있습니다. 두번째 염료와 시료의 혼합물을 배양할 수 있습니다. 두번째 염료와 시료의 혼합물에 들어 있는 세포를 세척하여 과잉 염료를 제거할 수 있습니다. 두번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 추가 분석하기 위해 원하는 부피(양)로 준비할 수 있습니다. 두번째 염료로 염색된, 세척한 세포를 현미경법으로 세포 표면 항원에 대해 분석할 수 있습니다.

[0146] 세포들의 세포 표면 항원을 염색하기 위한 방법들에서, 세포 표면의 내용에 대해 정확하고 일관성 있는 데이터를 생성하려면, 분석을 위해, 주어진 개수의 세포들을 특정 양 또는 농도의 세포 표면 항원 염료와 결합하는 것이 중요합니다. 한 예에서, 혈액 부피 당 백혈구의 개수는 건강한 집단(건강한 피험자의 혈액에는 일반적으로 1 μL 당 약 300 ~ 10,000 사이의 백혈구가 있음) 내에서 변할 수 있기 때문에, 세포 표면 항원에 대해, 백혈구를 염색하기 전에, 특정 양(부피)의 혈액에 들어 있는 백혈구의 개수를 결정하는 것이 바람직합니다. 다른 한 예에서, 혈액 부피 당 백혈구의 개수는 건강한 피험자와 환자 피험자 사이에 변할 수 있기 때문에(예를 들어, 림프종 환자의 경우 혈액 1 μL 당 백혈구 100,000개까지 있을 수 있습니다), 세포 표면 항원에 대해, 백혈구를 염색하기 전에, 특정 양(부피)의 혈액에 들어 있는 백혈구의 개수를 결정하는 것이 바람직합니다.

[0147] 그러므로, 이론적인 한 예로, 건강한 환자의 경우, 혈액 1 μL 당 5000 개의 세포가 있고, 이들 중 500 개는 CD3+ T 세포이지만 림프종 환자의 경우, 혈액 1 μL 당 50,000 개의 세포가 있고, 이들 중 45,000 개는 CD3+ T 세포입니다. 혈액 100 μL 를 재래식 방법으로 염색할 경우, 건강한 피험자의 시료에는 총 세포 개수가 약 500,000 개이고, 이 중에 약 50,000 개의 세포는 CD3+ T 세포입니다. 림프종 피험자의 100 μL 시료에는 총 세포 개수가 약 5,000,000 개이고, 이 중에 약 4,500,000 개의 세포는 CD3+ T 세포입니다. 이 이론적 예에서, 병적인(환자) 시료에는, 건강한 피험자의 시료와 비교할 때, 총 세포 개수가 10배 더 많이 들어 있으며, CD3+ T 세포의 개수가 90배 더 많습니다. 병적인(환자의) 시료를 건강한 피험자의 시료에 최적화되어 있는 재래식 "부피 기준 염색(volumetric staining)" 접근 방식으로 염색하면, 림프종 피험자의 시료는 충분하게 염색되지 않습니다. 이런 이유 때문에, 예를 들어, 현재 방법들은, 시료에 적용되는 염료의 양을 조정하기 위해 시료에 들어 있는 세포의 개수를 미리 추정하므로, 재래식 부피 기준 염색 방법 보다 장점을 제공합니다.

[0148] 따라서, 본 문서에 제공된 방법들은 세포를 염색하기 전에 시료에 들어 있는 세포의 개수를 계산하는 데 사용됩니다. 이렇게 하여, 시료에 대해 정확하고 일관성 있는 데이터를 생성할 수 있습니다.

[0149] 방법 속도

[0150] 여기에 제공된 방법, 시스템 및 장치는 시료 분석 결과를 신속하게 얻을 수 있도록 해줍니다. 여기에 제공된 방법들의 경우, 방법을 시작한 이후, 예를 들어, 약 6 시간, 4 시간, 3 시간, 2 시간, 1 시간, 45 분, 30 분, 15 분, 10 분, 또는 5 분 이내에 분석 결과를 얻을 수 있습니다.

[0151] 신속하게 얻은 분석 결과는 환자를 치료, 진단 또는 감시하는 데 필요한 실시간 정보를 제공하는 데 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 신속한 분석 결과는 환자를 수술하는 의사의 치료 결정을 안내하는 데 사용될 수 있습

니다. 수술하는 동안, 의사는 분석하기 위해 환자의 생체시료를 얻을 수 있습니다. 여기에 제공된 방법으로 시료를 신속하게 분석하여, 의사는 수술을 진행하는 동안 치료 결정을 할 수 있습니다.

[0152] 다른 한 예에서, 여기에 제공된 방법, 시스템 및 장치로 제공된 신속한 분석 결과는, 환자가 생체시료를 제공한 서비스 지점을 방문한 동안, 환자가 제공한 생체시료에 대한 정보를 얻어, 서비스 제공 현장에서 환자를 지원할 수 있습니다.

[0153] 예를 들어, 신청자들은 여기에서 신속 분석 검사(assay)를 설명합니다. 신속 분석 검사는, 다수 표지자의 존재와 세포 종류에 대해 백혈구를 분석하기 위해, 전혈의 시료를 준비하는 데 사용할 수 있습니다. 이런 분석 검사는 이미지 분석을 위해 전혈의 시료를 준비하는 데 유용합니다. 시료는 약 15분 또는 20분 내에 이미지 확보를 위해 준비할 수 있습니다.

[0154] 전혈에서 신속하게 백혈구 분석 검사

[0155] 이 분석 검사는 백혈구 계산 분석을 위해 전혈 시료를 약 15분 또는 20분 내에 준비합니다. 이렇게 준비한 세포의 자동 혈구 계산 분석은 신속하게 수행할 수 있으므로, 백혈구 계산 분석은 전혈을 사용하여 약 30분 내에 수행할 수 있습니다. 또한, 이 분석 검사는 소량의 혈액만 사용하므로, 많은 양의 혈액을 사용하는 분석 검사보다 자원을 절약할 수 있고 피험자에 대한 불편을 줄일 수 있습니다.

[0156] 이 분석 검사에 사용되는 시약에는 다음이 포함됩니다: 인산염완충식염수, 용해고정완충제(Lyse Fix buffer), 비드, 재현탁완충제(resuspension buffer) 및 염료와 염료 결합 항체가 들어 있는 시약 칵테일. 항체는 특정 백혈구 표지자에 적용됩니다.

[0157] 인산염완충식염수(PBS): 137 mM NaCl, 3 mM KC1, 8 mM, Na₂HPO₄, 1.5 mM KH₂PO₄, pH 7.2 ~ pH 7.4(HCl 사용)로 조정된 pH.

[0158] 재현탁완충제(RSB): PBS에 5% 소혈청알부민(bovine serum albumin).

[0159] 용해고정완충제: PBS에 0.0266% 사포닌, 10% 파라포름알데히드(PFA), 여기에 "%"는 grams/100 mL (최종 비율은 약 13:1 사포닌 PBS:PFA)을 타나냅니다.

[0160] 시약 칵테일 1: DRAQ5®, Pacific Blue 염료와 결합된 anti-CD14 항체, Fc 블록 (예, 쥐 IgG 같은 면역글로불린), PBS에 0.2% BSA.

[0161] 시약 칵테일 2: 피코에리트린(PE) 염료에 결합된 anti-CD16 항체, Alexa Fluor® 647 염료에 결합된 anti-CD45 항체, PECy5 염료에 결합된 anti-CD123 항체, Fc 블록 (예, 면역글로불린), PBS에 15% BSA.

[0162] 분석 검사 단계는 다음과 같습니다:

[0163] 피험자로부터 전혈을 얻습니다.

[0164] 전혈 50 μL를 투브에 넣습니다. 원할 경우, 투브에서 직접 혈액 시료를 얻을 수 있습니다. 여기에서 50 μL는 피험자에게 얻은 혈액 전체 양이고, 전체 시료를 투브에 넣습니다. 여기에서 피험자로부터 50 μL 이상을 얻고, 50 μL는 시료의 표본입니다.

[0165] 시료를 3분동안 1200xg로 원심 분리합니다.

[0166] 투브에서 혈장 20 μL를 제거합니다.

[0167] 투브를 열 블록(온도를 37°C로 상승)에 넣고, RSB 20 μL를 추가하고 완전히 혼합합니다.

[0168] 칵테일 1(약 5 μL)를 추가합니다. (구현에서, 칵테일 1을 전혈에 직접 추가할 수 있고, 원심 분리 이전 단계에서 혈장 일정부분의 제거와 RSB로 교체하는 것을 생략할 수 있습니다.)

[0169] 시료를 37°C에서 2 분 동안 배양합니다.

[0170] 용해고정완충제를 추가합니다([염색된 혈액]에 대한 [용해고정완충제] 비율 6:1, 약 300–350 μL). 초점을 맞추기 위해 표적(기준 입자)을 제공하고, 시료 농도에 대한 교정(calibration)을 제공하기 위해, 용해고정완충제에 알고 있는 농도의 비드를 포함시킬 수 있습니다(예, 상기 "상황 기반 자동 초점 맞추기" 단원에서 서명된 것처럼). 지름이 약 1 ~ 30 microns인 폴리스티렌 또는 기타 비드를 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 10 micron 폴리스티렌 비드를 1 μL 당 약 100 ~ 2000 개 사용할 수 있습니다.

- [0171] 용해고정완정체를 37°C에서 총 3 분간 배양합니다. 완충제를 넣고 약 1.5 분이 되면 용액을 피펫으로 아래 위로 5회 흔들어 혼합합니다.
- [0172] 시료 혼합물을 1200xg에서 3 분 동안 원심 분리합니다.
- [0173] 상청액을 제거합니다(약 350 μL). 나중 단계에서 필요할 경우, 부피(양)를 조정하기 위해 상청액을 저장해 둡니다.
- [0174] 최종 혼합물을 재공하기 위해 칵테일 2(약 15 μL)를 추가합니다.
- [0175] 최종 혼합물을 미리 테워 놓은 이미징 큐벳(37°C)에 넣습니다.
- [0176] 이미지를 확보하기 전에 큐벳을 37°C에서 5 분 동안 배양합니다.
- [0177] 시료의 이미지를 얻습니다.
- [0178] 시료는 15 분 내에 이미지를 확보할 준비가 됩니다. 구현에서, 몇몇 단계는 단축할 수 있습니다(예, 대체 구현에서, 원심 분리 단계 또는 배양 단계를 단축할 수 있습니다). 위에서 공개한 방법은 다수의 염료가 포함된 칵테일을 사용하여 시료를 준비하기 때문에, 여러 세포 종류의 표지자가 있는 시료 분석은 단일 시야 내에서 수행할 수 있습니다. 이렇게 하면, 수고를 최소한으로 줄이면서 시료를 효과적으로 이미지를 확보할 수 있습니다. 이런 동일한 시야의 광 분산 이미지들은 분석의 다른 면을 제공합니다. 시료 이미지 분석의 다양한 양상(mode)에 대해, 별도의 시료 또는 시야 없이 효과적으로 적용할 수 있습니다. 크기를 알고 있는 기준 입자를 포함시키면 자동 초점 맞추기를 사용할 수 있어 이미지를 확보하는 데 추가로 도움됩니다. 기준 입자의 농도를 알기 때문에, 각 이미지에서 시료 회석과 세포 농도를 독립적으로 측정할 수 있습니다.
- [0179] 준비된 시료도 신속하게 이미지 확보할 수 있습니다. 예를 들어, 이런 이미지 확보 작업은, 본 문서에 설명된 기능이 있는 자동 장치(예를 들어, 미국 특허 신청 13/244,947, 미국 특허 신청 13/769,779, 및 관련 신청서)를 사용하여 약 10분 내에 수행할 수 있습니다. 그러므로 구현에서, 혈액 시료의 준비 및 준비된 시료의 이미지 확보를 포함하여, 전체를 약 30 분 내에 분석할 수 있습니다.
- [0180] 위에서 설명한 방법(및 아래에 설명한 방법과 유사한 방법)에 따라 준비된 시료에서 얻은 이미지와 이미지 분석은 전혈에서 백혈구의 서로 다른 집단을 식별하는 데 알맞습니다. 이런 식별과 정량화는, 서로 다른 파장의 빛으로 시료를 조명하고 기록하고, 결과 이미지와 광도를 분석하여, 동일한 시료에 대해 신속하게 수행할 수 있습니다. 이런 방법은, 예를 들어, 그림 9, 10, 및 11에서 표시된 것과 같이, 이미지와 도표를 제공하는 데 알맞습니다. 이런 그림은 본 문서에서 공개된 방법(예, supra 및 infra 모두에서 설명된 방법)을 사용하여 작성되었습니다. 그림 12에 표시된 비교는 이런 방법들이 정확하고 신뢰할 수 있음을 예시하고 다른 방법과 잘 연관됩니다(예를 들어, Abbott CELL-DYN Ruby System을 사용한 분석(Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA)). 비교에 사용된 기준 분석기(reference analyzer)는 그림 12에 나타나 있습니다.
- [0181] 병리 시료 분석**
- [0182] 여기에 제공된 모든 방법은 세포가 들어 있는 병리 시료를 분석하는 데 사용할 수 있습니다. 병리 시료가 조직 시료일 경우, 여기에 제공된 방법으로 분석하기 위해 시료를 처리하여 조직의 세포를 개별 세포로 분리할 수 있습니다.
- [0183] 여기에 제공된 임의의 방법으로 병리 시료를 분석하면 신속하게 병리 분석을 수행할 수 있으며, 병리 분석 결과를 환자의 치료 결정에 신속하게 적용할 수 있습니다.
- [0184] 분석 결과에 따른 추가 절차**
- [0185] 일부 구현에서, 여기에 제공된 장치 및 시스템은 여기에 제공된 방법으로 얻은 결과에 따라 추가 절차를 수행하도록 구성할 수도 있습니다.
- [0186] 한 예에서, 결과가 예상 범위 밖으로 벗어날 때 사용자에게 경고하도록 장치나 시스템을 프로그램할 수 있습니다. 경고는 사용자 또는 의료인이, 예를 들어, 수동으로 시료를 분석하고, 올바른 작동 등을 위해 장치나 시스템을 점검하도록 알려줍니다.
- [0187] 다른 한 예에서, 장치 또는 시스템을 프로그램하여, 결과가 특정 범위 내에 있거나 밖에 있을 경우에, 시료에 대해 하나 이상의 추가 검사를 자동으로 실행하도록 할 수 있습니다. 일부 예에서, 여기에 제공된 장치와 시스템은 다수의 서로 다른 분석 검사를 수행할 수 있고, 장치 또는 시스템은 여기에 제공된 방법으로 생성된 결과

를 확인하거나 추가 조사하기 위해, 추가적인 분석 검사를 실행할 수도 있습니다.

[0188] 비특정 염료로 분석

[0189] 이미지 확보를 가속화하기 위한 한 비제한적인 예에서, "하이라이트(high light)" 상황을 이용합니다. 여기에서 세포는 매우 높은 농도의 염료로 표식(labeled)됩니다. 현재 구현에서, 세포의 DNA, 막(membranes), 또는 세포의 기타 부분을 표식하는 데 비특정 염료를 사용합니다. 이 예에서, 특정 희귀 단백질 또는 기타 표지자를 표적으로 하는 항체 염료를 사용하지 않습니다.

[0190] 비특정 염료를 사용하여, 분리 단계(예를 들어, 원심 분리를 이용한 분리나 물리적으로 분리하는 것) 없이 세포 정보를 얻을 수 있습니다. 이 분리 단계가 없으면, 시료의 이미지 확보 단계로 직접 신속하게 진행할 수 있습니다. 적혈구 같은 a)비표적 세포와 백혈구 같은 b) 표적 세포 또는 관심 대상물 모두가 포함된, 세포의 큰 영역을 이미지 확보하는 단계가 포함되나 그러나 이것들에만 국한되는 않습니다. 그러므로, 혈액 시료의 이미지를 확보하는 비제한적인 한 예에서, 적혈구 5백만 개와 백혈구 5000 개 또는 기타 개수를 이미지 확보할 수 있습니다. 표적 세포는 세포의 핵 모양(이것에만 국한되지 않음) 같이, 세포 내에 들어 있는 내용물을 기반으로 구별될 수 있습니다. 한 구현에서, 시료의 세포 핵을 염색하기 위해 핵 염료가 사용되고, 특정 세포가 갖고 있는 염료의 종류와 양을 기반으로(예, 핵 염색의 존재 또는 염색된 핵의 모양, 또는 기타 특성), 염료가 비특정적일지라도 염료를 기반으로 세포의 종류를 결정할 수 있습니다. 다른 예에서, 세포의 기타 내부 모양(예를 들어, 세포질에 알갱이나 기타 대상물이 있는지의 여부)은 내용을 표시하거나 특성을 보여주며 시료에 들어 있는 세포를 식별하거나 정량화하는 데 사용할 수 있습니다.뇨 시료(urine sample)의 경우, 시료에 들어 있는 세포와 결정 모양은 시료를 식별하고 비정상적인 것의 발견 여부를 결정하는 데 사용할 수 있습니다. 이런 방식으로, 비특정적인 염료는 세포의 이미지를 신속하게 얻어 필요에 따라 세포를 결정하는 데 사용할 수 있습니다.

[0191] 다수의 여기(Excitation) 및/또는 탐지 채널을 사용하여 분석

[0192] 혈구 계산을 위해 훨씬 더 적은 양의 시료를 사용할 때, 고급 혈구 계산 분석 검사의 구현에서, 추가적인 여기(excitation) 및/또는 과장을 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 림프구 부분 분석 검사에서 백혈구를 분류하기 위해, T 세포, B 세포, K 세포 및 기타 세포 같은 다양한 세포를 계산해야 합니다. 이런 경우, 표지자 두 개만 사용하여 세포가 림프구인지 식별합니다. 혈액 시료에서 세포를 추가 분류하기 위해, 예를 들어, 표지자 두 개를 다시 사용할 수 있습니다. 한꺼번에 색 두 개만을 탐지할 수 있는 시스템이 있을 경우, 해당 분석을 위해 과장의 개수가 충분하지 않습니다.

[0193] 한 구현에서, 시료를 나눠 두 개의 시료 표본으로 나눈 후에, 시료의 서로 다른 부분을 사용하여, 시스템의 한 부분에서 한 조합의 이미지를 얻고 다른 부분에서 다른 조합의 이미지를 얻을 수 있습니다. 안타깝게도, 이렇게 하면 부피와 시간이 두 배가 됩니다. 시스템에 장착된 독립 채널이 많을 수록, 사용된 시료의 부분 개수와 부피가 적어집니다.

[0194] 예

[0195] 세포 처리

[0196] 구현에서, 이미지 확보, 검사 및 분석을 위해 생체시료를 처리하면 편리합니다. 예를 들어, 이미지 확보, 검사 및 분석을 위해 세포가 들어 있는 생체시료를 처리하면 편리합니다.

[0197] 생체시료 처리에는 선처리(예, 이후 처리 및 측정을 위한 시료 준비), 처리(예, 시료를 변경하여 원본과 또는 이전 상태와 다르게 만듦), 그리고 후처리(예, 측정 또는 사용한 후에 시료 전체 또는 일부를 폐기)가 있습니다. 생체시료는 혈액 부분표본 또는 뇨 시료 같은 부분으로, 얇게 자르거나 조직 시료를 두 개 이상의 부분으로 나누거나 등등으로 나눌 수 있습니다. 혈액 시료 같은 생체시료를 처리하는 방법에는 혼합, 젓기, 초음파 처리, 균질화, 시료 또는 시료의 부분을 기타 처리하는 방법이 있습니다. 혈액 시료 같은 생체시료의 처리에는 시료의 성분들이 분리되거나 가라앉도록 시간을 제공하는 것이 포함되며, 여과(예, 시료나 시료의 일부를 여과기(필터)로 걸러내는 것)도 포함될 수 있습니다. 혈액 시료 같은 생체시료의 처리에는 혈액 시료가 응고되도록 두거나 응고시키는 것이 포함됩니다. 혈액 시료 같은 생체시료의 처리에는 알갱이 또는 상청액을 얻기 위해 시료 또는 시료 부분의 농축(예, 혈액 시료 또는 조직 시료에서 얻은 조직 균질액(homogenate)이 들어 있는 용액의 침전 또는 원심 분리)이 포함됩니다. 혈액 시료 같은 생체시료의 처리에는 시료 부분의 희석이 포함됩니다. 시료 또는 시료 부분의 희석에는 입자의 희석 또는 시료에서 얻은 상청액의 희석이 포함됩니다. 생체시료는 물로 희석하거나 식염수 또는 완충식염수 같은 것으로 희석할 수 있습니다. 생체시료는 고정제가 포함되었거나 포함되지 않은

용액으로 희석할 수 있습니다(예, 포름알데히드, 파라포름알데히드, 또는 단백질을 교차 결합하는 기타 작용제). 생체시료는 주위 용액과 내부 용액 사이에 삼투 기울기가 생성되거나, 주위 용액과 세포 벽의 내부 사이에 삼투 기울기가 생성되거나, 세포 부피를 변형하는 데 효과가 있는 용액으로 희석할 수 있습니다. 예를 들어, 희석 후의 용액 농도가 세포, 세포 벽 내부의 작용 농도 보다 낮을 경우, 이런 세포의 부피는 증가합니다(즉, 세포가 부풀어집니다). 생체시료는 삼투성 물질(예를 들어, 포도당, 자당, 기타 설탕, 나트륨 같은 소금, 칼륨, 암모니움, 또는 기타 소금, 삼투적으로 활성 화합물 또는 영양분)이 포함되었거나 포함되지 않은 용액으로 희석할 수 있습니다. 구현에서, 삼투성 물질은 시료에 들어 있는 세포의 무결성을 유지하는 데 효과적입니다. 예를 들어, 주위 용액과 세포막 내부 사이의 삼투 기울기를 안정화하거나 줄입니다. 구현에서, 삼투성 물질은 주위 용액과 세포막 내부 사이에 삼투 기울기를 증가하여 세포가 부분적으로 붕괴되거나(세포 내부 또는 막 내부의 농도가 주위 용액 농도 보다 낮음) 또는 세포가 부풀어 오를 수 있습니다(세포 내부 또는 막 내부가 주위 용액 보다 농도가 더 높음).

[0198]

생체시료는 계면활성제가 들어 있는 용액과 접촉될 수 있습니다. 계면활성제는 시료의 세포막을 파괴하거나 세포 모양에 다른 영향을 줄 수 있습니다. 예를 들어, 적혈구를 농도가 낮은 계면활성제와 접촉하면 적혈구가 원반 모양이 손상되고 더 구모양에 가까워집니다.

[0199]

생체시료를 염색하거나 시료에 표지자를 추가하거나, 시료의 일부, 시료의 특정 성분 부분 또는 세포의 일부분, 또는 시료 내의 구조물의 일부분 등을 탐지, 가시화, 또는 시료의 정량화를 위해 시료를 준비할 수 있습니다. 예를 들어, 생체시료를 염료가 들어 있는 용액과 접촉할 수 있습니다. 염료는 세포, 세포의 일부분, 시료 내의 세포와 관련된 물질 또는 분자를 염색하거나 보이게 하도록 만들 수 있습니다. 염료는 시료의 원소, 화합물, 또는 기타 성분과 결합하거나 이런 것들에 의해 변할 수 있습니다. 예를 들어, 염료가 들어 있는 용액의 pH 농도의 변화 또는 차이에 따라, 염료는 색이 변할 수 있으며, 염료의 광학적 특성을 포함하여, 하나 이상의 특성이 변할 수 있습니다. 염료가 들어 있는 용액의 원소 또는 화합물(예, 나트륨, 칼슘, CO₂, 포도당, 또는 기타 철, 원소, 또는 화합물)의 농도의 변화에 따라, 염료의 색이 변하거나, 광학적 특성을 포함하여, 염료의 하나 이상의 특성이 변할 수 있습니다. 예를 들어, 생체시료는 항체 또는 항체 조각이 들어 있는 용액과 접촉할 수 있습니다. 예를 들어, 생체시료는 입자가 들어 있는 용액과 접촉할 수 있습니다. 생체시료에 첨가된 입자는 표준(예를 들어, 입자의 크기 또는 크기 분산을 알고 있을 때, 크기 표준 역할을 하거나, 입자의 개수, 양 또는 농도를 알고 있을 때, 농도 표준 역할을 할 수 있습니다) 역할을 하거나 표지자(예를 들어, 입자가 특정 세포 또는 특정 종류의 세포와 결합하거나, 특정 세포 표지자 또는 세포 구획(cellular compartment)에 결합하거나 또는 입자가 시료의 모든 세포와 결합합니다).

[0200]

세포계산법(Cytometry)에는, 세포 개수, 세포 종류, 세포 표면 표지자, 세포 내부 표지자, 및 관심 세포의 기타 특성에 대한 정성적 및 정량적 관찰과 측정을 포함하여, 적혈구, 혈소판, 백혈구 같은, 세포의 관찰과 측정이 포함됩니다. 생체시료에 혈액 시료가 포함되거나 혈액 시료일 경우, 시료는 부분으로 나눌 수 있으며 희석할 수 있습니다(예를 들어, 취급하기 쉽도록 큰 양으로 제공하거나, 원하는 희석 밀도, 농도 또는 세포 개수 또는 세포 개수 범위 등을 제공하도록, 시료의 세포 성분의 밀도 또는 농도를 변경합니다). 시료는 응고에 영향을 주는 작용제로 처리하거나, 시료 성분을 농축시키거나 침전시키도록 처리할 수 있습니다(예를 들어, 시료에 에틸렌디아민사초산(EDTA) 또는 혜파린을 첨가하거나 시료를 원심 분리하거나 침전되도록 할 수 있습니다). 시료나 시료의 일부에 특정 세포 또는 특정 세포 성분과 반응하거나 표시(mark)하는 염료나 기타 시약을 첨가하여 처리할 수 있습니다. 예를 들어, 세포 핵을 표시하는 염료(예, 혜마톡실린 염료, 시아닌 염료, Draq5® 같은 염료, 및 기타 염료), 세포질을 표시하는 염료(예, 플루오레세인 염료를 포함하여 에오신 염료 및 기타 염료)는 세포를 시각적으로 보이도록 만들고, 식별하고, 정량화하는 데 도움이 되도록, 별도로 또는 함께 사용할 수 있습니다. 세포 표면 단백질, 세포내 단백질 또는 세포내 구역 같은 세포 표적물에 대한 항체 및 항체 조각을 포함하여, 가장 특정적인 표지자도 세포계산학(cytometry)에 유용합니다.

[0201]

생체시료는, 예를 들어, 포토다이오드 탐지기, 광전자 증폭관(photomultipliers), 전하 결합 소자, 레이저 다이오드, 분광 광도계(spectrophotometers), 카메라, 현미경 또는 빛 강도(빛의 단일 파장, 다수 파장, 파장 범위)를 측정하거나, 이미지를 형성하거나 또는 두 기능 모두를 갖춘 기타 장치 등을 포함하여, 광학 장치를 사용하여 세포계산학(cytometry)으로 측정 및 분석할 수 있습니다. 시료 또는 시료의 부분이 들어 있는 시야는 이런 탐지기를 사용하여 이미지를 확보하거나 스캔하거나 또는 둘 모두를 할 수 있습니다. 생체시료는 처리, 희석, 분리, 원심 분리, 응고, 또는 기타 변형을 하기 전에 세포계산학(cytometry)으로 측정하거나 분석할 수 있습니다. 생체시료는 처리, 희석, 분리, 원심 분리, 응고, 또는 기타 변형을 하는 동안 또는 후에 세포계산학으로 측정하거나 분석할 수 있습니다. 예를 들어, 생체시료는 시료를 받은 직후에 세포계산학으로 측정하거나 분석할

수 있습니다. 다른 예에서, 생체시료는 처리, 희석, 분리, 원심 분리, 응고, 또는 기타 변형을 하는 동안 또는 후에 세포계산학으로 측정하거나 분석할 수 있습니다.

[0202] 예를 들어, 혈액 시료 또는 혈액 시료의 부분을 침전 또는 원심 분리를 사용하여 세포계산을 위해 준비할 수 있습니다. 이런 시료의 침전된 부분이나 입자 부분은 세포계산 분석하기 전에 원하는 완충제에서 재현탁할 수 있습니다(예, 흡인(aspiration), 짓기, 초음파 처리(sonication), 또는 기타 처리). 생체시료는 세포계산 분석하기 전에 물, 식염수, 완충식염수로 희석하거나 재현탁할 수 있습니다. 이런 희석 또는 재현탁에 사용된 용액에는 고정제(예, 포름알데히드, 파라포름알데히드, 또는 단백질을 교차 결합하는 기타 작용제)를 포함하지 않을 수 있습니다. 이런 희석 또는 재현탁에 사용되는 용액은 주위 용액과 시료에 들어 있는 세포의 내부 또는 내부 구역 사이에 삼투 기울기를 제공할 수 있으며, 시료에 들어 있는 일부 또는 모든 세포의 부피를 변경할 수 있습니다. 예를 들어, 희석 후의 용액 농도가 세포, 세포 내부 구역 내부의 작용 농도 보다 적을 경우, 이런 세포의 부피는 증가합니다(즉, 세포가 부풀니다). 생체시료는 삼투성 물질(예를 들어, 포도당, 자당, 기타 설탕, 나트륨 같은 소금, 칼륨, 암모니움, 또는 기타 소금, 삼투적으로 활성 화합물 또는 영양분)이 포함되었거나 포함되지 않은 용액으로 희석할 수 있습니다. 구현에서, 삼투성 물질은 시료에 들어 있는 세포의 무결성을 유지하는데 효과적입니다. 예를 들어, 주위 용액과 세포막 내부 사이의 삼투 기울기를 안정화하거나 줄입니다. 구현에서, 삼투성 물질은 주위 용액과 세포막 내부 사이에 삼투 기울기를 증가하여 세포가 부분적으로 붕괴되거나(세포 내부 또는 막 내부의 농도가 주위 용액 농도 보다 낮음) 또는 세포가 부풀어 오를 수 있습니다(세포 내부 또는 막 내부가 주위 용액 보다 농도가 더 높음).

[0203] 예를 들어, 생체시료는 염료가 들어 있는 용액으로 시료의 일부를 희석한 후에 측정 또는 분석할 수 있습니다. 예를 들어, 생체시료는 항체 또는 항체 조각이 들어 있는 용액으로 시료의 일부를 희석한 후에 측정 또는 분석할 수 있습니다. 예를 들어, 생체시료는 입자가 들어 있는 용액으로 시료의 일부를 희석한 후에 측정 또는 분석할 수 있습니다. 생체시료에 첨가된 입자는 표준(예를 들어, 입자의 크기 또는 크기 분산을 알고 있을 때, 크기 표준 역할을 하거나, 입자의 개수, 양 또는 농도를 알고 있을 때, 농도 표준 역할을 할 수 있습니다) 역할을 하거나 표지자(예를 들어, 입자가 특정 세포 또는 특정 종류의 세포와 결합하거나, 특정 세포 표지자 또는 세포 구획에 결합하거나 또는 입자가 시료의 모든 세포와 결합합니다).

[0204] 예를 들어, 생체시료는 하나 이상의 종류의 세포를 다른 세포 종류 또는 종류들로부터 분리한 후에 측정하거나 분석할 수 있습니다. 이런 분리는 중력(예, 침전), 원심 분리, 여과, 기질(예, 다른 세포 종류보다 특정 한 세포 종류와 결합하거나 달라붙는 항체, 렉틴, 또는 기타 성분을 포함하고 있는 벽 또는 비드 같은 표면)과의 접촉, 또는 기타 수단으로 수행할 수 있습니다. 분리는 특정 세포 종류 또는 종류들을 변경하여 수행할 수도 있습니다. 예를 들어, 혈액 시료 같은 생체시료에, 시료 내의 일부 또는 모든 세포들이 부풀어 오르도록 하는 용액을 추가할 수도 있습니다. 여기에서, 한 종류의 세포가 다른 종류 또는 종류들의 세포보다 더 빨리 부풀어 오를 때, 용액을 추가한 후에 시료를 관찰 및 측정하여 세포 종류를 구별할 수 있습니다. 이런 관찰과 측정은 차이(예, 크기, 부피, 내부 농도, 또는 이런 부풀어 오름에 의해 영향 받는 기타 특성)를 강조하고 관찰과 측정의 감도와 정확도를 증가하기 위해 특정 시점에서 수행하거나 또는 다수의 시점에서 여러 번 수행할 수 있습니다. 일부 예에서, 특정 종류 또는 종류들의 세포는 이런 부풀어 오름에 의해 터질 수 있으며, 이로 인해 시료에 들어 있는 나머지 세포 종류 또는 종류들의 관찰과 측정이 향상될 수 있습니다.

[0205] 세포계산학에 의한 생체시료의 관찰, 측정 및 분석에는 포토다이오드, 광전자 증폭관(photomultiplier), 레이저 다이오드, 분광 광도계, 전하 결합 소자(ccd), 카메라, 현미경, 또는 기타 수단이나 장치 등과 같은 광도 측정법(measurements)이 포함될 수 있습니다. 세포계산학에는 생체시료에 들어 있는 세포의 이미지(예, 2차원 이미지)를 준비하고 분석하는 작업이 포함됩니다. 여기에서, 세포들에 표식(예, 형광 표식, 화학 발광 표식, 효소 표식, 또는 기타 표식)을 붙이고 평판 배양하고(예, 기질에 정착하도록 둠) 카메라로 이미지를 얻습니다. 카메라에는 렌즈가 들어 있을 수 있으며, 현미경과 함께 사용하거나 현미경에 부착할 수 있습니다. 세포는 부착된 표식을 사용하여 2차원 이미지에서 (예, 표식에서 방출되는 빛으로) 식별될 수 있습니다.

[0206] 본 문서에서 공개된 세포계산기(cytometer)를 사용하여 세포의 이미지를 준비하고 분석하기 위한, 세포의 이미지에는 세포가 들어 있지 않을 수 있으며, 한 개의 세포가 들어 있을 수도 있고 다수의 세포가 들어 있을 수도 있습니다. 세포 또는 본 문서에 공개된 세포계산기의 이미지에 들어 있는 세포는 위에서 공개된 것처럼 표식이 붙을 수 있습니다. 세포 또는 본 문서에 공개된 세포계산기의 이미지에 들어 있는 세포는 위에서 공개된 것처럼 표식이 붙을 수 있습니다. 여기에서, 표식은 이미지를 식별하는 데 효과적이고 시료의 피험자를 식별하는 데 효과적입니다.

- [0207] 일부 구현에서, 분석 검사(assay) 시스템은 세포계산 분석 검사를 수행하도록 구성됩니다. 세포계산 분석 검사(cytometry assay)는 일반적으로 광학적으로, 전기적으로, 또는 음향학적으로 개별 세포의 특성을 측정하는 데 사용됩니다. 본 문서의 공개 목적으로, "세포"에는 개별 세포와 일반적으로 크기가 비슷한 비세포형(non-cellular) 시료가 포함될 수 있으며, (리포솜 같은) 수포, 세포들의 소규모 집단, 비리온(virion), 박테리아, 원생동물(protozoa), 결정(crystals), 지질 및/또는 단백질의 응집으로 형성된 생체(bodies), 비드 또는 마이크로스피어 같은 소입자에 결합된 물질 등이 포함되나 이것들에만 국한되지는 않습니다. 이런 특성에는 다음을 포함하나 이것들에만 국한되지는 않습니다: 크기; 모양; 입자성; 빛 분산 패턴(또는 법선 타원체(optical indicatrix)); 세포막의 온전성(intact); 농도, 세포 내부 내용물의 형태와 시공간적인 분포, 단백질 내용물, 단백질 변형물, 핵산 내용물, 핵산 변형물, 소기관 내용물, 핵 구조, 핵 내용물, 세포 내부 구조, 내부 수포의 내용물(pH 포함), 이온 농도, 스테이로드 또는 약물 같은 기타 소분자(small molecule)의 존재(등을 포함하나 이것들에만 국한되지는 않음); 단백질, 지질, 당질, 이런 것들의 변형물 등을 포함하여 세포 표면(세포막과 세포벽 모두) 표지자. 순수한 형태로 또는 다른 문자와 결합하거나 나노 또는 마이크로 입자에 고정시키거나 결합시켜, 적절한 염료나 착색제를 사용하여, 세포계산(cytometry)을 사용하여 특정 단백질, 핵산, 지질, 당질(탄수화물), 또는 기타 문자의 존재, 양, 및/또는 변형을 결정할 수 있습니다. 세포계산(cytometry)으로 측정할 수 있는 특성에는 세포 기능 또는 활동의 측정, 식균 작용(phagocytosis), 항원 제시, 시토카인 분비, 내부 및 표면 문자의 발현 변경, 기타 문자 또는 세포 또는 기질과의 결합, 소분자의 활성적인 이송, 유사 분열 또는 감수 분열; 단백질 번역, 유전자 전사, DNA 복제, DNA 수정, 단백질 분비, 세포 자멸(apoptosis), 주화성, 이동성, 유착성(adhesion), 항산화 작용, RNAi, 단백질 또는 핵산 저하, 약물 응답, 감염성, 및 특정 경로 또는 효소의 작용 등을 포함하나 이것들에만 국한되지는 않습니다. 세포계산(Cytometry)은 또한 세포 집단에 대한 정보를 결정하는 데에도 사용됩니다: 세포 개수, 전체 집단의 백분율, 상기한 특성에 대해 시료 집단의 변화량(변화 정도) 등을 포함하나 이것들에만 국한되지 않습니다. 여기에 설명된 분석 검사는 각 세포에 대해, 하나 이상의 상기한 특성을 측정하는 데 사용할 수 있습니다. 이 분석 검사는 서로 다른 특성들 간에 상관 관계나 기타 관계를 결정하는 데 유리합니다. 또한, 여기에 설명된 분석 검사는 세포의 다수 집단을 독립적으로 측정하는 데 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 서로 다른 세포 종류에 대해 특정적인 항체로, 혼합된 세포 집단에 표식을 붙입니다. 현미경 모듈을 사용하여 이력, 병리, 및/또는 형태적 분석을 수행할 수 있고, 물리적 및 화학적 특성 모두를 기반으로 대상물에 대한 평가를 용이하게 합니다. 조직은 균질화하거나 세척하거나 큐벳 또는 슬라이드에 보관 또는 침전시킬 수 있으며, 건조하거나(항체로) 염색하거나 배양한 후에 이미지를 얻을 수 있습니다. 본 문서의 다른 어느 곳에서 설명된, 데이터 전송 기술과 결합할 때, 유면허(licensed) 병리학자가 검토할 수 있도록 CMOS/CDD 또는 유사 탐지기에서 이미지를 전송할 수 있습니다. 이것은 유동 세포계산법(flow cytometry)만 허용하는 재래식 장치로는 불가능합니다. 세포계산기(cytometer)는 세포 형태(cell morphology) 뿐만 아니라 표면 항원을 측정할 수 있습니다. 표면 항원을 이용하면 재래식 혈액학 검사실 장치(hematology laboratory device)와 비교하여 보다 감도가 높고 구체적인 검사를 수행할 수 있습니다. 세포 분석 검사의 해석은 하나 이상의 측정을 게이팅(gating)하여 자동화할 수 있습니다. 게이팅 임계값(gating thresholds)은 전문가(전문의) 및/또는 학습 받은 자가 교육 자료에서 얻은 통계적 방법을 기반으로 설정할 수 있습니다. 게이팅 규칙(gating rules)은 개별 피험자 및/또는 피험자 집단에 대해 특정적일 수 있습니다.
- [0208] 일부 구현에서, 세포계산기 모듈(cytometer module)을 서비스 제공 현장의 장치에 통합하면, 고전적인 방식으로 교육받은 의료인이 해석 및 검토하기 위해, 일반적인 검사실 장치로 검사실에서 일반적으로 측정한 세포 특성(값)을 제공하기 때문에, 임상적 결정을 내리는 데 속도와 품질을 향상시킬 수 있습니다. 그러므로 서비스 제공 현장의 장치는 세포계산 분석을 위해 구성될 수 있습니다.
- [0209] 예 1
- [0210] 자연살생세포 및 호중구를 포함하여 혈액 백혈구가 들어 있는 세포 시료를 얻었습니다. 시료는 형광 식별 결합체(anti-CD16 결합체)로 처리되었습니다. 이 결합체는 자연살생세포와 호중구 모두와 결합합니다. 시료는 또한 핵염료(DRAQ5)로 처리되었습니다. 시료에 대해 형광 현미경법과 암시야 현미경법으로 이미지를 얻었습니다. 형광 발광의 수준과 시료 내의 서로 다른 세포들의 빛 측면 분산을 기록하고 분석했습니다. anti-CD16 결합체 신호가 들어 있는, 구역화된 이미지가 각 세포(CD16 발현 수준에 해당)의 형광 강도 및 각 세포의 크기에 대한 정량적 정보를 제공했습니다. 암시야 이미지는 각 세포의 분산 특성에 대해 정량적 정보를 제공했습니다. DNA 염료 신호가 들어 있는 이미지는 구획으로 나눠졌고, 핵의 형광 강도, 크기 및 모양을 결정하는 데 사용되었습니다.
- [0211] 그림 1A에 표시된 것처럼, 두 주요 집단의 세포는 서로 다른 세포들의 CD16 형광 정도와 빛 분산을 측정한 값을

기반으로 식별되었습니다. 밝고 높은 CD16 형광 신호와 분산이 높은 (그림 1A, 오른쪽 원) 세포 집단은 호중구(neutrophils)입니다. 중간 정도 CD16 형광 신호와 분산이 낮은 (그림 1A, 왼쪽 원) 세포 집단은 자연살생세포(natural killer cells)입니다. 서로 다른 세포의 형광 정도와 빛 분산 측정은 시료에 들어 있는 대부분의 세포들을 자연살생세포 또는 호중구로 분류하는 데 필요한 충분한 정보를 제공하지만, 일부 세포들의 경우, 이런 특성의 측정은 고정밀도로 세포를 분류하는 데 필요한 정보를 충분히 제공하지 못합니다. 예를 들어, 세포의 형광 정도와 빛 분산의 측정은 그림 1A(즉, 가운데 원)에서 가장 작은 원 속에 들어 있는 세포들의 소규모 집단을 정확하게 분류하는 데 필요한 정보를 충분히 제공하지 못합니다. 가장 작은 원 속에 들어 있는 세포들이 자연살생세포인지 호중구인지 식별하기 위해, 세포들의 핵 염색(DRAQ5)과 전체 세포(total cell) 염색(anti-CD16)를 검사했습니다. 핵 부분 영역과 세포들의 전체 세포 부피를 정량적으로 측정했으며, 전체 세포 영역에 대한 핵 영역의 비율이 결정되었습니다. 그림 1B에 표시된 것처럼, 자연살생세포("NK")와 호중구("Neu") 사이에, 전체 세포 영역에 대한 핵 영역의 비율에는 뚜렷한 차이가 있습니다. 그러므로, 세포들을 분명하게 분류하기 위해 시료에 들어 있는 세포에 대해 현미경을 사용하여 여러 가지 특성을 정량적으로 조사했습니다. 그림 1C에는 그림 1A에 들어 있는 가장 작은 원 속의 자연살생세포에 대한 이미지가 나타나 있습니다. 모든 그림에서 길이 눈금은 동일합니다. 왼쪽 그림들은 전체 세포 영역에 대해 염색된 세포들(anti-CD16)이고, 오른쪽 그림은 동일한 세포들에 대해 핵만 염색한 것입니다(DRAQ5). 위와 아래 줄에 있는 이미지들은 자연살생세포의 서로 다른 예들입니다. 그림 1D에는 그림 1A에 들어 있는 가장 작은 원 속의 호중구에 대한 이미지가 나타나 있습니다. 모든 그림에서 길이 눈금은 동일합니다. 왼쪽 그림들은 전체 세포 영역에 대해 염색된 세포들이고, 오른쪽 그림은 동일한 세포들에 대해 핵만 염색한 것입니다. 위와 아래 줄에 있는 이미지들은 자연살생세포의 서로 다른 예들입니다.

[0212]

계다가, 호중구의 핵은 뚜렷한 여러 갈래 일 모양(multi-lobed)이고 자연살생세포의 핵(다른 텁프구)은 등글고, 편평하며 부드럽습니다. 핵 자체의 모양을 기반으로 세포를 식별하고 분류하기 위해 이미지 나누기 알고리즘을 사용할 수 있습니다.

[0213]

예 2

[0214]

혈소판이 들어 있는 시료를 확보했습니다. 혈소판은 형광 결합된 anti-CD41 및 anti-CD61 항체로 표식되었습니다(labeled). 지름이 3 μm 인 비드를 시료에 첨가했습니다. 시료는 10x 및 20x 배로 확대하여 이미지를 얻었습니다(그림 2A). 개별 혈소판에 대한 형광 강도 분포를 (두 항체 모두로 부터) 측정하여 결정했으며, 이 분포는 가우스(정규분포) 모양(그림 2B)으로 되어 있습니다. 개별 혈소판에 대한 형광 측정 값을 도표로 표시했으며, 강도 분포에 대해 맞춤(fit)을 결정했습니다(그림 2C). 그림 2C에서, 회색 선은 개별 혈소판에 대해 측정한 형광 강도이고, 검은 선은 맞춤(fit) 선입니다. 가우스 평균, 분산, 부피, 너비, 기준 면적 등과 같은, 맞춤 선의 매개 변수를 혈소판 부피의 예측 값(predictors)으로 계산할 수 있습니다. 가우스 부피와 맞춤 선의 너비는 혈소판 평균 부피와 정확하게 연관시키기 위해 결정되었습니다.

[0215]

상기 측정에 대해, 최상의 초점 면을 정확하게 결정하는 데 필요한 변차(또는 불일치 량, variance)를 조절하고, 부피 측정에 대한 이 변차의 영향을 조절하기 위해, 3 μm 비드를 기준으로 사용했습니다.

[0216]

또한, 2D 모델 맞춤 선을 기반으로 추정한 혈소판의 크기는 정상 범위에 있도록 교정할 수 있습니다(그림 3).

[0217]

예 3

[0218]

적혈구("RBC")가 들어 있는 시료를 확보했습니다. 적혈구를 낮은 농도의 계면활성제(DDAPS 또는 SDS)로 처리하여 적혈구가 구모양(sphere-like)을 갖도록 했습니다. 적혈구를 서로 다른 두 큐벳에 넣어 암시야 현미경으로 이미지를 확보했습니다: (A) 순수 에피조명만 허용하는 큐벳(그림 4A), (B) 에피조명과 트랜스조명 모두를 허용하는 큐벳(그림 4B). 적혈구는 순수 에피조명만 허용한 큐벳보다 에피조명과 트랜스조명 모두를 허용하는 큐벳에서 더 잘 보였습니다(그림 4).

[0219]

예 4

[0220]

호중구(neutrophil)가 들어 있는 시료를 확보했습니다. 호중구들 중에서, 핵의 모양과 염색질 모양(chromatin morphology)은 미숙한 "띠(band)" 모양 호중구인지 성장한 "분엽(segmented)" 호중구인지를 알려줄 수 있습니다. 띠호중구(Band neutrophil)는 골수에서 최근에 생성된 미성숙 호중구입니다. 띠호중구의 비율이 커지면 감염이나 염증이 성장하고 있음을 나타낼 수 있습니다.

[0221]

시료는 형광 표식 anti-CD16 항체와 혼합되었습니다. 이것은 호중구의 세포 표면 수용체, CD16을 인식합니다. 시료는 또한 형광 핵 염료로 염색되었습니다. 세포에서 핵 염색과 CD16 염색 데이터 모두를 얻기 위해 형광 현

미경으로 시료의 이미지를 확보했습니다. 일반적으로 띠호중구는 성숙한 분엽호중구와 비슷한 CD16 발현 수준을 갖고 있기 때문에 CD16 염색으로 인한 형광 강도만으로 구별할 수 없습니다.

[0222] 이미지 분할을 포함하여, 이미지 분석은 띠호중구와 분엽호중구의 핵 염색과 모양을 인식하는 데 사용되어, 세포를 분류할 수 있도록 해줍니다. 세포 핵의 크기, 모양, 및 형광 강도를 조사했습니다. 또한, 핵을 분석하여 엽(lobe, 핵 영역 내에서 강도 최고)의 개수를 결정하고, 핵의 엽들(lobes) 사이 거리를 결정하고, 핵 윤곽의 곡률 변화량(2차 미분)을 결정했습니다. 그럼 5A에는 띠호중구의 대표 이미지들이 표시되어 있습니다. 이미지에서 핵은 밝은 회색이고 세포질은 짙은 회색입니다. 호중구는 골수 계통(myeloid lineage)을 통해 구별되므로, 완전히 성숙하기 전에 특징적인 "U" 모양 핵으로 발전됩니다. 그럼 5B에는 분엽호중구의 대표 이미지들이 표시되어 있습니다. 이미지에서 핵은 밝은 회색이고 세포질은 짙은 회색입니다. 분엽호중구의 핵에는 다수의 분엽(segments/lobes)을 갖고 있습니다. 그러므로, 본 분석은 혈액 속에 있는 호중구의 서로 다른 부분 집단의 식별 및 정량화를 지원합니다.

[0223] 예 5

[0224] 만성 램프성 백혈병(CLL)이 있는 피험자의 세포 시료를 획득했습니다. 목표는 피험자의 B세포에 대한 CD5 발현 정도를 정량화하는 것입니다. Anti-CD20 항체를 B세포에 대한 결합체로 선택했습니다. 첫번째 색 형광단으로 표시된 Anti-CD20 항체를 시료와 혼합했습니다. 적절한 배양 시간 후에, 시료를 세척하고 결합되지 않은 anti-CD20 항체를 제거했습니다. 첫번째 형광단을 여기(excite)시킬 수 있는 광원에 시료를 노출하고, 분광 광도계를 사용하여 형광 신호를 측정했습니다. 형광 신호를 기반으로 시료에 들어 있는 B 세포의 적절한 농도를 결정했습니다. B 세포의 결정 적절 농도는 시료에 들어 있는 B 세포의 진짜(true) 농도의 1.5 배 내에 있습니다.

[0225] 시료에 들어 있는 B 세포의 근사적인 농도를 기반으로 anti-CD5 결합체의 적절한 양을 시료에 추가하여, CD5 발현과 CD5 형광 사이에 비례 관계가 유지되도록 했습니다. anti-CD5 결합체는 두번째 형광단과 결합했습니다. 두번째 형광단은 첫번째 형광단(anti-CD20 결합체와 결합)과는 다른 최고 여기 파장(peak excitation wavelength)을 갖고 있습니다. anti-CD5 항체를 시료에 추가한 후에 시료의 개별 세포를 두번째 형광단을 여기 할 수 있는 광원에 노출하고, 개별 세포에서 나온 형광 신호를 측정했습니다. 세포에서 나온 형광 신호를 바탕으로 시료에 들어 있는 B 세포에서 CD5의 평균 양을 결정했습니다.

[0226] 이 예는 CD5 문맥으로 설명되었지만, 이후 단계에서 재료의 원하는 양을 추기하기 위해, 근사적인 개수를 파악하는 개념은 CD5에만 제한되지 않으며, 다른 종류의 세포, 분해물질 또는 대상물에 대해 이 개념의 사용은 제외되지 않습니다.

[0227] 예 6

[0228] 혈액 세포는 본 문서에서 공개된 방법에 따라 이미지를 얻고 식별되며 정량화할 수 있습니다. 예를 들어, 세포들에 표식(예, 형광 표식, 화학 발광 표식, 효소 표식, 또는 기타 표식)을 붙이고 평판 배양(예, 기질에 정착하도록 둠)하고 카메라로 이미지를 얻어, 현재 예에서 설명한 대로 생체시료에 들어 있는 세포들의 2차원 이미지를 준비하고 분석할 수 있습니다. 카메라에는 렌즈가 들어 있을 수 있으며, 현미경과 함께 사용하거나 현미경에 부착할 수 있습니다. 세포는 부착된 표식을 사용하여 2차원 이미지에서 (예, 표식에서 방출되는 빛으로) 식별할 수 있습니다.

[0229] 핑거스틱(fingerstick)으로 얻은 $80 \mu\text{L}$ 전혈을, 2 mg/ml EDTA를 미리 넣어 놓은, 뚜껑 있는 시료 용기에 올려 놓았습니다. 이 예에서, 밀폐형 시료 용기(제거 가능하거나 구멍을 뚫을 수 있는 뚜껑이 있음)가 사용되었습니다. 이런 작은 양의 시료를 담을 수 있는 알맞은 임의의 용기를 사용할 수 있으며, 뚜껑이 있는 용기나 뚜껑이 없는 용기를 포함하나 이것들에만 국한되지는 않습니다. 시료 용기는 $1200 \times \text{g}$ 로 5 분간 원심 분리하여 혈장에서 혈구를 분리했습니다. 시료 용기를 원심 분리하면 시료 용기에 들어 있는 혈액 시료가 두 가지 주요 성분으로 분리되었습니다(시료 용기의 상단에서 바닥으로): 1) 혈장과 2) 농축된 혈구. 이 처리 과정은 모든 혈액이 격리 상태로 남지 않도록 하고 액체 본체와 합쳐지도록 합니다. 또한, 이 처리 과정은 혈구를 혈장에서 분리하여 물질대사(metabolism)를 줄이고 시료를 장기간 보관할 수 있도록 해줍니다.

[0230] 원심 분리한 시료 용기는 다수의 액체 종류별로 격리된 시약, 팁(tip), 및 세포계산 큐벳이 들어 있는 카트리지에 넣었습니다. 카트리지에는 분석 검사에 필요한 모든 시약이 들어 있습니다. 카트리지는 원심 분리, 피펫 및 큐벳 적재용 플랫폼 등이 있는 장치에 올려 놓았습니다. 장치의 피펫에는 다수의 노즐이 있고, 일부 노즐은 다른 노즐과 크기가 다릅니다.

- [0231] 장치 내에, 피펫에 있는 노즐을 큐벳 운반 도구(carrier tool)로 내려 운반 도구에 있는 해당 구멍에 연결합니다. 이 도구는 카트리지로 상당히 이동되어 세포계산기 큐벳으로 내려집니다. 도구의 펀을 큐벳의 해당 구멍에 연결하여 도구를 고정시킵니다. 큐벳은 장치 내에 있는 적재 장소/loading station)로 이동됩니다.
- [0232] 그런 다음, 피펫의 큰 노즐을 카트리지로 내리고 카트리지에 보관된 피펫 팁에 연결합니다. 시료 용기에 들어 있는 시료 내에 피펫 팁을 위치시키고 반복적으로 물질을 팁으로 흡인하고 팁에서 물질을 배출하여 피펫과 팁을 함께 사용하여 시료 용기에서 세포(혈구)와 혈장을 혼합합니다. 세포들이 혈장 내에서 재현탁되고 전혈 시료가 철저하게 혼합되면, 혼합된 전혈 5 μL 를 흡인하여, 혈액 시료의 특성 측정을 위해 표본을 준비했습니다. 시료에 들어 있는 적혈구와 혈소판 측정을 위해 이 5 μL 표본을 사용했습니다. 위에서 설명했듯이, 5 μL 표본을 제거한 후에 남은 시료의 부분은 시료에 들어 있는 백혈구를 측정하는 데 사용되었습니다.
- [0233] 전혈을 20배 희석하기 위해, 인산완충식염수와 무게 2%의 소혈청알부민 혼합물이 들어 있는 용기에 5 μL 전혈을 분배해 넣었습니다(이 결과로 희석된 시료 100 μL 만듦). 활기차게 섞은 후, 표식 항체 시약 칵테일이 들어 있는 다른 용기에 이 시료 5 μL 를 넣었습니다. 시약 칵테일에는 anti-CD235a가 Alexa Fluor® 647 (AF647)에 결합된 것, anti-CD41과 anti-CD61이 피코에리트린(PE)에 결합된 것이 들어 있습니다. 이 혼합물을 5 분간 배양했습니다. 이 결과, 이 혼합물 10 μL 를 양성이온성 계면활성제(zwitterionic surfactant)가 중량으로 <0.1% 미만으로 들어 있는 완충제 90 μL 와 혼합했습니다. 계면활성제 분자는 적혈구 막의 결합 특성을 변경하여 모든 세포가 안정적인 구모양을 갖도록 합니다. 이 변형은 완충액이 세포막에 대해 등장성(isotonic)이므로 등용적(isovolumetric, 부피가 일정한) 변형이므로, 세포막에 대해 삼투적 액체 교환이 발생하지 않습니다. 이것을 다시 2분간 배양한 후에 이 용액 30 μL 를 글루타르알데히드, 고정제 및 지름 10 μm 비형광(non-fluorescent) 비드가 들어 있는 용액과 혼합했습니다. 혼합물은 최종적으로 글루타르알데히드 농도가 0.1%가 되었고 1 μL 당 1000개의 비드가 있게 되었습니다. 글루타르알데히드는 세포를 신속하게 고정하여 세포 용해 및 다른 활성 생물학적 반응을 방지합니다.
- [0234] 이 비제한적인 예에서, 피펫을 카트리지에 있는 팁에 고정하고 상기 혼합물 7 μL 를 흡인하고 운반 도구로 플랫폼에 보관된 큐벳 내의 채널에 7 μL 를 넣었습니다. 혼합물을 큐벳에 넣은 후, 페펫은 카트리지에 있는 용기에서 미네랄 오일 10 μL 를 흡인하고 미네랄 오일 방울을 큐벳의 적재된 채널의 양 끝 입구(open ends)에 넣었습니다. 개방 채널의 끝단에 헥사데칸(Hexadecane)을 추가하여 적재된 큐벳 채널에서 액체가 증발되는 것을 방지했습니다(미네랄 오일도 효과 있음). 그런 다음, [장치 수준 시료 취급 장치]를 [큐벳 운반기 / 큐벳 조합]과 결합하고, 카트리지가 들어 있는 모듈에서 장치의 세포계산 모듈로 [큐벳 운반기 / 큐벳 조합]을 이동시켰습니다. 세포계산 모듈에서, [장치 수준 시료 취급 장치]는 [큐벳 운반기 / 큐벳 조합]을 세포계산 모듈의 현미경 스테이지에 올려 놓았습니다. 이 작업을 수행하는 데 필요한 시간과 2 분 대기 시간을 더한 시간 동안, 이미지를 얻기 전에 부풀어 오른 세포가 큐벳의 바닥에 침전됩니다.
- [0235] 큐벳 운반기 또는 큐벳을 현미경 스테이지에 올려 놓은 후에, 스테이지를 미리 지정된 위치로 이동시켜, 세포계산기의 광학 시스템이 시료가 들어 있는 채널의 한 쪽 끝을 볼 수 있도록 합니다. 이 위치에서, 광학 시스템은 환형광(ringlight)으로부터의 암시야 조명으로 얻은 시료의 이미지를 전달합니다. 큐벳 면에 대한 수직 축에 있는 광학 시스템의 발동(actuation)과 결합된 이런 이미지들은 최상의 초점 면을 찾는 데 사용되었습니다. 일단 초점을 맞춘 후에, 광학 시스템은 서로 다른 파장에서, 사용 중인 형광단파 일치하는, 시료의 형광 이미지를 확보하는 데 사용되었습니다. 예를 들어, Alexa Fluor® 647과 결합한 anti-CD235로 표식된 적혈구를 시각화하기 위해, 시료를 여기(excite)시키기 위해 적색광(630 nm 파장)을 사용했고 650nm ~ 700nm 사이 파장을 사용하여 시료의 이미지를 확보했습니다. 다색 거울(pychromic mirror)과 밴드패스 방출 필터의 조합을 사용하여 광학 신호에서 원하지 않는 파장을 걸러냈습니다. 세포들이 큐벳 바닥에 정착되었기 때문에, 단일 초점 면의 이미지들은 해당 영역 내의 모든 세포를 시각화하는 데 충분했습니다.
- [0236] 이미지의 데이터는 시료 처리 장치에 연결된 컨트롤러를 사용하여 처리되었습니다. 여기에 도입된 이미지 처리 알고리즘은 적응형 임계값 설정 기법(adaptive thresholding)과 가장자리 탐지 기법의 조합을 이용하여 세포를 탐지하기 위해 세포의 형광 이미지를 이용했습니다. 국부 강도(local intensity)와 강도 기울기(intensity gradients)를 기반으로, 각 세포에 대해 관심 영역(RoI: regions of interest)을 만들었습니다. 암시야 이미지를 사용하여, 시료 내의 비드를 식별하고 비드 주위에 관심 영역을 만들었습니다. 각 시야에 들어 있는 모든 관심 영역(RoI)을 나열했으며 해당 시야의 각 이미지에서 관심 영역의 강도를 계산했습니다. 이미지 처리 알고리즘으로 얻은 출력 정보는 각 관심 영역에 대한 모양 또는 형태 계량학적(morphometric) 측정값, 형광도, 및 암시야 강도로 구성되어 있습니다. 이 정보는 각 대상물이 백혈구(CD235a에 대해 양성, CD41/CD61에 대해 음성)인지 혈소판(CD41/CD61에 대해 양성, CD235a에 대해 음성)인지 또는 비드(bead)인지를 분류하기 위해 통계적 방법

으로 분석되었습니다. 둘째 길이, 지름 및 원형성(circularity) 등과 같은 모양을 나타내는 값들(shape descriptors)을 사용하여 각 적혈구와 혈소판의 부피를 계산했습니다. 비드를 알고 있는 농도로 첨가했기 때문에, 전체 채널에 대해 세포 대 비드의 평균 비율을 사용하여 세포 농도(cells/ μ L)를 계산했습니다. 시료를 처리하기 위해 수행한 단계를 기반으로, 원본 전혈 시료의 세포 농도에 도달하기 위해, 이 농도를 회석하여 수정했습니다. 시료에서 다음과 같은 값을 계산했습니다: 1) 큐벳에 들어 있는 적혈구의 개수 2) 큐벳에 들어 있는 적혈구의 평균 부피 3) 큐벳에 들어 있는 적혈구 분포 너비(RDW) 4) 큐벳에 들어 있는 혈소판의 개수 5) 큐벳에 들어 있는 혈소판의 평균 부피. 이런 계산값들을 기반으로, 원본 혈액 시료에 대해 다음을 계산했습니다.

측정된 값	결과	범위 예
적혈구 농도(μ L 당 1 백만 세포)	4.8	4-6
적혈구 평균 부피, 펌토리터(femtoliter, 1/1,000 조 리터)	88	80-100
적혈구 분포 너비(RDW), (%)	12	11-14.6
혈소판 농도(μ L 당 1000 세포)	254	150-400
혈소판 평균 부피, 펌토리터	10.4	7.5-11.5

[0237]

[0238] 적혈구와 혈소판 정보 분석을 위해 사용한 5 μ L 부분표본을 제거한 후에, 남은 75 μ L 시료는 전혈 시료의 백혈구 집단을 분석하는 데 사용되었습니다. 전혈의 나머지 75 μ L는 피펫으로 동일 시료 용기 내에서 시료를 흡인 및 방출을 반복하여 혼합했습니다. 혼합한 전혈의 나머지 75 μ L 중 약 40 μ L는 피펫 팁으로 흡인하여 피펫으로 카트리지에 있는 원심 분리기로 이동합니다. 혈액 시료가 들어 있는 원심 분리기의 튜브는 피펫에 연결되어 있으며 모듈 내의 원심 분리기에 들어 있는 진통 통(swinging bucket)에 보관되었습니다. 원심 분리기를 1200 x g로 3 분간 회전시켜, 상층액과 농축된 세포가 펠릿(알갱이) 형태가 되도록, 혈액을 EDTA가 들어 있는 혈장으로 분리했습니다.

[0239]

원심 분리한 후에 원심 분리기의 튜브를 원심 분리기에서 제거하여 카트리지로 되돌려 놓았습니다. 혈장 상층액을 피펫으로 제거한 후에 카트리지에 들어 있는 별도의 반응 용기에 넣었습니다. 카트리지에 들어 있는 시약 용기에서 재현탁 완충제(resuspension buffer) 16 μ L를 피펫으로 흡인하여 원심 분리기 튜브에 있는 세포 펠릿에 첨가했습니다. 피펫으로 원심 분리기 튜브에 들어 있는 혼합물을 흡인 및 배출을 반복하여, 재현탁 완충제 속에서 세포 펠릿을 재현탁(resuspended) 했습니다. 그런 다음, 피펫으로 재현탁된 전혈을 21 μ L 흡인한 후에, anti-CD14 Pacific Blue와 DRAQ5®가 2 μ L 들어 있는 다른 용기에 추가하고 혼합한 후에 2 분간 배양했습니다. 이 혼합물 20 μ L를 용해 완충제 80 μ L에 추가했습니다. 용해 완충제는 파라포름알데히드 고정제와 함께 사포닌 같은 순한 계면활성제 용액입니다. 세제는 세포 막에 수많은 구멍이 형성되도록 합니다. 적혈구는 막의 고유한 특성으로 인해 이런 구멍 형성에 특히 예민하고, 완전히 용해되어 내용물이 주위 액체로 흘러 나옵니다. 고정제의 존재는 백혈구가 의도하지 않게 용해되는 것을 방지합니다. 또한 혈소판도 용해되지 않습니다. 이 단계의 목적은 적혈구가 백혈구보다 약 1000:1로 개수가 더 많을 경우, 혼합물에서 적혈구를 제거하는 것입니다. 혈소판은 이미지 확보에 간섭을 일으키지 않으므로 본 처리 과정과는 무관합니다. 용해 완충제에도 알고 있는 농도로 10 μ M 비형광 비드를 포함하고 있습니다.

[0240]

5 분간 배양한 후에 용기를 1200 x g로 3 분간 회전시켰습니다. 피펫 팁으로 상청액을 흡인하고 적혈구 고스트(헤모글로빈이 없는 적혈구의 잔해)와 기타 잔해를 제거하고 카트리지의 폐기물 영역에 넣었습니다. 농축된 백혈구가 있는 액체 약 15 μ L가 세포 펠릿에 들어 있었습니다.

[0241]

세포 펠릿에 들어 있는 백혈구의 개수를 대충 어림짐작하기 위해, 먼저 피펫으로 용기 속의 백혈구를 재현탁한 후에 액체를 흡인하여 분광 광도계로 조사하도록 이동시켰습니다. 백혈구 혼탁액을 파장 32 nm 빛으로 조명했습니다. 이 파장은 Alexa Fluor® 647 염료와 DRAQ5®의 여기 파장입니다. 세포 혼탁액에서 방출되는 빛을 650 nm 긴 패스 필터로 필터링한 후에 분광 광도계로 측정했습니다. 이 측정값을 이전에 생성한 교정 곡선(calibration curve)과 연관 시켜 세포 혼탁액에 들어 있는 백혈구의 대략적인 농도를 추정했습니다. 일반적으로, 세포 농도는 1 μ L 당 1000 세포에서 1 μ L 당 100,000 세포까지의 범위 이었습니다. 이 추정치는 큐벳에 들어 있는 세포 농도를 미리 지정된 목표 농도의 2 배 범위 내로 제한하기 위해 적절한 회석 인수를 계산하는데 사용되었습니다. 이 단계의 목표는 큐벳에 들어 있는 세포의 농도가 너무 높거나 너무 낮지 않게 만들기 위한 것입니다. 세포 농도(밀도)가 너무 높으면 이미지 처리 알고리즘의 정확도가 손상되고, 세포 농도(밀

도)가 너무 낮으면 시료의 세포 개수가 불충분합니다.

[0242] 상기 단계에서 계산한 희석 인수를 기반으로, CD45 (범백혈구 표지자, pan-leukocyte marker), CD16 (호중구 표지자) 및 CD123 (호염기구 표지자)에 대해 표식이 붙은 항체가 들어 있는 희석제를 세포 혼탁액에 넣고 혼합했습니다.

[0243] 큐벳을 큐벳 운반기(carrier)와 함께 큐벳 운반기 블록에 넣어둔 후에, 세포계산 완충제에서 재현탁된 백혈구 혼합물 10 μL 를 큐벳에 있는 두 채널 각각에 넣었습니다. 혼합물을 큐벳의 채널에 넣은 후에, 카트리지에 있는 용기에서 헥사데칸 10 μL 를 피펫으로 흡인하고, 백혈구가 들어 있는 큐벳의 두 채널의 양 열린 끝에 미네랄 오일 한 방울을 넣습니다.

[0244] 그런 다음, [장치 수준 시료 취급 장치]를 [큐벳 운반기 / 큐벳 조합]과 결합하고, 카트리지가 들어 있는 모듈에서 장치의 세포계산 모듈로 [큐벳 운반기 / 큐벳 조합]을 이동시켰습니다. 세포계산 모듈에서, [장치 수준 시료 취급 장치]는 [큐벳 운반기 / 큐벳 조합]을 세포계산 모듈의 현미경 스테이지에 올려 놓았습니다. [큐벳 운반기 / 큐벳]을 현미경 스테이지에 올려 놓은 후에, 백혈구가 들어 있는 큐벳의 두 채널에 대해, 상기 적혈구 / 혈소판 혼합물에 대한 설명에 따라, 이미지를 확보했습니다.

[0245] 백혈구의 암시야 이미지를 사용하여 시야 내의 세포 개수를 계산했습니다(그림 9A에 표시). 세포 표면 표지자를 사용하여 이미지에 들어 있는 개별 백혈구의 세포 종류를 결정했습니다. 예를 들어, CD14는 단핵구(monocyte)를 표시하고 CD123은 호염기구(basophil)를 표시하고 CD16은 호중구(neutrophil)를 표시하고, CD45-AF647은 모든 백혈구를 표시하는 데 사용되었습니다(그림 9B-9E). (백혈구 같은) 유핵 세포를 핵이 없는 성숙 적혈구로부터 구분할 수 있도록, 핵염료 Draq5를 사용하여 세포 핵을 표시했습니다(그림 9F).

[0246] 여기에 도입된 이미지 처리 알고리즘은 적응형 임계값 설정 기법(adaptive thresholding)과 가장자리 탐지 기법의 조합을 이용하여 세포를 탐지하기 위해 세포의 형광 이미지를 이용했습니다. 국부 강도(local intensity)와 강도 기울기(intensity gradients)를 기반으로, 각 세포에 대해 관심 영역(RoI: regions of interest)을 만들었습니다. 암시야 이미지를 사용하여, 시야 내의 비드를 식별하고 비드 주위에 관심 영역을 만들었습니다. 각 시야에 들어 있는 모든 관심 영역(RoI)을 나열했으며 해당 시야의 각 이미지에서 관심 영역의 강도를 계산했습니다. 이미지 처리 알고리즘으로 얻은 출력 정보는 각 관심 영역에 대한 모양 또는 형태 계량학적(morphometric) 측정값, 형광도, 및 암시야 강도로 구성되어 있습니다. 각 대상물을 림프구, 단핵구, 호염기구, 호산구, 호중구 또는 비드로 분류하기 위해 통계적 방법을 사용하여 이 정보를 분석했습니다. 서로 다른 종류의 세포 열거, 해당 비드의 개수 및 시료 처리 동안 구현한 희석 비율을 기반으로, 원본 전혈의 1 μL 당 세포의 절대 농도를 계산했습니다. 이 값은 모든 백혈구와 각 하위 종류에 대해 계산했으며, 절대 농도(1 μL 당 세포 개수)와 비율(%) 모두를 산출했습니다.

[0247] 이미지의 예와 이런 측정값들의 결과 도표는 그림 9, 10, 및 11에 표시되어 있습니다.

[0248] 그림 9는 전혈의 시료에서 얻은 혈액 세포의 대표 이미지입니다. 이 이미지들은 다른 이미지 확보 기법과 염료를 사용하여 확보했습니다. 그림 9A에 표시된 이미지는 전혈의 세포에 대해 암시야 조명을 사용하여 확보한 것입니다. 그림 9B에 표시된 그림은 Pacific Blue 염료로 표식된 anti-CD14 항체에서 나오는 형광을 보여주는 전혈의 세포를 촬영한 것입니다. 그림 9C에 표시된 그림은 PE Cy5 염료로 표식된 anti-CD123 항체에서 나오는 형광을 보여주는 전혈의 세포를 촬영한 것입니다. 형광 세포는 호염기구(basophil)입니다. 그림 9D에 표시된 그림은 PE 염료로 표식된 anti-CD16 항체에서 나오는 형광을 보여주는 전혈의 세포를 촬영한 것입니다. 형광 세포는 호중구(neutrophil)입니다. 그림 9E에 표시된 그림은 AF647 염료로 표식된 anti-CD45 항체에서 나오는 형광을 보여주는 전혈의 세포를 촬영한 것입니다. 모든 백혈구는 이 조건下에서 형광 발광합니다. 그림 9F에 표시된 그림은 세포 핵을 염색하기 위해 DRAQ5®로 염색한 전혈의 세포를 촬영한 것입니다. 그러므로, 백혈구와 혈소판이 염색되어 이 조건 하에서 형광 발광하지만 (핵이 없는) 적혈구는 염색되지 않았기 때문에 형광 발광하지 않습니다.

[0249] 그림 10은 전혈에 들어 있는 세포 종류에 대한 대표적인 합성 이미지입니다. 본 문서에 공개된 방식에 따라 촬영한 이미지를 합성한 것입니다. 단핵구(monocyte, 그림의 상단 왼쪽 사분면에 표시되어 있으며 파란 자주색 고리로 둘러 싸인 빨간색 중심으로 표식 되어 있음)의 이미지, 림프구(lymphocyte, 그림 중앙에 표시되어 있으며, 흐린 빨간색 고리로 둘러 싸여 있으며 밝은 빨간색 중심으로 표식 되어 있음)의 이미지, 호산구(eosinophil, 그림의 아래 왼쪽 사분면에 표시되어 있으며 빨간색 테두리로 둘러 싸인 초록색 중심으로 표식 되어 있음)의 이미지, 그리고 호중구(neutrophil, 그림의 아래 오른쪽 사분면에 표시되어 있으며 노란색과 초록색 테두리로 둘러

싸인 초록색 중심으로 표식 되어 있음)가 그림에 표시되어 있습니다.

[0250] 이런 혈액 시료에서 다양한 세포 종류를 식별하고 정량화하는 것은 흥미롭습니다. 이런 분류 과정에는 여러 가지 접근 방식이 있습니다. 일부 구현에서, 이런 분류 접근 방식은 다차원 분류에 대한 통계적 문제로 간주될 수도 있습니다. 이 분야에는 이런 종류의 분류 문제를 해결하기 위한 매우 다양한 방법이 있습니다. 이런 분석에 대한 특정 구현이 아래에 제공되어 있습니다.

[0251] 그림 11에는 이 예에서 설명된 세포계산 분석 검사로 식별 및 정량화한 다양한 세포 종류가 도표화되어 있습니다. 그림 11A는, 단핵구를 식별하기 위해, 표지자 FL-17의 강도(pacific blue 염료로 표식된 anti-CD14 항체)를 세로 축, 표지자 FL-9의 강도(암시아 분산 신호)를 가로 축으로 하고, 점(세포)을 도표화 해 놓은 것입니다. 그림 11B는, 호염기구를 식별하기 위해, 표지자 FL-19의 강도(PE-CY5 염료로 표식된 anti-CD123 항체)를 세로 축, 표지자 FL-15의 강도(PE 염료로 표식된 anti-CD16)를 가로 축으로 하고, 점(세포)을 도표화 해 놓은 것입니다. 그림 11C는, 림프구를 식별하기 위해, 표지자 FL-15의 강도(PE 염료로 표식된 anti-CD16)를 세로 축, 표지자 FL-11의 강도(AF647 염료로 표식된 anti-CD45)를 가로 축으로 하고, 점(세포)을 도표화 해 놓은 것입니다. 그림 11D는, 호중구와 호산구를 식별하기 위해, 표지자 FL-15의 강도(PE 염료로 표식된 anti-CD16 항체)를 세로 축, 표지자 FL-9의 강도(암시아 분산 신호)를 가로 축으로 하고, 점(세포)을 도표화 해 놓은 것입니다.

[0252] 단핵구의 초기 식별(9.6%, 그림 11A에 표시)은 호염기구(0.68%, 그림 11B에 표시)를 식별하기 위해 사용되었습니다. 단핵구와 호염기구의 식별은 (그림 11A 및 11B에 표시됨) 호중구와 호산구를 식별하기 위해 사용되었습니다(그림 11D에 표시된 백혈구 중 68% 호중구, 3.2% 호산구). 마지막으로, 림프구는 그림 11C에 식별되어 있습니다(그림 11C에 표시된 백혈구의 93%, 원본 시료에 들어 있는 세포의 18%에 해당).

[0253] 현재 방법은 다른 방법과 잘 일치됩니다. 백혈구, 적혈구 및 혈소판의 개수는 EDTA로 응고 방지 처리된 전혈의 시료를 사용하여 계산되었습니다. 시료에 들어 있는 백혈구를 추가로 분석하여 호중구, 단핵구, 및 림프구의 개수를 계산했습니다. 그림 12에 표시된 측정에서, EDTA로 응고 방지 처리된 전혈 시료는 두 부분으로 나눴으며, 시료 중 한 부분은 본 문서에서 공개된 방법과 시스템을 이용하여 분석했습니다. 시료의 다른 부분은 Abbott CELL-DYN Ruby System (Abbott Diagnostics, Lake Forest, IL, USA)을 사용하여 분석했습니다. 이 시스템은 상용 다수 매개 변수 자동 혈액 분석기입니다. 그림 12에는 두 방법 모두로 얻은 결과를 비교한 것이 표시되어 있습니다.

[0254] 그림 12A-12C에 표시된 것처럼, 현재 방법으로 측정한 백혈구(그림 12A "백혈구"), 적혈구(그림 12B "적혈구"), 및 혈소판(그림 12C)의 개수는 현재 방법과 동일한 시료의 부분표본에 대해 다른 방법으로 측정한 백혈구, 적혈구, 및 혈소판의 개수와 잘 상관(일치) 됩니다. 그림 12D-12F에 표시된 것처럼, 두 방법들 중 아무 것으로 측정한 호중구, 단핵구, 및 림프구의 개수는 다른 방법으로 측정한 값과 서로 매우 비슷하거나 잘 일치합니다.

[0255] 본 문서에 사용된 용어의 관점에서, "세포계산(학)(cytometry)"이라는 용어는 생체시료의 세포에 대한 관찰, 분석, 및 방법을 뜻합니다. 여기서 세포는 액체 속에서 또는 기질 상에 상당히 정지해 있습니다. 세포계산학으로 탐지 및 측정되는 세포는 광학적 탐지기, 전기 탐지기, 또는 음향 탐지기에 의해 탐지 및 측정됩니다. 세포계산학에는 생체시료의 세포 이미지를 준비 및 분석하는 작업이 포함될 수 있습니다(예, 2차원 이미지). 세포는 표식을 붙일 수 있으며(예를 들어, 형광 표식, 화학 발광 표식, 효소 표식, 또는 기타 표식) 평판 배양(예를 들어, 기질에 정착하도록 둠)하고, 일반적으로 카메라로 이미지를 얻습니다. 세포계산에서 세포의 이미지를 얻기 위해 현미경을 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 현미경으로 세포의 이미지를 얻을 수 있습니다 세포계산에 사용된 이미지에는 일반적으로 한 개 이상의 세포가 포함됩니다.

광학 시스템

[0257] 그림 6A 및 6B를 참조하면서, 여기에서 사용 적합한 광학 시스템의 구현을 지금부터 설명합니다. 시스템의 이런 구현은 세포계산을 수행할 용도로 설명되었지만, 시스템 구현은 세포계산 용도 외에도 사용할 수 있습니다. 비제한적인 예로, 본 문서에 공개된 시스템의 이미지 확보 및 이미지 처리 능력은, 세포계산 밖의 응용을 포함하여, 수많은 응용에 사용할 수 있습니다. 분석할 시료 이미지를 캡처(확보)하고, 이미지 정보는 일반적으로 정량적 측정을 위한 시스템과 연결 또는 연관되어 있지만, 정량적 정보와 연관된 이미지를 추가 분석하여, 이미지에서 다른 방법으로는 얻을 수 없는, 임상 정보를 수집할 수 있습니다.

[0258] 세포계산법 또는 기타 광학적 또는 이미지 확보 수단으로 분석할 이미지는, 분석하기 위해 시료 홀더에 보관할 수 있습니다. 예를 들어, 큐벳을 시료 홀더로 사용할 수 있습니다. 그림 6A에 표시된 구현에는 분석하기 위한 시료 또는 시료 부분을 수용하기 위한 구멍 602가 여러 개 있는 큐벳 600의 투시도가 표시되어 있습니다. 그림

6A 구현의 가로 단면도 모양은 가로 직사각형 단면 모양입니다. 시스템이 큐벳 문맥에서 설명되었지만, 다른 시료 보관 장치로 큐벳 600 대신에 또는 큐벳 600과 함께 사용할 수 있습니다.

[0259] 그럼 6A 구현에 표시된 것처럼, 구멍 602는 시료 취급 시스템(표시 안 됨)에 대해 사용할 수 있으며, 시료를 구멍 602에 보관할 수 있는 다른 배달 장치에 대해서도 사용할 수 있습니다. 구멍 602는 시료를 분석할 수 있는 큐벳의 분석 영역 608에 연결할 수도 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 분석 영역 608은 소실(chamber)이 될 수 있습니다. 비제한적인 다른 예에서, 분석 영역 608은 채널(channe1)이 될 수 있습니다. 구현에서, 채널로 구성된 분석 영역 608은 두 개의 입력 포트 602에 연결할 수 있습니다. 비제한적인 추가 예에서, 분석 영역 608은 시료가 흐르지 않는 방식으로 보관되는 채널이 될 수도 있습니다. 여기에 있는 임의의 구현에서, 시스템은 분석하는 동안 시료를 흐르지 않는 방식으로 보관할 수 있습니다. 선택적으로, 일부 대체 구현을 구성하여 분석 전후 또는 분석 동안 시료가 흐르도록 할 수도 있습니다. 일부 구현에서, 분석 후에, 시료를 큐벳 600에서 배출하여 추가 처리 및/또는 분석을 위해 다른 스테이션(다수 스테이션이 있는 시스템에서)으로 전달할 수 있습니다. 일부 구현은 시료 흐름을 통제하기 위해 시스템에 게이트(gate)를 사용할 수 있습니다.

[0260] 그럼 6A는, 큐벳 600의 일부 구현에서, 큐벳 600에는 다수의 구멍 602가 있을 수 있습니다. 입구 602를 통해 시료 홀더에 시료를 넣을 수 있습니다. 구멍 602는 분석 영역 608에 (예를 들어, 액체 연속적으로) 연결 할 수 있습니다. 분석 영역 608은 다수의 구멍 602와 (예를 들어, 액체 연속적으로) 연결할 수 있습니다. 일부 구현에서 큐벳 600에 구멍 602의 개수가 많거나 적을 수 있습니다. 일부 구현에서, 구멍 602의 선택한 쌍이나 또는 기타 세트가 동일한 채널(예를 들어, 채널로 구성된 분석 영역 608)을 액세스할 수 있도록, 특정 구멍 602를 연결할 수 있습니다. 비제한적인 예에서, 분석 영역 608의 각 끝에는 하나의 구멍 602가 있을 수 있습니다. 선택적으로, 분석 영역 608의 한 끝에 둘 이상의 구멍 602가 있을 수 있습니다.

[0261] 큐벳 600의 구현에는 구조물 610이 있을 수 있습니다. 구조물 610을 사용하여 시료 취급 시스템으로 큐벳 600에 연결하여 큐벳 600을 이동할 수 있습니다. 그럼 6A와 그림 6B에 표시된 큐벳 600은 소자 610을 통해 시료 취급 시스템과 결합할 수 있습니다. 이렇게 하여 큐벳 610을 한 위치에서 다른 위치로 이동할 수 있습니다. 예를 들어, 특정 위치(광학 이미지 확보 및 분석을 위해 탐지기 위로)로 이동 전후에, 소자 610을 사용하여 큐벳 600을 원하는 위치에 고정할 수 있습니다. 큐벳 600을 위치에 고정하기 위해 소자 610을 사용하는 장치나 도구 또는 소자 610을 사용하여, 큐벳 600을 위치에 고정할 수 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 구조물 610은 큐벳 600에 있는 구멍이 될 수 있습니다. 이 구멍(구조물 610)을 사용하여 피펫 또는 기타 연장 부품을 큐벳 600에 연결하고, 큐벳 600을 원하는 위치로 이동할 수 있습니다. 선택적으로, 해당 구멍 자리에 또는 해당 구멍과 함께, 구조물 610은 돌출물, 고리(후크), 자석, 자석화 가능 원소(요소), 금속 원소(요소), 및/또는 큐벳 이송 장치에 연결하는 데 사용할 수 있는 기타 장치가 되거나 포함할 수 있습니다. 구현에서, 큐벳 600에 힘(예, 압축 또는 기타 힘)을 가할 수 있습니다; 예를 들어, 큐벳 600을 기판(substrate) 또는 표면(예, 베이스 지지대 620의 표면)에 대해 누르기 위해 큐벳 600에 압력을 가할 수 있습니다. 이렇게 하여 큐벳 600을 표면과 광학 접촉하도록 배치합니다. 구현에서, 이런 힘(예, 압축력)은, 큐벳 600과 베이스 지지대 620 사이에 올바른 접촉을 제공하여, 원하는 광학적 특성을 제공하는 데 도움될 수 있습니다. 이렇게 하면, 빛이 접합면에서 크게 왜곡되지 않고 통과할 수 있으며 또는 접합면에서 크게 반사되지 않거나 또는 기타 원하는 광학적 특성을 얻을 수 있습니다. 구현에서, 이런 힘(예, 압축)을 최소한 부분적으로 구조물 610 또는 다수의 구조물 610을 통해 가할 수 있습니다.

[0262] 그럼 6B (투시도에서)에 표시된 것처럼, 큐벳 600은 원형 가로 단면 모양일 수도 있습니다. 구멍 602(또는 다수의 구멍 602, 이것들은 유사한 구현에서도 존재할 수 있습니다. 그림에는 표시되지 않음)의 경우, 시료 취급 시스템 또는 기타 전달 시스템으로 구멍 602에 시료를 놓을 수 있습니다. 그런 다음, 시료를 분석할 수 있는 큐벳의 분석 영역 608로 전달합니다. 알맞은 분석 영역 608를 이용하는, 비제한적인 예에는 소실(chamber)로 이루어진 분석 영역 608과 채널로 이루어진 분석 영역이 포함되어 있습니다. 구현에서, 이런 분석 영역 608은, 그림 6B에 표시된 고리모양 구조물 604 같은, 고리모양 구조물 내에 위치할 수 있습니다. 구현에서, 구멍 602는 분석 영역 608과 연결할 수 있습니다. 구현에서, 구조물 604 내의 분석 영역 608은 연속적인 고리모양(ring-shaped) 소실을 형성하고, 구멍 602에서 두 방향들 중 하나로 소실 내에서 흐름을 허용하는 데 효과적인 구멍 608과 연결됩니다. 구현에서, 구조물 604 내의 분석 영역 608은 고리모양 채널 또는 소실을 형성하고, 한 쪽 끝은 구멍 608과 연결하고, 다른 끝은 구멍 602에서 분리되거나 차단되어, 구멍 602에서 한 방향만으로 소실 내에서 흐름을 효과적으로 허용합니다. 구현에서, 이런 일방(한 방향) 고리모양 채널 또는 소실에는 배출구(vent) 또는 조리개(aperture)가 구멍 602에서 면 쪽에 있습니다. 비제한적인 추가 예에서, 분석 영역에는 시료가 흐르지 않는 (non-flowing) 방식으로 보관되는 채널이 포함되어 있을 수 있습니다. 시료는, 고리 모양 채널로 이루어진 분석 영역 608 속에서 흐르지 않는 방식으로 보관될 수 있습니다. 고리모양 채널이 두 방향으로 구멍 602에 연결되어

있거나 또는 고리모양 채널이 한 방향만으로 구멍 602에 연결되어 있을 수 있습니다. 여기에 있는 임의의 구현에서, 시스템은 분석하는 동안 시료를 흐르지 않는 방식으로 보관할 수 있습니다. 선택적으로, 일부 대체 구현을 구성하여 분석 전후 또는 분석 동안 시료가 흐르도록 할 수도 있습니다. 일부 구현에서, 분석 후에, 시료를 큐벳 600에서 배출하여 추가 처리 및/또는 분석을 위해 다른 스테이션(다수 스테이션이 있는 시스템에서)으로 배달할 수 있습니다. 일부 구현은 시료 흐름을 통제하기 위해 시스템에 게이트(gate)를 사용할 수 있습니다.

[0263] 그림 6B에는 단일 고리 모양 구조물 604만 표시되어 있습니다. 그러나, 그림 6B에 표시된 것과 같은 모양의 큐벳 600의 추가 구현에서, 큐벳 600에는 다수의 고리모양 구조물 604가 있을 수 있습니다. 예를 들어, 고리모양 구조물 604가 다수 들어 있는 큐벳 600에는 서로 다른 크기의 고리모양 구조물 604가 동심(concentric)을 이루고 있으며, 외부 고리 구조물 604는 하나 이상의 내부 고리모양 구조물 604를 둘러싸고 있습니다. 각 고리모양 구조물 604의 내부에는 분석 영역 608이 포함되어 있을 수 있습니다. 그림 6B에는 단일 구멍 602만 표시되어 있습니다. 그러나, 그림 6B에 표시된 것과 같은 모양의 큐벳 600의 추가 구현에서, 큐벳 600에는 다수의 구멍 602가 있을 수 있습니다. 예를 들어, 다수의 고리 모양 구조물 604(예를 들어, 다수의 동심 고리 모양 구조물 604가 있음)가 있는 큐벳 600에는 다수의 구멍 602(예를 들어, 각각의 고리 모양 구조물 604에는 적어도 한 개의 구멍 602가 있을 수 있음)가 들어 있을 수 있습니다. 일부 구현에서 큐벳 600에 구멍 602의 개수가 많거나 적을 수 있습니다. 일부 구현에서, 구멍 602의 선택한 쌍이나 또는 기타 세트가 동일한 채널 또는 소실을 액세스할 수 있도록, 특정 구멍 602를 연결할 수 있습니다. 비제한적인 예에서, 분석 영역의 각 끝에는 한 개의 구멍 602가 있을 수 있습니다. 선택적으로, 분석 영역 608의 한 끝에 둘 이상의 구멍 602가 있을 수 있습니다.

[0264] 그림 6A와 그림 6B에 표시된 것과 같은 큐벳의 일부 구현에는 큐벳 600의 선택 영역 위에 구조물 604를 제공할 수 있습니다. 한 구현에서, 구조물 604는 리브(ribs)이며, 리브는 통제 두께가 있는 큐벳의 영역에 대해 구조적 지지대(structural support)를 제공합니다(예, 영역 613). 예를 들어, 두께는 원하는 광학적 특성을 제공하도록 선택할 수 있으며, 큐벳 600 내에서 반사 전후에 빛이 따라 이동하는, 원하는 광로도 포함됩니다. 이런 반사는 내부 부분 반사(PIR)이거나 내부 전반사(TIR)가 될 수 있습니다. 이런 반사는, 빛의 파장, 표면에 도달하는 빛의 입사각, 물질의 구성 요소(영역 613 및 영역 613 경계 지역 외부의 환경 또는 물질등) 및 기타 요인들을 포함하여, 많은 요인들(factor)에 따라 달라집니다. 그림 6A에 표시된 구현에서, 구조물 604는 모양이 직사각형이고 직사각형 단면을 갖고 있습니다. 그림 6B에 표시된 구현에서, 구조물 604는 고리 모양이고, 직사각형 단면, 사다리꼴 단면, 또는 기타 단면 모양을 갖고 있을 수 있습니다. 이런 구조물은 알맞은 임의의 단면 모양을 가질 수 있습니다. 그림 8B에 표시된 것처럼, 이런 구조물 604는 삼각형 단면(예를 들어, 다수의 리브가 있을 때 텁니 모양 단면을 형성함)을 가질 수도 있습니다. 이런 구조물 604은 다른 모양 및 단면도 가질 수 있으므로(예를 들어, 반원형, 타원형, 불규칙한 모양, 또는 기타 모양), 구현에서, 동일 시스템 내에 둘 이상의 모양이 있을 수 있습니다(예를 들어, 하나의 큐벳에 직사각형, 삼각형, 또는 기타 모양의 구조물이 들어 있을 수 있습니다). 통제 두께 영역 613이 큐벳의 특정 영역에 대해 상대적으로 줄어든 두께에 있고, 구조물 604에 의해 제공되는 기계적 지지의 이점을 누릴 수 있을 때, 구조물 604를 사용할 수 있습니다.

[0265] 구조적 지지를 제공하는 것 외에도, 구조물 604는 큐벳 600 내에서 빛의 내부 반사를 위해 물질과 광로를 제공하는 데에도 유용합니다. 그림 8A-8D에 표시된 것처럼, 큐벳 600 속에서 반사된 빛에는 구조물 604(예를 들어, 그림에 표시된 것처럼, 리브, 또는 삼각형 단면을 갖고 있는 구조물, 또는 원형 또는 반원형 단면 같은 기타 모양) 내에서 반사된 빛의 광로가 포함되어 있을 수 있습니다. 그러므로 구조물 604는 큐벳 600의 표면 614에서 밖으로 연장된 볼록 형상(convex features)을 제공할 수 있습니다. 또는 큐벳 600의 표면 614에서 안으로 연장된 오목 형상(concave features)을 제공할 수도 있습니다. 또는 큐벳 600의 표면 614에서 오목과 볼록 형상 모두를 제공할 수도 있습니다. 그러므로 구조물 604는 큐벳 600에 대해 기계적 지지 작용을 제공할 수 있으며, 큐벳 600에 대해, 광로(optical pathways)를 포함하여, 원하는 광학적 특성을 제공할 수 있고, 본 문서에 공개된 것처럼, 큐벳 600에 대해 기타 원하는, 유용한 특징과 기능을 제공할 수 있습니다.

[0266] 그러므로 지지 구조물 604는, 뺏뺏함을 포함하여, 구조적 지지를 큐벳 600에 제공하는 데 유용합니다. 큐벳 600의 광학적 특성은 분석 영역 608에서 세포, 입자 및 시료의 기타 성분 등에 대해, 시료의 광학적 이미지 확보와 기타 광학적 측정에 사용할 때 중요합니다. [베이스 부분 606, 또는 표면 614 또는 618의 편평도(flatness)의 유지관리를 포함하여, 큐벳 600의 표면의 올바른 편평도(flatness) 유지관리], [큐벳 600의 올바른 방향과 구성의 유지관리(예를 들어, 비틀기, 굽히기, 또는 기타 변형 없음)], [큐벳 600의 올바른 위치 유지관리(예를 들어, 베이스 지지대 620 또는 광학적 셋업 내에서)] 등은 큐벳 600을 사용하여 광학적 측정의 무결성(integrity) 및 확보한 이미지의 무결성에 중요할 수도 있습니다. 그러므로, 예를 들어, 지지 구조물 604와 베이스 부분 606의 설계와 구성은 큐벳 600의 올바른 광학적 특성을 제공하고 유지하는 데 매우 중요한 요소입니다.

다. 분석 영역 608의 올바른 치수 유지관리는, 분석 영역 608의 올바른 거리와 상단 표면(또는 측면벽)의 상대 각도와 하단 표면(또는 측면 벽의)의 상대 각도의 유지관리를 포함하여, 분석 영역 608 내에서 시료에 대해 정확하고 일정한 조명을 제공하는 데 중요할 수도 있습니다. 분석 영역 608의 올바른 치수 유지관리는 분석 영역 608의 부피를 보장하고, 분석 영역 608 내에서 시료 부피가 정확하도록 보장하는 데 중요할 수 있습니다. 본 문서에 설명되었듯이, 추가적인 편평도를 보장하거나 비틀림 또는 변형을 줄이거나 또는 사용 중에 큐벳의 올바른 모양, 크기, 및 방향을 보장하기 위해 큐벳 600에 힘(예를 들어, 압축력)을 가할 수 있습니다. 사용 중에, 큐벳의 올바른 편평도, 올바른 모양, 크기, 및 방향을 보장하는 데 압축(력)이 필요하지 않을 수도 있음을 이해해야 합니다. 예를 들어, 구현에서, 사용하는 동안, 큐벳 600이 올바른 편평도와 올바른 모양, 크기, 및 방향을 갖도록 돋거나 보장하는 데 구조물 604만으로 충분할 수도 있습니다. 또한, 구현에서, 사용하는 동안, 큐벳 600의 올바른 편평도와 올바른 모양, 크기, 및 방향을 유지하도록 돋거나 보장하는 데 압축력(compression)만으로 충분할 수도 있음을 이해해야 합니다. 구현에서, 구조물 604와 압축력의 조합은, 사용 중에, 큐벳의 올바른 편평도와 올바른 모양, 크기, 및 방향을 유지하는 데 도움되거나 보장할 수 있음을 이해해야 합니다.

[0267]

지지 구조물 606과 커버 부분 612를 포함하여, 큐벳 600은 알맞은 광학적 특성을 지닌 임의의 재질로 만들 수 있습니다. 구현에서, 지지 구조물 606과 커버 부분 612를 포함하여, 큐벳 600은 유리(예를 들어, 석영, 또는 봉규산 유리(borosilicate glass), 또는 규산 알루미늄 유리(aluminosilicate glass), 또는 규산 나트륨 유리(sodium silicate glass), 또는 기타 유리)로 만들 수 있습니다. 구현에서, 커버 부분 612 또는 베이스 지지대 620은 아크릴 폴리머 또는 투명 폴리머(polymer)(예를 들어, 시클로올레핀(cyclo-olefin), 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리스티렌(polystyrene), 폴리에틸렌(polyethylene), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride), 또는 기타 폴리머(polymer) 또는 코폴리머(co-polymer)), 또는 기타 투명 재질로 만들 수 있습니다. 이런 재료의 광학적 특성 외에도, 물리적 특성(예를 들어, 경도(hardness), 빛빠짐, 녹는점, 기계 가공 가능성 및 기타 특성), 다른 재료와의 호환성(compatibility), 비용, 및 기타 요인은 큐벳 600을 제조하는 데 사용하는 재료의 선택에 영향을 줄 수 있습니다. 상기 설명했듯이, 구조물 604의 존재, 압축력(예를 들어, 구조물 610을 통해, 지지 구조물 606 및 커버 부분 612의 적어도 한 부분에 직접 적용)의 가용성(availability), 및 기타 요인으로 인해 석영(quartz)보다 덜 단단한 재질을 사용할 수도 있습니다. 그럼에도, 재질은 본 문서에서 공개된 시스템과 방법에 사용할 때, 필수적인 광학적 및 기계적 특성을 제공해야 합니다. 또한, 구조물 604의 존재, 압축력의 가용성, 및 기타 요인들로 인해, 이런 구조물, 압축력, 및 기타 요인이 없을 경우(예를 들어, 변형 가능성이거나 기타 요인들로 인해) 불가능할 수도 있는 제조 기법과 허용 오차를 사용할 수도 있습니다. 또한, 구조물 604의 존재, 압축력의 가용성, 및 기타 요인들로 인해, 이런 구조물, 압축력, 및 기타 요인들이 없을 경우 사용할 수도 있는, 가격이 저렴한 재질을 포함하여, 재질을 사용할 수도 있습니다.

[0268]

그러므로, 올바른 설계, 제작, 및 지지 구조물 604와 베이스 부분 606에 대한 재질은 큐벳 600과 큐벳의 사용에 중요합니다.

[0269]

일부 구현에서, 이런 통제 두께 영역 613(그림 8A, 8B, 8D 참조)은 분석 영역 608에 위치하도록 선택됩니다. 일부 구현에서, 이런 통제 두께 영역 613은 특정 광학적 특성을 분석 영역에 또는 가까이에 줄 수 있습니다. 일부 구현에서, 구조물 604는 큐벳 600을 통과하는 빛에 광학적 특성을 제공하도록 구성할 수 있습니다. 선택적으로, 일부 구현에서, 구조물 604는 큐벳 600의 광학적 특성에 영향을 주지 않도록 구성할 수 있습니다. 이런 구현에서 구조물 604는 하나 이상의 광학적 흡수 표면을 갖도록 구성할 수 있습니다. 예를 들어, 그러나 제한 없이, 특정 표면은 검은색일 수도 있습니다. 선택적으로, 일부 구현에서 구조물 604는 빛을 흡수하는 재질로 제작할 수도 있습니다. 선택적으로, 구조물 604는 분석 영역 가까이에서 기계적 지지 작용은 제공하지만 큐벳 600의 광학적 특성에 간섭을 일으키지 않도록 배치할 수 있습니다.

[0270]

예를 들어, 통제 두께 영역 613의 표면 614, 구조물 604의 표면 618를 포함하여, 특정 표면은 검은색, 또는 기타 색으로 코팅할 수 있습니다. 이런 코팅은 한 겹(one layer)이거나 여러 겹이 될 수 있습니다. 예를 들어, 표면 614 또는 618의 알맞은 코팅은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상의 겹이 될 수 있습니다. 구현에서, 예를 들어, 구조물 604(예를 들어, 표면 618) 표면 또는 표면 614는 3 또는 5 겹으로 코팅할 수 있습니다. 이런 코팅에는 염료, 잉크, 페인트, 표면 처리, 유색 테이프, 또는 기타 코팅 또는 표면 처리가 포함될 수 있습니다. 구현에서, 검정 또는 기타 컬러 표지자(예를 들어, Paper Mate®, 또는 Sharpie®, 또는 Magic Marker®, 또는 기타 표지자)를 사용하여 통제 두께 영역 613의 표면 614 또는 구조물 604의 표면 618를 코팅하는 데 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 초대형 검은색 표지자(marker)를 사용하여 다수의 검은색 잉크 코팅을 표면 614 또는 구조물 604의 외부 표면 618에 적용하여, 광학적 흡수 표면을 제공하고 큐벳 600의 광학적 특성을 향상시킬 수 있습니다. 구현에서, 표면 614 또는 618은 표면에서 (PIR 또는 TIR 관계 없이) 반사율(reflectance)에 영향을 주

거나 줄이도록 코딩하거나 처리할 수 있습니다. 표면의 반사율을 줄이면 표면에서 나오는 배경 조명에 영향을 줄 수 있습니다(예를 들어, 감소합니다).

[0271]

구현에서, 통제 두께 영역 613의 표면 614, 구조물 604의 표면 618를 포함하여, 특정 표면은 표면에서 반사율을 향상시키는 재질로 코팅할 수 있습니다. 표면 반사율은, 예를 들어, 표면을 코딩하거나 표면에 재질을 부착하여 향상시킬 수 있습니다. 반사율을 향상시키는 알맞은 물질에는 알루미늄, 은, 구리, 및 유전체 물질(예를 들어, 불화 마그네슘(magnesium fluoride), 불화 칼슘(calciunm fluoride), 또는 기타 소금 또는 산화 금속, 또는 기타 반사 물질 또는 유전체 물질)이 있습니다. 이런 코딩 또는 겹침(covering)은 한 겹이거나 여러 겹이 될 수 있습니다. 예를 들어, 표면 614 또는 618의 알맞은 코팅 및 겹침은 2, 3, 4, 5, 6, 7, 또는 그 이상의 겹이 될 수 있습니다. 표면의 반사율을 증가시키면 표면에서 나오는 트랜스 조명에 영향을 줄 수 있습니다(예를 들어, 증가시킵니다). 표면 반사율 증가는 분석 영역 608 내에서 시료의 이미지 확보에 도움되거나 향상시킬 수 있으며 또는 분석 영역 608 내에서 시료의 광학적 분석에 도움되거나 향상시킬 수 있습니다.

[0272]

큐벳 600은 일반적으로 투명하거나 광 전달성 물질로 제작됨을 이해해야 합니다. 선택적으로, 큐벳 600의 선택 부분(예를 들어, 분석 영역 또는 분석 영역과 관련된 영역)만 광학적으로 투명하거나 빛을 전달합니다. 선택적으로, 큐벳 600에서 선택된 층(겹) 또는 영역은 빛을 전달하지 않도록 구성할 수 있습니다. 큐벳의 한 부분이나 영역은 빛을 흡수하도록 코팅할 수 있습니다. 예를 들어, 표면(또는 표면의 부분)을 어두운 색 또는 빛 흡수 염료 또는 잉크로 코팅할 수 있습니다. 추가 예에서, 표면(또는 표면의 일부)은 테이프, 직물, 종이, 고무, 또는 플라스틱 같은, 어둡거나 빛을 흡수하는 재질로 코팅할 수 있습니다.

[0273]

그림 6A, 6B, 및 8A - 8D에는 큐벳 600이 베이스 지지대 620 위에 올려져 있는 구현이 표시되어 있습니다. 여기에서, 베이스 지지대 620의 일부 또는 전체는 광학적으로 투명하거나 빛을 전달하는 재질로 제작되어 있습니다. 일부 구현에서, 광학적으로 투명 또는 빛 전달 부분은 큐벳 600의 분석 영역과 정렬되어 있으며, 분석 영역 내에서 시료를 광학적으로 조사할 수 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 베이스 지지대 620은 X, Y, 또는 Z 축에 대해 이동 가능하며, 이미지 확보를 위해 큐벳 600을 원하는 위치로 이동할 수 있습니다. 일부 구현에서, 베이스 지지대 620에는 2 개의 축 상에서만 이동하는 플랫폼 또는 스테이지가 있습니다. 선택적으로, 일부 지지 구조물은 단일 축 상에서만 이동할 수 있습니다. 큐벳 600은 마찰, 기계적 결합, 또는 하나 또는 둘 모두의 부품에 장착된 고정 부품으로 지지 구조물 600과 결합되도록 구성할 수 있습니다. 구현에서, 압축력 또는 기타 힘을 큐벳 600 또는 베이스 지지대 620, 또는 둘 모두에 적용하여, 큐벳 600과 베이스 지지대 620 사이에 알맞게 접촉하고 적합하도록 보장할 수 있습니다. 구현에서, 이런 압축은 큐벳 600의 광전달성 표면, 또는 베이스 지지대 620의 광 전달 표면, 또는 둘 모두의 이런 표면이 광학적으로 편평하고 상당히 변형되지 않도록 보장하는 데 도움 될 수 있습니다. 예를 들어, 구현에서, 큐벳 600의 광학적 표면의 결함이나 비정상적인 것으로 인해 광학적으로 왜곡되는 것을 줄이거나 제거하기 위해, 큐벳 600을 베이스 지지대 620에 대해 압박을 가할 수 있습니다. 일부 구현에서, 이런 힘(예를 들어, 압축력)은 원하는 광학적 특성을 제공하는 데 도움될 수 있으며, 이런 힘이 가해지지 않았을 때 빛의 왜곡이 발생할 수 있는 접촉면에서 빛이 왜곡되지 않고 통과 되도록 하는 데 효과적입니다. 구현에서, 이런 힘(예, 압축)을 최소한 부분적으로 구조물 610 또는 다수의 구조물 610을 통해 가할 수 있습니다.

[0274]

그림 6A, 6B, 8A, 8B, 8C, 및 8D에는 조명 광원 650(표시된 것처럼 환형광, 그러나 이것에만 제한되지는 않음)으로 암시야 및/또는 명시야 관찰을 위해 조명이 제공된 구현이 표시되어 있습니다. 조명 광원 650은 베이스 지지대 620 아래에 있으며, 조명 장비가 큐벳 600 보다 아래에 있도록 합니다. 이런 구성을 이용하면, 큐벳 600의 상단 영역에서 피펫, 시료 취급 장비, 또는 기타 장비를 큐벳 600의 상단 표면에 있는 구멍 또는 기타 특징물에 대해 방해 받지 않고 접근시킬 수 있습니다. 선택적으로, 일부 구현에서, 큐벳 600 위에 조명 광원 660(접선으로 표시됨)을 배치하여, 하부 조명(예를 들어, 하부 조명 650, 그림 참조) 대신에, 또는 단독으로, 또는 다수의 조명과 함께 사용할 수 있습니다. 대물부 670을 그림처럼 배치하거나 다른 구성으로 배치하여 조명을 받고 있는 시료를 관찰할 수 있습니다. 큐벳 600과 광학 부분 650 및 670 사이의 상대적인 이동을 이용하여 큐벳 600 내에서 서로 다른 분석 영역을 볼 수 있도록 시스템을 조정할 수 있습니다. 선택적으로, 이들 부품들 중 하나만 이동시켜 큐벳 600의 서로 다른 영역을 조사할 수 있습니다.

[0275]

그림 7A를 참조하십시오. 적합한 이미지 확보 시스템에 대한 구현을 더 자세하게 설명하겠습니다. 그림 7A에는 베이스 지지대 620 아래에 배치된 다양한 부품의 도식 단면도가 표시되어 있습니다. 그림 6A에서 단면은 영역을 따라 굽어진 화살표 7로 표시되어 있습니다.

[0276]

그림 7A에는 큐벳 600이 들어 있는 한 구현이 표시되어 있습니다. 이 구현에서 큐벳 600은 베이스 부분 606과

커버 부분 612로 지정된 분석 영역 608로 이루어져 있습니다. 선택적으로, 분석 영역 608은 단일체 내에 정의 될 수 있습니다. 선택적으로, 분석 영역 608은 3 개 이상의 조각(부품)으로 지정할 수 있습니다. 예를 들어, 각각의 분석 영역 608에 대해 하나의 개별 커버 부품, 그러나 이것에만 제한되지는 않습니다. 한 구현에서, 레이어 606은 탁월한 광학 부품과 응용을 제공하는 시클로올레핀 폴리머 열가소성 수지(cyclo-olefin polymer thermoplastic) 같은 광학적으로 투명한 플라스틱으로 이루어져 있습니다. 그러나, 시클로올레핀 폴리머 열가소성 수지에만 제한되는 것은 아닙니다. 일부는 유리, 아크릴, 투명 폴리머, 또는 기타 투명 재질로 하나 이상의 겹(층) 또는 부품을 형성할 수 있습니다. 그럼 7A에 표시된 큐벳 600에는 5 개의 별도의 분석 영역 608이 들어 있습니다. 이들 영역은 그림에서 단면 모양으로 표시되어 있습니다. 분석 영역 608의 단면 모양은 직사각형, 정사각형, 또는 기타 모양이 될 수 있습니다. 예를 들어, 분석 영역 608은 얇은 소실(chamber)에게 상대적으로 큰 표면적을 제공하는 연장된 채널로 구성할 수 있습니다. 큐벳 600에는 1 개의 분석 영역 608이 포함되어 있거나, 또는 2 개의 분석 영역 608이 포함되어 있거나, 또는 3 개의 분석 영역 608이 포함되어 있거나, 또는 4 개의 분석 영역 608이 포함되어 있거나, 또는 5 개의 분석 영역 608(그림 7A에서처럼), 또는 그 이상의 분석 영역 608이 포함되어 있을 수 있습니다.

[0277] 이 비제한적인 예에서, 조사할 시료는 영역 608에 전체 또는 일부를 넣어둘(housed) 수 있습니다. 비제한적인 예로, 베이스 지지대 620 아래에 있는 광학 장치에는 환형광 650이 포함될 수 있습니다. 환형광 650은 도넛트형 반사기(toroidal reflector) 652와 광원 654로 구성되어 있습니다. 암시야 조명에 적합한 다른 조명 부품을 사용할 수도 있습니다. 그러므로 광학 장치에는 기타 조명 광원이 포함될 수 있으며, 단독으로 또는 이런 환형광과 함께 포함되어 있을 수 있습니다. 일부 구현에서 거울을 사용할 수도 있습니다. 일부 구현에서, 코팅 처리된 반사 면을 사용할 수도 있습니다. 일부 구현에서, 그림에 표시된 것과는 다른 반사기를 사용할 수도 있습니다(예를 들어, 시료 조명에 도넛트형 반사기를 사용하지 않을 수도 있습니다). 일부 구현에서 포물선형 반사기를 사용할 수도 있습니다. 일부 구현에서 타원 포물면 모양의 포물선형 반사기를 사용할 수도 있습니다. 일부 구현에서 다수의 개별 반사기를 사용할 수도 있습니다. 일부 구현에서 반사기를 전혀 사용하지 않을 수도 있습니다. 일부 구현에서, 하나 이상의 외부 반사기를 사용하거나 또는 사용하지 않으면서, 빛의 광로를 변경하는 기울어진 광원을 사용하여, 기울어진 조명을 사용할 수도 있습니다.

[0278] 그림 7A에 표시된 구현에서, 특정 파장의 레이저 다이오드 같은, 그러나 이것에만 국한되지 않고, 여기 에너지원(excitation energy sources) 680, 682, 및 684를 사용합니다. 여기(excitation) 에너지원은 분석 영역 608에 있는 시료로 빛의 광로를 변경합니다. 비제한적인 한 예에서, 소형 포장을 용이하게 하기 위해 에너지원 680, 682, 및 684는 빛의 방향을 색선별 소자 690(예를 들어, 색선별 거울 또는 빔스플리터(beamsplitter))로 변경할 수 있습니다. 색선별 소자는 여기 파장의 방향을 분석 영역 608로 변경합니다. 여기 파장은 표지자, 염료, 및/또는 시료의 기타 물질에서 형광단에 의해 형광 파장이 방출되도록 합니다. 방출된 형광 파장은 대물부 670을 통해 모아지고(funnled), 색선별 소자 690을 통과하고, 광 필터 휠 692를 통과하여, 카메라 시스템 같은, 그러나 이것에만 제한되지 않고, 탐지기 700으로 들어갑니다. 비제한적인 예에서, 색선별 소자 690은 여기 파장을 반사하지만 형광 파장과 광학적 관찰에 필요한 파장을 통과시킵니다.

[0279] 한 구현에서, 모든 형광 여기 파장은 분석 영역 608 내에 있는 시료를 동시에 조명합니다. 예를 들어, 탐지기 700은 프로그램 가능 프로세서 710과 연결할 수 있습니다. 프로그램 가능 프로세서 710은 포착된 신호 및/또는 이미지를 받아 분해하여, 형광 발광하는 형광단들과 연관된 파장들을 분해합니다. 일부 구현에서, 여기 공급원(excitation sources)은 시료를 순차적으로 조명하거나 또는 전체 여기 공급원들 중에 일부에 대해서 조명합니다. 물론, 시스템은 시료에서 형광단의 형광 기반 여기(excitation)에만 제한되지 않으며, 다른 탐지 기법과 여기 기법을 형광 대신에, 또는 단일 형광으로 또는 형광의 다수 조합과 함께 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 일부 구현에서, 암시야 조명 분산 정보를 동시에 수집하거나 형광 탐지와 조합하여 순차적으로 수집할 수 있습니다.

[0280] 시료 홀더 내에서 시료에 들어 있는 대상물(예를 들어, 세포, 비드, 또는 결정)에서 분산된 빛은 다수의 분산 각도로 분산됩니다. 여기에서, 분산 각도는 광원에서 대상물로 통과하는 입사광에 대해 상대적으로 측정됩니다. 이런 다수의 분산 각들은 분산 각도 범위를 구성합니다. 이런 시료 홀더에는 본 문서에 공개된 기능이 들어 있을 수 있으며, 내부 광반사를 위한 광로를 제공하도록 구성되어 있을 수 있습니다. 대상물의 이미지를 확보하도록 구성된 대물 렌즈는 분산된 빛을 수집하고 초점을 맞춥니다. 여기서, 빛은 탐지기로 전달될 수 있습니다. 대물 렌즈에 의해 초점이 맞춰지고 탐지기에 초점이 맞춰진 빛은 탐지기에서 광점(spot of light)을 형성할 수 있습니다. 구현에서, 대물 렌즈에서 탐지기로 이동하는 빛은 추가 렌즈를 사용하여 초점을 맞출 수 있습니다. 이런 초점은 탐지기에 형성된 광점의 크기를 줄일 수 있습니다. 탐지기에 초점이 맞어진 빛은, 추가 렌즈의 통과

여부에 관계 없이, 시료 홀더 내의 대상물로부터 다수의 분산 각도에서 분산된 빛으로 구성됩니다.

[0281] 신청자들은 본 문서에서, 소규모 범위의 분산 각도를, 사용하지 않았을 때 가능한 것 이상으로, 탐지할 수 있는 방법, 시스템, 및 장치(예를 들어, 시료 홀더)를 공개합니다. 이렇게 하여, 시료 또는 시료 내의 대상물에 대해 더 큰 해상도와 양질의 이미지를 확보할 수 있습니다. 신청자들은 본 문서에서, 예를 들어, PIR 및 TIR를 통해, 시료에 입사되는 광선의 각도와 강도를 조절하는 데 사용할 수 있는 큐벳의 설계 특징(또는 기능)을 공개합니다. 설계 특징은 분산된 빛의 각도를 측정할 때 사용하는 각도를 조절하는 데 효과적입니다.

[0282] 많은 시스템에서, 이미지 확보와 관계 없는 광학 장치로 인한 제약조건으로 인해 (예를 들어, 시스템을 통과한 빛의 퍼짐 정도 또는 면적(etendue)), 탐지기에 도달하는 빛의 분산 각도는 원하는 것 이상으로 더 넓을 수도 있습니다. 예를 들어, LED를 광원으로 사용하는 일부 환형광 큐벳 조합에서, 시료에 도달하는 광선은 주입각(principal angle) 주위에 최소한 20도 퍼질 수도 있습니다. 즉, 주광선(principal ray)이 60도 각도로 시료에 도달할 경우, 광선 다발(bundle of light rays)의 다른 광선들은 약 50도 ~ 70도의 분산 각도로 시료에 도달할 수도 있습니다. 대물부에서 수집된 빛의 분산 각도 원뿔의 퍼짐은 렌즈의 개구수(numerical aperture)에 따라 달라진다는 것을 이해해야 합니다. 이런 경우, 대물 렌즈에 의해 수집된 빛은 (예를 들어, 개구수 40도) 약 30-70도의 원뿔 속에 들어갑니다. 결과적으로, 분산 각도의 범위가 매우 크게 분산된 빛이 탐지기에 도달하게 됩니다. 예를 들어, 이런 시스템은 중심에서 약 60도 +/- 40도 퍼진 큰 원뿔에 들어 있으며 시료에 의해 분산된 모든 빛을 측정합니다. 그러나, 본 문서에 공개되었듯이, 일부 응용에 있어서, 보다 좁은 범위의 분산 각도, 예를 들어, 매우 좁은 범위의 각도(즉, 60 +/- 5도)내에서 빛을 탐지할 필요가 있습니다. 신청자들은 이 좁은 범위 내에서 광 측정을 제공하기 위해 대물 렌즈(또는 이 면과 결합하는 임의의 평면)의 푸리에(Fourier, 또는 후초점면)에 조리개(aperture)를 설치할 수 있음을 공개합니다. 푸리에 평면에서 각도 정보는 공간적으로 부호화됩니다(coded). 그러므로, 이 조리개의 모양과 크기에 따라 시료에서 특정 각도로 나오는 빛은 탐지기에 도달하지 못하도록 방지할 수 있습니다(예를 들어, 막아버리거나 필터로 차단함). 고리 모양 조리개는 내부 각도(즉, 60+/-30 도)를 막아버리거나 필터로 차단할 수 있습니다. 그러므로 결과 측정값을 원하는 각도에 맞출 수 있습니다.

[0283] 구현에서, 대물 렌즈에서 나온 빛이 탐지기에 도달하기 전에 통과하는 곳에 조리개가 제공될 수 있습니다. 구현에서, (대물 렌즈를 통과한 후에) 추가 렌즈를 통해 나온 빛이 탐지기에 도달하기 전에 통과하는 곳에 조리개가 제공될 수 있습니다. 통과하여 탐지기에 도달하는 빛을 제한하기 위해, 이런 조리개를 구성한 곳을 통과하는 빛은 조리개가 없을 때 통과하는 빛 보다 더 작은 분산 각도에서 나온 빛으로 또는 더 작은 범위의 분산 각도에서 나온 빛으로 줄어듭니다. 구현에서, 이런 조리개는 원형 구멍 같은 하나의 구멍 모양이 될 수 있습니다. 구현에서, 이런 조리개는 빛이 통과할 수 있는 등근 고리 같은 것으로, 빛이 통과하지 않는 중심 영역(예를 들어, 원형 영역)이 있는, 단일 고리 모양일 수도 있습니다. 구현에서, 이런 조리개는 빛이 통과하는 2 개, 3 개, 또는 그 이상의 동심 원형 고리들로 구성될 수 있으며, 이 원형 고리들에는 빛이 통과할 수 없는 중심 영역(예를 들어, 원형 영역)이 포함되어 있습니다. 구현에서, 이런 조리개는 원형이나 등근 고리 모양이 아닌 다른 모양이 될 수도 있습니다.

[0284] 대물부와 탐지기 사이, 즉, 추가 렌즈와 탐지기(이곳에서 빛은 추가 렌즈를 통과하기 전에 대물 렌즈 통과) 사이에 배치된 이런 조리개는 시료에서 분산된 빛을 더욱 선명하게 구별할 수 있는 이점을 제공하므로 시료에서 확보한 광 분산 이미지(예를 들어, 암시야 이미지)의 해상도를 향상 시킵니다. 빛 세기가 한 요인(factor)인 구현에서, 여기에 공개된 조리개가 없는 구성과 비교할 때, 여기에 공개된 조리개가 있는 구현에서 적용된 빛의 세기(예를 들어, 한 광원에서 또는 다수의 광원에서)가 증가할 수 있습니다.

[0285] 한 시스템에는 본 문서에 설명 및 기술된 기능이 있는 시료 홀더가 포함되어 있습니다. 이 시료 홀더에는 광원, 색선판 거울, 및 그림 7A에 표시된 기타 소자(elements)가 포함되어 있습니다. 그림 7B에 표시된 것처럼, (예를 들어, 그림 7A와 본 문서의 다른 그림에 있는 것과 비슷한) 유사한 기능이 있는 시스템에는 시료 홀더 600, 광원 650(예를 들어, 광원 654, 또는 여기 광원 680, 또는 둘 모두), 대물 렌즈 670, 조리개 694, 추가 렌즈 696, 및 푸리에 렌즈 698이 포함될 수 있습니다. 조리개 694에는 빛이 탐지기 700으로 도달하기 위해 통과하는 단일 통로(광로)가 있을 수 있습니다. 탐지기 700은 (예를 들어, 프로그램 가능 프로세서) 프로세서 710에 연결되어 작동할 수도 있습니다. 구현에서, 조리개 694에는 빛이 탐지기 700에 도달할 때 통과하는 2 개의 통로가 있을 수 있습니다. 구현에서, 조리개 694에는 빛이 탐지기 700에 도달할 때 통과하는 3 개의 통로가 있을 수 있습니다. 구현에서, 조리개 694에는 빛이 탐지기 700에 도달할 때 통과하는 4 개, 또는 그 이상의 통로가 있을 수 있습니다. 구현에서, 조리개 694의 한 통로에는 빛이 탐지기 700에 도달할 때 통과하는 원형 구멍이 있을 수 있습니다. 구현에서, 조리개 694의 한 통로에는 빛이 탐지기 700에 도달할 때 통과하는 2 개, 3 개, 4 개, 또

는 그 이상의 원형 구멍이 있을 수 있습니다. 구현에서, 조리개 694의 한 통로에는 빛이 탐지기 700에 도달하도록 빛의 통과를 허용 해주는 원형 고리가 있으며, 이 원형 고리에는 빛이 탐지기 700에 도달하지 못하도록 해주는 중심 부분이 포함되어 있을 수 있습니다. 구현에서, 조리개의 한 통로에는 2 개 또는 그 이상의 원형 고리(예를 들어, 구현에서, 동심 원형 고리)가 있을 수 있습니다. 이 원형 고리 각각은 빛이 탐지기에 도달할 수 있도록 빛의 통과를 허용하도록 구성되어 있습니다. 이런 조리개 694에는 빛이 탐지기 700에 도달하지 못하도록 빛의 통과를 허용하지 않는 중심 부분이 포함되어 있을 수 있습니다. 이런 원형 고리 또는 원형 고리들에는 원형, 또는 타원형, 또는 기타 고리 모양일 수도 있습니다.

[0286] 따라서, 신청자들은 시료의 이미지를 확보하기 위한 시스템을 공개합니다. 이 시스템은 다음과 같이 구성되어 있습니다: 시료 홀더, 해당 시료 홀더 내에 고정된 대상물에 조명을 공급하기 위한 광원, 해당 시료 홀더 내에 고정된 대상물에서 분산된 빛을 수집하고 초점을 맞추도록 구성된 대물 렌즈, 여기에서 언급된 분산된 빛에는 다수의 분산 각도에서 분산된 빛이 포함되고, 해당 대물 렌즈에서 빛이 통과하도록 하기 위한 광학적 조리개, 및 해당 대물 렌즈에서의 빛을 해당 광학적 조리개에 초점을 맞추도록 구성된 추가 렌즈, 여기에서 언급된 광학적 조리개는 해당 대물 렌즈에 의해 초점이 형성된 빛이 해당 조리개를 통과하도록 구성되어 있고, 여기에서 해당 조리개를 통과하도록 허용된 빛의 해당 부분은 해당 다수의 분산 각도의 부분에서만 분산된 빛으로 이루어져 있습니다.

[0287] 여기에서 사용된 "에피(epi)"와 "에피조명(epi-illumination)"은 시료를 관찰하거나 시료의 이미지를 확보하는데 사용된 대물부 또는 기타 광학적 소자에서 일반적으로 멀어지는 방향으로 이동하는 빛으로 시료를 조명하는 것을 말합니다. 그러므로, 형광 발광이 없을 경우, 에피조명으로 조명된 시료의 이미지는 시료에서 반사되었거나 분산된 빛을 사용하여 형성되었습니다(빛은 광원에서 시료로 이동하고 시료에서 다시 반사 또는 분산된 후에, 관찰, 이미지 확보, 또는 측정용 광학 소자로 이동합니다). 본 문서에서 사용된 "트랜스(trans)" 또는 "트랜스조명(trans-illumination)"은 대상물을 관찰 또는 대상물의 이미지를 확보하는 데 사용된 대물부 또는 기타 광학적 소자의 방향으로 이동하는 빛을 사용하여 시료를 조명하는 것을 말합니다(빛은 광원에서 시료로 이동한 후에, 관찰, 이미지 확보, 또는 측정용 광학적 소자에 도달합니다). 그러므로, 형광 발광이 없을 경우, 트랜스조명으로 조명된 시료의 이미지는 시료를 통과하거나 시료에 의해 분산된 빛을 사용하여 형성됩니다.

[0288] 여기에서 광원은 시료를 관찰하거나 시료의 이미지를 확보하는 데 사용된 대물부 또는 기타 광학적 소자처럼, 시료와 동일한 쪽에 배치되고, 광원에서 나온 빛은 시료로 직접 이동하고, 시료는 일반적으로 에피조명을 사용하여 관찰 및 이미지 확보됩니다. 그러나, 하나의 단독 광원이 대물부 또는 광학적 소자처럼 시료와 동일한 쪽에 배치되어도, 본 문서에 공개된 시료 홀더는 시료에 에피조명 외에도 트랜스조명을 제공할 수 있습니다. 그러므로, 시료의 양쪽에 광원을 배치하지 않아도 양 방향 조명 모두를 사용할 수 있습니다. 이런 구성은 광원과 기타 광학적 소자들이 시료 홀더의 한 쪽에만 배치되므로 많은 공간이 필요하지 않으며 자원을 절약할 수 있습니다. 이런 구성을 이용하면 광학적 소자에 의해 방해 받지 않으면서도 시료 홀더의 다른 쪽에 방해 받지 않고 접근할 수 있습니다. 그러므로, 이런 구성을 이용하면, 광학적 이미지 확보 및 측정, 또는 광학적 이미지 확보 및 측정에 사용되는 장치나 소자에 의해 방해 받지 않으면서도 시료 홀더 속에서 시료와 시약을 적재, 혼합, 및 제거할 수 있는 이점을 누릴 수 있습니다.

[0289] 그럼 4A와 4B의 이미지에서 표시된 것처럼, 암시야 이미지에 트랜스조명을 추가하면 이미지 품질을 크게 향상시키고 이미지에서 얻을 수 있는 정보의 양이 크게 증가됩니다. 본 문서에 공개된 방법과 시스템은 에피조명과 트랜스조명 모두를 결합하고 단일 방향으로부터의 조명을 사용하고, 구현에서, 단 하나의 단일 광원을 사용하기 때문에, 이미지의 품질을 크게 향상시킵니다.

[0290] 본 문서에 공개된 것처럼, 큐벳 600(예를 들어, 그림 8A - 8D에 표시된 것처럼) 같은 시료 홀더는 광원(PIR 또는 TIR 관계 없음)으로부터의 내부 반사를 허용하도록 구성되어 있고, 큐벳 600의 분석 영역 608에 보관된 시료는 직접 광(에피조명, 예를 들어, 광로 830을 따라 이동하는 빛)으로 조명되고 간접 반사 광(트랜스조명, 예를 들어, 광로 820 또는 825를 따라 이동하는 빛)에 의해서도 조명됩니다. 본 문서에 공개된 것처럼, 광학적 소자 670, 690, 700, 등등처럼 큐벳 600의 같은 쪽에 배치된 광원에서 나온 빛은 시료에 대해 에피조명과 트랜스조명 모두를 제공할 수 있습니다.

[0291] 이제 그림 8A - 8D를 참조하면서, 아직 추가적인 구현을 설명합니다. 그림 8A - 8D에는 큐벳 600의 일부분의 도식적 단면도가 표시되어 있고, 그림 6A와 6B에 표시된 환형광 650 같은, 그러나 이것에만 제한되지 않으며, 암시야 분산 조명 광원이 표시되어 있습니다. 베이스 지지대 620도 그림 8A - 8D에 표시되어 있습니다. 그림 8A - 8D에서 구조물과 구조물의 부분을 가리키기 위해 중괄호와 화살표가 사용되었습니다. 예를 들어, 중괄호 600

은 그림에 표시된 큐벳 600 전체를 가리킵니다. 중괄호 612는 큐벳 600의 커버 부분 612를 가리킵니다. 그럼 8A에서 화살표 621 ~ 626은 커버 부분 612의 표시된 부분에 대한 치수를 가리킵니다. 이런 치수는 큐벳 600의 다른 구현에서 다를 수 있으므로 이런 변경 사항은 큐벳 600의 제작 및 사용에 관련된, 크기, 응용, 재질, 광학적 파장, 시료, 및 기타 요소와 요인에 의해 달라질 수 있음을 이해해야 합니다. 예를 들어, 구현에서, 지지 구조물 604 사이의 거리 621은 약 0.1 밀리미터(mm) ~ 약 1 센티미터(cm) 사이이고, 구현에서 약 1 mm ~ 약 100 mm 사이, 약 1.5 mm ~ 약 50 mm 사이, 또는 약 2 mm ~ 약 20 mm 사이가 될 수 있습니다. 추가 구현에서, 지지 구조물 604 사이의 거리 621은 약 0.5 mm ~ 약 10 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 5 mm 사이가 될 수 있습니다. 구현에서, 지지 구조물 604의 높이 622는 약 0.1 mm ~ 약 100 mm 사이, 0.5 mm ~ 50 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 약 25 mm 사이가 될 수 있습니다. 추가 구현에서, 지지 구조물 604의 높이 622는 약 0.1 mm ~ 약 10 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 약 5 mm 사이가 될 수 있습니다. 마찬가지로, 구현에서, 통제 두께 영역 613의 높이 623은 약 0.1 mm ~ 100 mm 사이, 약 0.5 mm ~ 50 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 25 mm 사이가 될 수 있습니다. 추가 구현에서, 통제 두께 영역 613의 높이 623은 약 0.1 mm ~ 약 10 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 약 5 mm 사이가 될 수 있습니다. 구현에서, 레이어 800의 두께 624는 약 0.01 mm ~ 약 10 mm 사이, 약 0.05 mm ~ 약 1 mm 사이, 또는 약 0.1 mm ~ 0.5 mm 사이가 될 수 있습니다. 구현에서, 분석 영역 608의 너비 625는 약 0.05 mm ~ 약 100 mm 사이, 약 0.5 mm ~ 약 50 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 약 25 mm 사이가 될 수 있습니다. 추가 구현에서, 분석 영역 608의 너비 625는 약 0.1 mm ~ 약 10 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 약 5 mm 사이가 될 수 있습니다. 구현에서, 지지 구조물 604의 너비 626은 약 0.1 mm ~ 약 100 mm 사이, 약 0.5 mm ~ 약 50 mm 사이, 또는 약 1 mm ~ 약 25 mm 사이가 될 수 있습니다. 추가 구현에서, 지지 구조물 604의 너비 626은 약 0.05 mm ~ 약 10 mm 사이, 또는 약 0.5 mm ~ 약 5 mm 사이가 될 수 있습니다.

[0292]

본 문서에 들어 있는 임의의 한 그림에서 표시된 것처럼, 조명, 여기, 방출 관찰, 등등에 대한 광학적 부품과 준비물들은 다른 그림의 구현에서, 각 그림에서 명시적으로 표시되지 않았더라도, 적용할 수 있는 부품과 준비물을 암시할 수도 있습니다. 예를 들어, 환형광 650 또는 기타 조명 광원 650이 그림 8D, 표시된 다른 구현, 기타 구현에 포함되어 있지 않지만, 환형광 650과 기타 조명 광원 650(그림 8A, 8B, 및 8C 참조)은 분석 영역 608을 조명하는 데 사용할 수 있습니다(분석 영역 608은 그림 8A 및 8B에 표시되어 있습니다). 큐벳 600과 함께 사용하는 데 알맞은 광학적 부품의 예로, 환형광 부품 652와 654는 그림 8A, 8B, 및 8D에 표시되어 있습니다. 구현에서, 다른 부품 및 다른 개수의 조명 부품을 사용할 수도 있습니다. 예를 들어, 광원 654는 특정 파장 출력 또는 출력 범위를 갖고 있는 발광 다이오드(LED) 또는 레이저 다이오드 같은(그러나 이런 것들에만 제한되는 것은 아님) 백색광 또는 광원이 될 수 있습니다. 광학적으로, 광원 654의 고리는 빛의 고리(ring)를 제공하도록 구성된 광섬유 케이블이 될 수 있습니다(예를 들어, 많은 접합(splices)이 있음). 선택적으로, 광원 654는 반사기로 조절할 수 있는 특정 좁은 발산각(narrow divergence angle)이 있는 LED가 될 수 있습니다. 광원 선택 및 /또는 반사기 설계를 통해 환형광으로부터의 발산각을 조절할 수 있어야 합니다.

[0293]

비제한적인 예로, 광원 654는 레이저 조명을 사용하여 좁은 광 패턴을 제공할 수 있습니다. 광원이 좁은 광점(시료 분석 영역 608 내부로 조명)을 제공하고, 스펙트럼 너비가 좁은 빛을 제공하고(예를 들어, 특정 주 파장을 중심으로 좁은 범위 내에 있는 파장의 빛), 간접 광원(coherent source)이기 때문에, 이런 결과로, 현재의 에피스타일(epi-style) 조명 구성(여기에서, 조명 부품들은 모두 시료의 한 쪽에 있음)에서 낮은 트랜스조명 배경을 제공합니다. 선택적으로, 조명 광원 654로 LED를 사용하면, 작은 광점 크기(예를 들어, 분석 영역 608내에 작은 광점 크기)를 얻을 수 있고 레이저 광원의 이점을 누릴 수 있습니다. 이런 저런 이유로, 레이저 광원(또는 작은 광점을 제공하는 LED)은 다른 조명 구성과 비교하여 배경 신호를 줄이는 데 효과적입니다. 레이저 조명은, 보다 분산이 큰 광원을 사용할 때 일반적으로 발생하는 분산된 빛과 비교하여, 분산된 빛을 줄일 수 있으며, 빛을 인근 채널(예를 들어, 인근, 두 번째 분석 영역 608)로 분산되지 않도록 하고 하나의 채널(예를 들어, 첫 번째 분석 영역 608 내부로)로 제한시켜 배경을 해당 채널로 제한할 수 있습니다. 그러므로, 레이저 조명을 사용하면, 빛의 산란이 큰 광원을 사용하여 조명할 때 보다, 더 적은 트랜스조명 배경을 얻을 수 있습니다. 물론, 배경 조명이 크게 줄어 들수록 더 구별하기 좋은 신호를 얻을 수 있는 곳에서, 트랜스조명의 감소는 배경 조명의 감소보다 적은 것이 바람직합니다. 선택적으로, 조명 광원 654로써 LED를 사용하면, 배경이 크고 트랜스조명이 큰, 산란 광 패턴을 얻습니다. 물론, 트랜스조명의 증가가 배경의 증가보다 큰 것이 바람직합니다.

[0294]

일부 큐벳 구현에는 다수의 개별 층(layers)을 함께 접합하여 형성한 큐벳들이 포함됩니다. 이런 큐벳은 하나 이상의 재료를 주조하여(mold) 만든 큐벳이나 단일 또는 다수 내부 반사(예를 들어, TIR 또는 PIR을 향상하기 위함)를 향상하기 위해 큐벳의 서로 다른 표면에 반사 층을 입혀 만든 큐벳입니다.

[0295]

구현에서, 여기에 공개된 시스템, 큐벳, 및 광학적 소자는 형광 발광과 함께 작동할 수 있으며, 이런 시스템과

큐벳에 사용할 암시야 조명으로 백색광 조명을 사용하지 않는 것이 좋습니다. 그러나, 암시야 및/또는 명시야 협미경법에서 형광 탐지 기능을 사용하지 않을 경우, 일부 구현에서 백색광만 사용할 수도 있습니다.

[0296] 그럼 8A와 8B에는, 일부 구현에서, 레이어 800 같이 광학적으로 빛을 전달하지 않는 층(layers)이 들어 있는 (큐벳의) 장치를 보여줍니다. 이것은 광원 654가 분산되고 빛이 특정 위치로 향하지 않는 구현에서 유용할 수도 있습니다. 레이어 800은 원하는 각도 및/또는 위치로 큐벳 600에 들어 오지 않는 빛을 차단할 수 있습니다. 분석 영역 608 아래에 있는 영역을 통한 조명은 제외하고 다른 조명은 차단하도록 레이어 800의 위치를 지정할 수 있습니다. 분석 영역 608에 가장 가까운 곳에서 겹게 만든 특정 영역을 가질 수도 있습니다. 일부 구현에서, 둘 이상의 레이어를 겹게 만들거나 또는 빛이 전달되지 않는 재료를 사용할 수 있습니다. 서로 다른 방향으로, 하나는 가로로 하나는 세로로 또는 가로가 아니게, 겹게 만들거나 빛이 전달되지 않는 재료를 사용할 수 있습니다.

[0297] 구현에서, 레이어 800은 광학적으로 빛을 전달할 수도 있음을 이해해야 합니다. 예를 들어, 그럼 8D에는 광학적으로 빛을 전달하는 레이어 800이 들어 있는 구현이 표시되어 있습니다. 일부 구현에서, 레이어 800은 통제 두 개 영역 613 또는 베이스 지지대 620, 또는 둘 모두의 굴절률과는 다른 굴절률을 갖고 있는 광전달성 재질로 구성될 수 있습니다. 일부 구현에서, 레이어 800은 통제 두 개 영역 613 또는 베이스 지지대 620, 또는 둘 모두의 굴절률과 동일한 굴절률을 갖고 있는 광전달성 재질로 구성될 수 있습니다.

[0298] 그럼 8A, 8B, 및 8C에서, 광원은 큐벳 600 아래에 위치해 있으며 베이스 부분 606 아래에서 비추어진 빛을 제공합니다. 그럼 8D에 표시된 예에서 이런 광원이 제자리에 있는 것으로 이해해야 합니다. 이런 그림들에 표시된 것처럼, 광원 650에는 환형광 654와 도넛형(toroidal) 반사기 652가 포함될 수 있습니다. 기타 소자들에는 렌즈, 필터, 격자(gratings), 거울 및 기타 반사 표면, 광섬유, 프리즘, 이것들에만 제한되지 않고, 등등이 포함되어 있습니다. 구현에서, 광원에는 레이저, LED, 또는 기타 광원이 포함됩니다. 광원에는 한 곳에서 다른 곳으로 빛을 전달하거나 및/또는 빛을 특정 광학적 소자로 향하게 하는 광섬유가 포함될 수 있습니다. 광학적 시스템의 한 설계 기준은 광원으로부터의 빛의 발산(divergence), 또는 발산 각도입니다. 발산이 적은 너비 D의 광선(light beam)은 발산이 큰 너비 D의 광선 보다 주어진 거리에 더 작은 광점을 제공합니다. 일반적으로, 발산이 적은 빛을 제공하는 광원 650이 선호됩니다. 이런 광학적 소자와 구성은 충분히 평행한(collimated) 빛을 제공하도록 설계할 수 있습니다. 즉, 빛의 대부분 또는 전체가 시료에 대해 상당히 평행한 광로로 비춰지도록 합니다(예를 들어, 분석 영역 608 방향으로). 그러나, 확산 또는 분산된 빛이 선호되는 구현에서, 발산이 큰 광원 650을 사용할 수도 있습니다.

[0299] 그럼 8C에 표시된 것처럼, 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템의 일부로 적합한 광학 시스템의 구현에는 광학 장치(예를 들어, 광원 650, 예를 들어, 그림 8C에 표시된 것 같은 환형광, 및 대물부 670), 큐벳 600, 및 이미지 확보를 위해 큐벳을 고정 및 위치 지정하도록 구성된 베이스 지지대 620이 포함될 수도 있습니다. 그럼 8C에 표시된 구현에서, 베이스 지지대 620에는 광원 650에서 나오는 빛을 굴절하도록(또는 회절 또는 기타 광로 변경) 구성된 광학적 장치가 포함될 수도 있습니다. 그럼 8C에 표시된 구현에서, 베이스 지지대 620에는 광원 650에서 나오는 빛을 굴절하도록(또는 회절 또는 기타 광로 변경) 구성된 광학 장치가 포함될 수도 있습니다. 광학 장치 802에는 알맞은 임의의 광학 장치가 포함될 수 있음을 이해해야 합니다. 구현에서, 광학 장치 802는 렌즈릿(lenslet), 회절 격자, 또는 프리넬 렌즈(Fresnel lens), 볼록면체(convexities), 오목면체(concavities), 기타 모양, 또는 빛을 굴절, 회절 또는 기타 방식으로 (광로를) 변경하는 장치, 또는 이런 것들의 조합이 포함될 수 있습니다. 구현에서, 이런 광학 장치 802는 베이스 지지대 620과는 다른 재질로 되어 있을 수 있으며, 베이스 지지대 620과는 다른 굴절률을 갖고 있을 수 있습니다. 예를 들어, 광학 장치 802에 의해 영향을 받은 빛은 본 문서에 공개된 용도에 적합한 반사(예를 들어, 내부 반사)를 통해 직접 또는 간접적으로 분석 영역 608로 향할 수 있으며, 분석 영역 608에서 시료에 대해 에피조명과 트랜스조명 모두를 제공할 수 있습니다. 그럼 8C에 표시된 구현에서처럼, 이런 구현은 광학 장치 802를 우회하는 광로도 포함될 수 있습니다. 이런 광로는 광학 장치 802를 통해 이미지를 확보하는 데 사용하는 광로 보다 분석 영역 608 내에서 시료의 이미지를 확보하는 데 더 좋습니다. 구현에서, 광로의 두 가지 종류 모두(즉, 광학 장치 802를 우회하는 광로와 광학 장치 802를 통과하는 광로)를 동시에 제공하여, 큐벳 600에 대해 광원 650과 동일한 쪽에 있는 광원으로부터 나온 빛으로 에피조명과 트랜스조명 모두로 시료를 조명하여, 시료의 이미지 분석에 적합한 광학 장치를 제공합니다.

[0300] 큐벳 600에는 큐벳과 큐벳 내부에 들어 있는 시료를 조명하는 광로에 영향을 주는 장치(기능)가 포함되어 있습니다. 이런 트랜스조명은 큐벳 600 내부에서 반사(예를 들어, 표면 612, 표면 604, 기타 표면, 또는 표면들의 조합 등으로부터 내부 부분 반사(PIR) 또는 내부 전반사(TIR) 등을 포함한 내부 반사)되는 빛에 의해 영향을 받

을 수 있습니다. 내부 전반사(TIR)가 일어나는 광로의 기타 예는 그림 8A, 8B, 및 8D에 표시되어 있습니다.

[0301] 그림 8D에 표시된 것처럼, 구현에서, 본 문서에 공개된 장치 또는 시스템의 광학 시스템의 큐벳 600은 본 문서에 공개된 용도에 적합하며, 큐벳 600의 내부 일부를 조명(분석 영역 608과 큐벳 600의 분석 영역 608 내의 시료 조명)하는 광로에 영향을 주는 장치(또는 기능)이 포함되어 있습니다. 그림 8D에 표시된 것처럼, 레이어 800에는 분석 영역 608로 들어가는 광로를 굴절 또는 회절하거나 또는 기타 영향을 주거나 변경하는 기능이 포함될 수도 있습니다. 광로의 이런 변경은 분석 영역 608 내에서 시료의 조명에 영향을 주거나 향상시킬 수 있습니다. 그림 8에 표시된 예에서 빛은 가로 방향으로 레이어 800에 들어갑니다. 광로는 레이어 800의 모양(과 재질)에 의해 변경되고, 분석 영역 608에 원하는 방향으로 들어갑니다. 예를 들어, 레이어 800의 외부 표면은 편평(예를 들어, 외부 표면 674)하거나 곡선 모양(예를 들어, 외부 표면 676)으로 될 수도 있습니다. 예를 들어, 레이어 800의 내부 표면은 편평할 수도 있으며(그림 8D에 표시 안 됨, 그림 8A와 8B에 들어 있는 표면 참조, 그림 8A와 그림 8B에 들어 있는 레이어 800은 광학적으로 빛을 전단하지 않지만, 이런 표면은 편평한 것으로 표시되어 있음) 또는 곡선 모양으로 되어 있을 수도 있습니다(예를 들어, 그림 8D에 표시된 내부 표면 678). 구현에서, 이런 광로의 변경은 분석 영역 608에 시료의 에피조명과 트랜스조명 모두를 제공하는 데 효과적입니다.

[0302] 그림 8A, 8B, 8C, 및 8D에는 시료 홀더 내의 광로들이 표시되어 있습니다. 이 광로들은 상단 표면 614 및/또는 지지 구조물 604의 표면 618에서 커버 부분 612 내에서 TIR과 PIR의 예를 제공합니다. 큐벳 600 같은 시료 홀더에는 빛이 통과하는 광전달성 표면이 있습니다. 구현에서, 이런 광전달성 표면은 심각한 왜곡이나 빛의 세기를 줄이지 않고 빛이 통과할 수 있도록 해줍니다. 큐벳 600 같은 시료 홀더는 광전달성 재질로 만들어져 있으며, 빛이 시료 홀더 내에서 통과할 수 있도록 해줍니다. 시료 홀더가, 적어도 부분적으로, 광전달성 재질로 만들어져 있는 구현에서, 빛은 시료 홀더의 광전달성 표면을 통해 통과하고 시료 홀더 내에서 이동할 수 있습니다. 구현에서, 시료 홀더 내에서 이동하는 빛은 하나 이상의 표면에서 반사될 수 있으며, 시료 홀더 내에서 반사 광로를 따라 이동합니다. 시료 홀더 외부에 배치된 광원에서 나온 빛이 시료 홀더의 광전달성 표면을 통해 시료 홀더로 들어갈 때, 이런 빛은, 광원에서 멀리, 시료 홀더 내에서 이동할 수 있으며 시료 홀더의 표면에서 반사될 수 있습니다. 이렇게 반사된 빛은 반사된 후에 광원 방향으로 이동할 수 있습니다. 이런 반사는 PIR 또는 TIR이 될 수 있습니다.

[0303] 즉, 큐벳 600 내에서 통과하는 빛은 표면(예를 들어, 표면 614 또는 표면 618)에서 반사될 수 있습니다. 이런 내부 반사는 간접 광으로 분석 영역 608 내에서 시료를 조명하는 데 효과적입니다. 직접 조명(빛이 시료에 닿기 전에 반사되지 않음)과 조합하여, 시료는 이런 방식으로 에피조명(광학적 탐지 소자와 동일한 쪽에 나오는 조명)과 트랜스조명(광학적 탐지 소자의 반대쪽에서 나오는 조명)을 받을 수 있습니다.

[0304] 내부 부분 반사(PIR)를 촉진 또는 향상시키는 빛의 파장, 재질, 표면, 및 구성은 내부 전반사(TIR)를 촉진 또는 향상시키는 데 적합하지 않거나 효과적이지 않음을 이해해야 합니다. 내부 전반사(TIR)를 촉진 또는 향상시키는 빛의 파장, 재질, 표면, 및 구성은 내부 부분 반사(PIR)를 촉진 또는 향상시키는 데 적합하지 않거나 효과적이지 않음을 이해해야 합니다. 그러므로, PIR 또는 TIR 중에 하나를, 다른 것이 없는 상태에서, 촉진하는 설계 또는 제작이 있을 수 있습니다. 구현에서, PIR과 TIR 모두를 촉진하는 설계와 제작이 있을 수 있습니다. 구현에서, PIR과 TIR 모두를 촉진하지 않는 설계와 제작이 있을 수 있습니다.

[0305] 그림 8A에 설명 되었듯이 지지 구조물 604는 직사각형 단면으로 되어 있거나 정사각형 단면으로 되어 있을 수 있습니다. 지지 구조물 604는 정사각형 또는 직사각형 단면이 아닌 다른 단면 모양으로 되어 있을 수 있음을 이해해야 합니다. 예를 들어, 그림 8B에 표시된 것처럼, 지지 구조물 604는 삼각형 단면 모양으로 되어 있습니다. 다른 단면 모양(예를 들어, 등글거나 반원)도 본 문서에 공개된 시스템에 사용하는 데 적합할 수 있습니다. PIR 및 TIR은 큐벳 600에 사용한 재질, 코딩, 피복, 적용 덜개, 및 큐벳 600의 통제 두께 영역 613의 기하적 형상 및/또는 두께를 기반으로 선택할 수 있는, 조정 가능한 기능이 있습니다. 구현에서, PIR을 선호할 수도 있으며, PIR를 향상시키기 위해 빛, 재질, 및 구성을 선택할 수도 있습니다.

[0306] 구현에서, TIR을 선호할 수도 있습니다. 구현에서, 광원 650에서 나온 파장 또는 파장들을 선택하여 TIR를 향상시킬 수 있습니다. 구현에서, TIR을 향상시키기 위해 큐벳 600의 재질, 두께, 표면 구성, 및 기타 장치(또는 기능)를 선택할 수도 있습니다. 예를 들어, 통제 두께 613의 높이(레이어 800과 접하는 커버 부분 612의 바닥에서 측정한 높이)는 TIR에 의해 반사되어 분석 영역 608에 도달하는 빛의 각도와 세기에 영향을 줍니다. 큐벳 내에서 빛의 내부 전반사(TIR)가 일어나도록 하여 시료에 대해 기울어진 각도로 조명할 수 있는, 큐벳 600에 대한 구성은 특히 암시야 현미경법에 대해 바람직합니다. 일부 구현에서, 시료 위에서부터 TIR을 최대화하는 것이 바람직합니다. 선택적으로, 일부 구현에서, 큐벳 600은 분석 영역 608 위에 있는 표면으로부터만 TIR을 제공하도록

록 구성할 수도 있습니다. 선택적으로, 일부 구현은 통제 두께 영역 613 위에 있는 표면(예를 들어, 그림 8A와 8B에 표시된 구현에서, 일반적으로 분석 영역 608 위에 있는 표면)으로부터만 TIR을 제공하도록 구성할 수도 있습니다. 선택적으로, 일부 구현에서, 큐벳 600의 다른 표면으로부터의 빛이 내부 전반사(TIR)되도록 큐벳 600을 구성할 수도 있습니다. 예를 들어, 큐벳 600에 있는 다른 표면으로부터의 빛이 내부 전반사(TIR)되도록 하여, 빛이 기울어진 각도로 분산되도록 하면, 빛이 분석 영역 608로 다시 향하도록 하는 데 효과적입니다.

[0307] 큐벳 600을 제작하는 데 사용된 설계와 재질을 선택하고 구성하여 빛의 내부 전반사(TIR)을 제공하도록 할 수 있습니다. 예를 들어, 일부 구현에서, 내부 전반사(TIR)을 제공하거나, 증가된 또는 향상된 내부 전반사(TIR)의 양을 제공하는 구성은 다음을 포함하나, 이것들에만 제한되지는 않습니다: 통제 두께 영역 613의 치수가 내부 전반사(TIR)와 호환되거나 향상시키는 구성; 표면 614 또는 표면 618의 (예를 들어, 입사광에 대한) 각도 또는 각도들이 내부 전반사(TIR)과 호환되거나 향상시키는 구성; 표면 614 또는 표면 618의 모양, 질감(texture), 또는 코딩이 내부 전반사(TIR)과 호환되거나 향상시키는 구성; [통제 두께 영역 613를 구성하는 재료의 굴절률]과 [통제 두께 영역 613의 경계를 형성하는 표면 614와 접하는 재질 또는 공간의 굴절률] 사이에 차이가 있는 구성; [지지 구조물 604를 구성하는 재료의 굴절률]과 [지지 구조물 604의 경계를 형성하는 표면 618과 접하는 재질 또는 공간의 굴절률] 사이에 차이가 있는 구성; 및 기타 구성 및 설계. 내부 전반사(TIR)을 향상시키기 위해, 빛이 (내부적으로) 반사되는 첫 번째 재질은 내부 반사가 일어나지 않을 경우에 빛이 통과하게 되는 두 번째 재질의 굴절률보다 더 큰 굴절률을 갖고 있어야 합니다. 일반적으로 두 번째 재질은 공기이고, 공기의 굴절률은 1에 가깝기 때문에, 이렇게 하는 데는 별로 어렵지 않습니다. 내부 전반사(TIR)가 일어나도록 하려면 입사각이 임계각보다 더 커야 합니다. 예를 들어, 그림 8에 표시된 구현을 참조하면서, 통제 두께 영역 613과 구조물 604(예를 들어, 표면 614와 618의 외부 영역)를 구성하는 재질은 공기의 굴절률보다 더 큰 굴절률을 갖고 있어야 합니다. 레이어 800 내에서 내부 전반사(TIR)가 필요한 구현에서, 그림 8A, 8B, 및 8D에서 표시된 벽에서 내부 전반사(TIR)가 일어나도록 하려면, 레이어 800의 재질은 통제 두께 영역 613의 굴절률보다 더 낮은 굴절률을 갖고 있어야 합니다. 다른 대체 구현에서, 레이어 800의 재질은 통제 두께 영역 613의 재질의 굴절률보다 더 큰 굴절률을 갖고 있어야 합니다. 이렇게 하면 해당 경계 지점(레이어 800과 통제 두께 영역 613 사이)에서 내부 전반사(TIR)가 발생하므로 각도와 재질을 조정하여 분석 영역 608에서 시료에 도달하는 빛의 트랜스조명 성분을 최적화하는 데 효과적입니다.

[0308] 구현에서, 표면 614 또는 618은 표면에서 (PIR 또는 TIR 관계 없이) 반사율(reflectance)에 영향을 주거나 줄이도록 코팅하거나 처리할 수 있습니다. 구현에서, 표면 밖으로 빛이 새어 나오는 것을 줄이기 위해 표면 614와 618을 코팅하거나 처리할 수 있습니다. 예를 들어, 표면 614 또는 618이 내부 전반사(TIR)와 호환되거나 내부 전반사(TIR)의 양을 향상시키는 곳에서도, 일부 빛은 표면 614 또는 618 밖으로 전달되거나 굴절될 수 있습니다. 이런 표면 614 또는 618, 또는 이런 표면의 일부 또는 일부들에 대해 빛 흡수 코팅 또는 재질을 적용하여, 큐벳 600에서 누출되는 빛의 양을 줄일 수 있습니다. 이런 코팅에는, 예를 들어, 염료, 잉크, 페인트, 표면 처리, 검정 또는 유색 테이프, 또는 기타 코팅 또는 표면 처리가 포함될 수 있습니다. 구현에서, 검정 또는 기타 빛 흡수 고체 물질을 표면 614 또는 618에 대해 또는 가까운 곳에 배치하여 광학적 흡수 표면을 제공할 수 있습니다.

[0309] 선택적으로, 일부 구현에서, 큐벳 600은 큐벳의 부분 또는 부분들에서 빛의 내부 전반사(TIR)을 제공하지 않도록(또는 소량의 TIR만 제공하도록) 또는 내부 부분반사(PIR)을 제공하지 않도록(또는 미미한 소량의 PIR만 제공하도록) 구성할 수 있습니다. 예를 들어, 일부 구현에서, 큐벳 600은 지지 구조물 604에서 빛의 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR)를 제공하지 않도록(또는 TIR 또는 PIR의 미미한 소량만 제공하도록) 구성할 수 있습니다. 선택적으로, 일부 구현에서, 큐벳 600은 표면 618에서 빛의 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR)를 제공하지 않도록(또는 TIR 또는 PIR의 미미한 소량만 제공하도록) 구성할 수 있습니다. 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR)를 제공하지 않거나 TIR 또는 PIR의 미미한 소량만 제공하는 구성은 다음을 포함하나, 이것들에만 제한되지는 않습니다: 통제 두께 영역 613의 치수가 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR)와 호환되지 않거나 향상시키지 않는 구성; 표면 614 또는 표면 618의 (예를 들어, 입사광에 대한) 각도 또는 각도들이 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR)와 호환되지 않거나 향상시키지 않는 구성; 표면 614 또는 표면 618의 모양, 질감(texture), 또는 코딩이 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR)와 호환되지 않거나 향상시키지 않는 구성; [통제 두께 영역 613를 구성하는 재료의 굴절률]과 [통제 두께 영역 613의 경계를 형성하는 표면 614와 접하는 재질 또는 공간의 굴절률] 사이의 차이가 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR)와 호환되지 않거나 향상시키지 않는 구성; [지지 구조물 604를 구성하는 재료의 굴절률]과 [지지 구조물 604의 경계를 형성하는 표면 618과 접하는 재질 또는 공간의 굴절률] 사이의 차이가 내부 전반사(TIR) 또는 내부

부 부분반사(PIR)와 호환되지 않거나 향상시키지 않는 구성; 및 기타 구성 및 설계.

[0310]

선택적으로, 일부 구현에서, 표면 614 및/또는 표면 618에 반사 물질을 배치하거나 붙일 수 있습니다. 이런 반사 물질은, 예를 들어, 은, 금, 또는 알루미늄 같은 금속이 될 수도 있습니다. 이런 반사 물질은 마그네슘, 플루오르화 칼슘(calcium fluoride), 소금, 또는 산화 금속 같은 유전체(dielectric)가 될 수도 있습니다. 또는 이런 반사 물질은 기타 반사성 물질이 될 수도 있습니다. 일반적으로, 이런 반사성 코딩은 매우 얇습니다(예를 들어, 약 0.1 micron 미만이거나 100 micron까지 두꺼울 수 있습니다). 선택적으로, 반사성 물질(예를 들어, 반사 코딩)은 표면 614에만 배치하거나 부착할 수도 있습니다. 선택적으로, 반사성 물질은 표면 618에만 배치하거나 부착할 수 있습니다. 선택적으로, 표면 618은 빛을 흡수하도록 검은색으로 처리할 수도 있습니다. 다른 구현에서, 표면 614는 빛을 흡수하도록 검은색으로 처리할 수도 있습니다. 일부 구현에서, 통제 두께 영역 613의 너비를 분석 영역 608보다 더 넓을 수도 있습니다. 레이저 조명을 사용하는 일부 구현에 대해, 레이저 조명의 초점이 충분하게 형성되어 분석 영역들 608 사이를 검은색으로 처리(blackout)할 필요가 없을 때, 레이저 800을 제거하거나 빛이 전달되도록 할 수 있습니다.

[0311]

비제한적인 예로, 내부 부분반사(PIR), 내부 전반사(TIR), 또는 둘 모두를 사용하여, 인접 영역에서 광로 820을 따라 이동하는 빛이 분석 영역 608로 향하도록 할 수 있습니다. 그럼 8A, 8B, 및 8D에 표시된 것처럼, 광로 820을 따라 이동하는 빛은 분석 영역 608 방향으로 반사되고, 광로 825를 따라 이동하는 빛은 큐벳 600 내에서 이동하여 최종적으로 분석 영역 608에 도달할 때까지 여러 번 반사됩니다. 표시된 것처럼, 그럼 8B에서 광로 820을 따라 이동하는 빛은 큐벳 600 내에서 이동하여 최종적으로 분석 영역 608에 도달할 때, 여러 번 반사됩니다. 그럼 8B에 표시된 것처럼, 이런 반사는 내부 부분반사(PIR)가 될 수도 있고 내부 전반사(TIR)가 될 수도 있습니다. 재래식 용어로 말할 때, 그럼 8A에 표시된 광로 820과 825를 따라 이동하는 빛에 의한 조명과 그림 8B에 표시된 경로 820을 따라 이동하는 빛에 의한 조명은 트랜스조명입니다. 그럼 8A와 8B에 표시된, 광로 830을 따라 이동하는 빛에 의한 조명은 환형광에서 직접 나온 빛으로 내부 전반사(TIR)에 의한 빛이 아닙니다. 이것은 에피조명입니다. 시료 아래에 위치한 광원(또는 시료의 한 쪽에만)에서 나오는 빛의 두 가지 성분 모두의 조합을 사용하면, 이를 빛 성분들 중 하나만 제공할 수 있는 광원과 비교하여 성능을 향상시킬 수 있습니다. 이것은 암시야 현미경법에서 특히 유용합니다.

[0312]

그림 8A-8D에 표시된 구현의 비제한적인 한 사용 예는 시료에 들어 있는 세포의 분산 특성을 측정하기 위한 암시야 조명입니다. 암시야 현미경법은 대조 향상 기법(contrast-enhancing technique)으로 주로 사용되는 확립된 방법입니다. 암시야 현미경법에서, 시료에 의해 분산되거나 반사된 빛만 사용하여 이미지를 확보하기 때문에 이미지의 배경은 완전히 어둡습니다. 정량적 암시야 현미경법은, 흐름세포측정기(또는 유세포 분석기, flow cytometer)에서 재래식 "측면 분산(side scatter)" 파라미터의 사용에 대해 비교 가능한 방식으로, 세포의 분산 특성을 측정하는 데 사용되지 않았습니다.

[0313]

하드웨어 관점에서, 암시야 현미경법을 위한 조명은 비스듬해야(기울어져야) 합니다. 즉, 조명 광원에서 나온 빛은 시료에 먼저 도달하지 않으면 대물부에 들어갈 수 없어야 합니다. 비제한적인 예로, 조명은 시료에 이미 존재하는 다른 형광단을 여기(excite)하지 않는 파장이라야 합니다. 선택적으로, 이 조명을 사용하면 이미지 확보를 위해 높은 개구수(NA: numerical aperture) 렌즈를 사용할 수 있습니다. 비제한적인 예로, 광학 현미경의 재래식 렌즈 크기에 대한 개구수(NA)는 최소한 약 0.3이 될 수 있습니다. 선택적으로, 개구수(NA)는 적어도 0.4입니다. 선택적으로, 개구수(NA)는 적어도 0.5입니다. 선택적으로, 일부 구현에서, 유침 대물 렌즈(oil immersion objective lens)를 사용하여 원하는 개구수(NA)를 얻을 수 있습니다. 특히, 렌즈 크기가 특정 수준 이하로 제한 될 때 이러한 합니다.

[0314]

암시야 조명을 위한 재래식 방법은, 시료가 이미지 확보 렌즈와 암시야 광원 사이에 있을 때, 트랜스조명을 사용합니다. 그러므로, 이런 재래식 장치에서, 탐지 및 조명 구성품은 시료와 동일한 위치에 있지 않습니다. 재래식 에피조명 방법(이미지 확보용 렌즈/대물부와 광원이 시료의 동일한 쪽에 있음)의 경우, 특별 제작된 대물부를 사용해야 하고 일반적으로 높은 개구수(NA) 대물부를 사용할 수 없기 때문에 전체 시스템의 성능(기능)이 제한됩니다.

[0315]

이와는 대조적으로, 본 문서에 설명된 암시야 조명 시스템의 구현은 최소한 다음과 같은 특징(장점)을 갖고 있습니다. 하드웨어적인 면에서, 그림 8A - 8D에 표시된 구현의 설계는, 암시야 조명에 사용된 환형광이 대물부처럼 시료에 대해 동일한 쪽에 있다는 점에서, "에피(epi)"입니다. 광원이 다른 쪽에 있는 대체 구현을 독자적으로 사용하거나 본 문서에 설명된 구현과 조합하여 사용할 수는 있지만, 이것은 시스템 관점에서 바람직할 수도 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 광원 654의 LEDs 및/또는 레이저들이 모두 동일 평면상에 있고 동일한 방

향을 갖도록 환형광(ringlight)이 설계되었습니다(동일한 가로 평면에 광원이 있고 빛은 위 방향으로 향함). 일부 구현에서, 시료 평면에 빛이 있으나 원뿔 모양처럼(그러나 이것에만 제한되지 않음) 평행하지 않은 방식으로 빛을 향하게 할 수도 있습니다. 일부 구현에서, 서로 다른 평면에 빛이 있을 수 있으나 동일한 방향으로 향할 수 있습니다. 일부 구현에서, 서로 다른 평면에 빛이 있으나 원뿔 모양처럼(그러나 이것에만 제한되지 않음) 평행하지 않은 방식으로 빛을 향하게 할 수도 있습니다. 일부 구현에서, 도넛형 거울 652에 의해 빛이 반사되어 기울어진 각도로 시료를 조명합니다.

[0316] 환형광의 광학적 특성과 도넛트형 반사기(toroidal reflector)외에도, 그림 8A-8D의 구현에 표시된 큐벳 600의 광학적 특성은 암시야 조명에 크게 영향을 줍니다. 이런 구현에서, 세포계산 큐벳 600은 환형광 650에서 들어오는 빛이 시료에 직접 도달하도록 설계되어 있습니다. 이것 외에도, 빛은 큐벳의 장치에 의해 시료에서 "반사"되어 "트랜스" 조명 효과를 냅니다. 이 반사는 내부 전반사(TIR) 및/또는 실제 반사에 의해 일어날 수도 있습니다.

[0317] 모든 트랜스조명 방식은 시료에서 나오는 전방 산란 빛을 측정할 수 있도록 해주지만, 에피조명 방식은 시료에서 나오는 후방 산란 빛만 측정할 수 있도록 해줍니다. 일반적으로 전방 산란 빛은 후방 산란 빛 보다 세기가 두 차례수(100배) 더 큽니다. 그러므로, 트랜스조명을 사용하면 조명 세기가 훨씬 낮고 시료에 대해 해로운 부작용을 줄일 수 있습니다.

[0318] 그림 8A의 구현에 표시된 것처럼, 환형광 650(또는 기타 조명원) 및 큐벳 600은 조정할 수 있는 시스템을 제공합니다. 이런 시스템에서, 트랜스조명과 에피조명의 세기를 조정하여 재래식 에피조명 보다 성능을 향상시킬 수 있습니다. 이와 비슷하게, 환형광 650(또는 기타 조명원) 및 큐벳 600은 그림 8B의 구현에 들어 있는 시스템을 제공합니다. 이런 시스템은 조정할 수 있으며, 트랜스조명과 에피조명의 세기를 조정하여 재래식 에피조명 보다 성능을 향상시킬 수 있습니다. 이런 조정은 재질을 선택하고(예를 들어, 재질의 광학적 특성에 따라) 큐벳의 기하학적 설계를 이용하여 내부 전반사의 각도와 정도를 조정할 수 있습니다.

[0319] 그림 8C에 표시된 것처럼, 장치 802는 입사광의 광로를 변경할 수 있으며 트랜스조명과 에피조명 모두를 향상시키는 데 사용할 수 있습니다. 그림 8D에 표시된 것처럼, 표면 674, 676, 및 678의 모양과 구성은 입사광의 광로(예를 들어, 가로 조명)를 변경하여 트랜스조명, 에피조명, 또는 둘 모두를 제공하거나 향상시킬 수 있습니다.

[0320] 그림 8E에는 시료 준비 위치에서 광학 탐지기 D 가까이에 있는 시료 관찰 위치로 큐벳 600을 이동하는 것이 도식적으로 표시되어 있습니다. 그림에 표시된 것처럼, 시료 홀더 600은 한 위치에서 탐지기 D에 또는 가까운 위치로 이동할 수 있습니다. 탐지기 D에는 큐벳 600을 수납하거나 보관하거나 배치하는 스테이지가 포함되어 있습니다. 시료는 입구 602(예를 들어, 그림 8E에 표시된 예에서 6 개의 입구 602가 표시되어 있음)를 통해 시료 홀더에 넣을 수 있으며, 그림 8E에 표시된 큐벳 600의 분석 영역 608(표시 안 됨, 예를 들어, 지지 구조물 604의 표면 내부에) 내부에서 광학적 관찰과 측정을 위해 배치할 수 있습니다. 분석 영역 608 내부에 보관된 시료를 조명할 수 있으며, 시료를 탐지기 D로 탐지할 수 있습니다. 탐지기 D는 정량적 관찰과 이미지 확보를 위해 구성할 수 있습니다. 구현에서, 탐지기 D는 정량적 관찰과 이미지 확보를 위해 구성할 수 있습니다.

[0321] 그림 8E에 표시된 탐지기 D는 세포계산 장치 또는 세포계산 모듈을 구성하거나 일부가 될 수 있습니다. 이런 세포계산 장치 또는 세포계산 모듈은 시료 분석을 위해 독립적인 장치나 모듈로 구성될 수 있습니다. 구현에서, 탐지기 D에 다른 분석 기능이나 장치가 포함될 수 있으며, 또는 탐지기 D와 동일한 하우징 내에 다른 분석 기능이나 장치를 함께 넣을 수 있으며 또는 함께 사용하도록 구성할 수 있습니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 분석용 장치는 세포계산 장치 또는 세포계산 모듈을 포함합니다. 세포계산 장치 또는 모듈은 큐벳 600에서 시료를 분석하는 데 사용하는 탐지기 D가 포함됩니다. 구현에서, 본 문서에 공개된 시료 분석용 시스템에는 이런 세포계산 장치, 세포계산 모듈, 기타 장치, 또는 큐벳 600에 들어 있는 시료를 분석하는 데 사용되는 탐지기 D의 기능 외에도, 기타 분석 기능과 장치를 제공하는, 기타 장치 또는 모듈이 포함되어 있습니다. 이런 시스템에서, 이런 다른 장치 또는 모듈을 탐지기 D와 동일한 하우징에 함께 넣을 수 있으며, 탐지기 D와 함께 사용하도록 구성할 수 있습니다. 이런 다른 분석 기능 및 장치를 시료에 적용할 수 있습니다. 예를 들어, 이런 분석 기능과 장치를 사용하여 큐벳 600에 들어 있는 시료 또는 시료의 일부를 분석할 수 있습니다. 구현에서, 이런 분석 기능 및 장치를 사용하여 큐벳 600 내에 있는 시료의 다른 부분을 분석할 수 있습니다. 예를 들어, 시료를 둘 또는 그 이상의 부분 표본으로 나눌 수 있습니다. 여기에서 한 부분 표본은 세포계산 분석을 위해 큐벳 600에 넣고, 하나 또는 그 이상의 다른 부분 표본은 세포계산 장치 또는 세포계산 모듈과 함께 또는 가까운 곳에 하우징 되어 있거나 또는 함께 작동하는 다른 장치를 사용하여 분석합니다. 그러므로, 예를 들어, 이런 세포계산 모듈을 사용하여 수행하는 분석과는 독립적으로, 시료(또는 시료의 일부)는 화학 분석 장치, 또는 핵산 분석 장치,

또는 단백질 분석 장치(예를 들어, 시료 분석을 위해 항체 또는 다른 특수 결합 분자를 이용하는 장치), 또는 다른 이런 장치 또는 장치와 기능의 조합으로 측정 및/또는 분석할 수 있습니다. 이런 분석에는 시료에 들어 있는 소분자(또는 저분자) 및 원소에 대한 분석(예를 들어, 일반 화학 장치 사용), 시료에 들어 있는 핵산 분자에 대한 분석(예를 들어, 핵산 장치 사용), 시료에 들어 있는 단백질 및/또는 항체 반응 항원(예를 들어, 효소 결합 면역 흡수 분석 검사 장치(ELISA: enzyme-linked immunosorptive assay)), 또는 이런 것들의 조합 등이 포함됩니다. 또한, 본 문서에서 설명된 것처럼, 그림 8E에 표시된 시스템에는 하나 또는 그 이상의 장치 또는 모듈에서 작동을 제어 또는 예약하기 위한 컨트롤러가 포함될 수도 있습니다.

[0322] 그림 8F에는 시스템에 대한 자세한 도식이 표시되어 있습니다. 이 시스템에는 시료 준비 위치에서 광학 탐지기 D 가까이의 시료 관찰 위치로 큐벳을 이동하기 위한 이동 장치가 들어 있습니다. 그림 8F의 구현에 표시된 이런 시스템에는 다수의 시료 분석 모듈이 포함되어 있을 수 있습니다. 이런 시료 분석 모듈들은 구현에서 독립적으로 작동하거나 함께 작동할 수도 있습니다. 그림 8F에 표시된 시스템에는 탐지기 D와 함께 단일 세포계산 장치 707이 포함되어 있습니다. 구현에서, 분석 모듈 701, 702, 703, 704, 705, 및 706 중 일부 또는 모두에 의해 분석되는 시료(또는 시료의 부분)는 탐지기 D를 사용한 관찰과 측정을 위해 세포계산기 모듈 707로 이송될 수 있습니다. 세포계산 모듈 707로 수행한 분석과는 독립적으로, 시료(또는 시료의 일부)는 화학 분석 장치 715에서 측정 및/또는 분석할 수 있습니다. 이런 화학 분석 장치 715에는 시료에 들어 있는 소분자(또는 저분자) 및 원소에 대한 분석(예를 들어, 일반 화학 장치 사용), 시료에 들어 있는 핵산 분자에 대한 분석(예를 들어, 핵산 장치 사용), 시료에 들어 있는 단백질 및/또는 항체 반응 항원(예를 들어, 효소 결합 면역 흡수 분석 검사 장치(ELISA: enzyme-linked immunosorptive assay)), 또는 이런 것들의 조합 등이 포함됩니다.

[0323] 그림 8F에 표시된 시스템에는 하나 또는 그 이상의 모듈 701-707 속에 작동을 제어 및 예약하기 위한 컨트롤러가 포함되어 있을 수 있습니다. 시료는 그림 8E의 예에서 표시된 것과 같은 시스템에서 분석하기 위해 시료 홀더 또는 기타 장치에 올려 놓을 수 있습니다. 이런 시스템 및 이런 시스템의 모듈에는 시료 취급 시스템 708; 시료를 얻고 이동하고 시료를 부분표본으로 나누기 위한 피펫, 흡입식 피펫 711 및 양변위(positive displacement) 피펫 712 등이 포함되어 있으며; 원심 분리기 713; 분광 광도계 714; 화학 분석 장치 715; 광전자 증폭판(PMTs) 716; 피펫 텁 및 기타 텁 같은 소모품 및 도구를 보관하기 위한 카드리지 717; 및 기타 소자가 포함되어 있습니다. 모듈 및 기타 소자는 선반 709 또는 기타 지지대 구조물에 의해 지지됩니다. 시료, 소모품, 도구, 및 기타 소자는 모듈 내에서 이동할 수 있으며 모듈 간에 이동할 수 있습니다(예를 들어, 모듈 701-706 및 세포계산 모듈 707 사이).

[0324] 그림 8E와 8F에는 큐벳 600 같은 시료 홀더를 한 위치(예를 들어, 시료를 준비하는 위치)에서 다른 위치(예를 들어, 그림 8E와 8F에 표시된 탐지기)로 이동할 수 있는 것이 표시되어 있습니다. 큐벳 600은 탐지기 D로 액체를 방출하지 않으나, 시료 모두를 보관하는 자체 보관 장치가 있습니다. 탐지기 D에 또는 가까이에는 하나 또는 그 이상, 둘 또는 그 이상, 셋 또는 그 이상의 위치가 있으며, 이 위치에는 시료 신호 탐지를 위한 투명 인터페이스를 제공하기 위해 큐벳 600 또는 기타 시료 홀더를 장착할 수 있는 투명 표면이 있습니다. 그림 8F의 소자 및 이런 소자에 대한 추가 공개 및 이것들의 사용은 미국 특허 신청 일련 번호 13/769,779에서 찾을 수 있으며, 이 특허는 그 자체로 완전하게 참조에 의해 통합되어 있습니다.

암시야

[0325] 적어도, 본 문서의 일부 구현에서는 암시야 조명원과 큐벳이 포함되어 있습니다. 큐벳 600의 관련 기능은 큐벳 치수와 광학적 재질 및 큐벳의 기하적 형상에 대한 설계와 관련됩니다. 큐벳은 반사(예를 들어, 내부 전반사(TIR) 또는 내부 부분반사(PIR), 또는 둘 모두)를 통해 암시야 조명의 범위를 증가합니다. 한 구현에서, 시스템은 시료에 대해 암시야 트랜스조명과 암시야 에피조명을 동시에 사용할 수 있습니다.

[0326] 본 문서에 공개된 일부 구현에서, 광원 650과 결합된 큐벳 600은 에피 구성(즉, 광원과 대물부를 시료에 대해 동일한 쪽에 둠)으로 물리적 시스템을 사용하여 트랜스조명과 에피조명을 사용할 수 있도록 해줍니다. 기본적인 큐벳은 생체시료를 보관하고 가시화 하도록 설계됩니다. 구현에서, 커버 부분 612에는 특정 설계가 있을 수 있습니다. 서로 다른 재질이 서로 다른 굴절률을 갖고 있다는 것은 알려져 있습니다. 원하는 굴절률을 갖고 있는 재질을 선택하여 커버 부분 612, 베이스 지지대 620, 또는 큐벳 600의 기타 소자 및 부품, 및 관련 소자 및 성분을 제작하는 데 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 일부 구현에서, 커버 부분 612 또는 베이스 부분 620은 유리로 만들 수 있습니다. 예를 들어, 일부 구현에서, 커버 부분 612 또는 베이스 부분 620은 석영으로 만들 수 있습니다. 예를 들어, 일부 구현에서, 커버 부분 612 또는 베이스 지지대 620은 아크릴 폴리머 또는 투명 폴리머(polymer)(예를 들어, 시클로올레핀(cyclo-olefin), 폴리카보네이트(polycarbonate), 폴리스티렌

(polystyrene), 폴리에틸렌(polyethylene), 폴리우레탄(polyurethane), 폴리염화비닐(polyvinyl chloride), 또는 기타 폴리머(polymer) 또는 코폴리머(co-polymer)), 또는 기타 투명 재질로 만들 수 있습니다.

[0328] 조명과 이미지 수집이 용이하도록 상단 커버 부분 612의 재질을 설계할 수 있습니다. 구현에서, 시료를 조명하기 위해, 광원 650은 환형광 650(즉, 원형)이 될 수 있으며, 광원 654를 불연속 또는 연속 패턴으로 배치할 수 있고, 빛을 시료로 향하도록 하기 위해 곡선 반사기 652를 사용할 수도 있습니다.

[0329] 암시야 현미경법에서, 시료는 기울어진 광선으로 조명됩니다. 암시야 현미경법에서, 현미경 광학 장치로 들어오는 빛은 시료에 의해 분산된 빛이며, 시료 속에 들어 있는 세포, 입자, 및 기타 대상물 및 구조물의 분산 특성을 측정할 수 있도록 해줍니다. 시료에 세포, 입자, 구조물, 또는 기타 대상물이 들어 있지 않을 경우, 암시야 이미지는 검은색입니다.

[0330] 비제한적인 현재 예에서, 반사기 652 및 환형광 650의 LED 654는 굴절된 빛이, 비특정적인(non-specific) 배경으로, 대물부에 직접 다시 들어 가는 것을 최소화 하도록 설계되어 있습니다. 시스템은 큐벳 표면에서 내부 전반사(TIR)에 의해 빛이 분석 영역 608로 다시 향하도록 설계되어 있습니다. 내부 전반사(TIR)이든 기타 반사이든, 표면에서 반사된 빛은 분석 영역 608 내의 시료를 조명하도록 방향이 지정됩니다. 분석 영역 608에 들어 있는 시료의 세포, 입자, 및 구조물은 세포 아래에서부터 나온 환형광에 의해 직접 빛을 받습니다(즉, 에피조명을 통해). 또한, 본 문서에 공개된 것처럼, 상단 표면에서 나온 (반사된) 빛도 분석 영역 608로 향하게 됩니다(즉, 트랜스조명을 통해).

[0331] 그러므로, 본 문서에 공개된 시스템과 방법에 따라, 동일한 위치에 있는 환형광 650을 사용하여, 단일 환형 광원에서 나온 빛은 두 방향(에피조명과 트랜스조명 모두)으로부터 분석 영역 608을 조명하도록 방향이 지정될 수 있습니다. 구현에서, 이 조명은 모두 기울어진 조명입니다. 큐벳 설계와 큐벳에 사용된 재질을 이용하여, 빛의 두 성분의 상대적인 세기를 조절할 수 있습니다.

[0332] 이 암시야 조명은 재래식 암시야 조명과는 다릅니다. 예를 들어, 본 문서에 공개된 구현에서, 암시야 조명은 큐벳 표면에서의 내부 전반사(TIR)에 의해 반사된 빛으로 제공됩니다. 비제한적인 예로, 일부 구현에서, 본 문서에 공개된 시스템은 커버 부분 612의 특정 표면의 뒷면에 있는 반사 레이어를 사용하여 모든 빛을 반사할 수 있습니다. 비제한적인 예로, 일부 구현에서, 본 문서에 공개된 시스템은 큐벳 600의 특정 표면의 뒷면에 있는 반사 레이어를 사용하여 모든 빛을 반사할 수 있습니다. 일부 구현에서, 완전 또는 선택적 반사 배경을 사용할 수 있습니다.

[0333] 예를 들어, 구현에서, 빛을 기울어진 각도로 향하도록 하여, 조명을 암시야 조명이 되도록 유지할 필요가 있습니다. 일부 구현에서, 광원 654는 빛을 한 각도로 향하도록 할 수 있으므로 반사기 652가 필요하지 않거나 사용하지 않을 수도 있습니다. 모든 빛이 동일 평면 상에 있고 방향이 같기 때문에 반사기 652는 광원 654를 보다 쉽게 제작할 수 있습니다. 선택적으로, 기울어진 광원 654도 반사기 대신에 또는 함께 조합하여 사용할 수 있습니다.

[0334] 조명의 트랜스조명 성분의 빛의 세기가, 예를 들어, 해당 에피조명 성분의 빛의 세기 보다 10배 더 약해도(적어도), 트랜스조명으로 인해 시료 내의 세포 또는 기타 대상물로부터 분산되는 빛의 세기는 200 배 더 강할 수도 있습니다. 즉, 특정 양의 에피조명에서 분산되는 광량은 같은 양의 트랜스조명에서 분산되는 광량과 비교할 때, 트랜스조명 때문에 분산되는 빛의 세기는 시료 내의 세포 또는 기타 대상물의 에피조명에 의해 분산되는 빛의 세기보다 200배 더 강합니다. 그러므로, 작은 양의 트랜스조명은 세포로부터의 빛 분산을 크게 향상시킵니다.

[0335] 에피조명만 사용할 경우, 대물부에서 수집되는 빛은 시료에서 반사되는 빛 뿐입니다. 그러나, 회절은 분산의 상당히 큰 성분이고 트랜스조명을 사용하면 어느 정도의 회절이 발생합니다(예를 들어, 시료에서 회절된 빛). 그러나, 에피조명으로부터 수집된 빛에는 시료에 의해 회절된 빛이 포함되지 않습니다(회절 후에 반사된 빛은 다시 광원으로 향하지 않음). 그러므로, 트랜스조명과 에피조명을 사용할 때, 대물부에서 수집된 빛에는 반사 성분, 굴절 성분, 회절 성분의 빛이 들어 있습니다. 재래식 방법은 모든 암시야 트랜스조명을 사용합니다. 시료의 양 쪽에 광학 부품을 배치해야 하기 때문에, 암시야 트랜스조명을 구성하는 데는 많은 공간이 필요합니다. 이와는 대조적으로, 본 문서에 공개된 시스템과 방법은 에피조명에 대해서만 구성된 광학 소자를 사용하여 에피조명과 트랜스조명 모드를 제공합니다. 본 문서에 공개된 구현은, 시료에 대해 에피조명과 트랜스조명 모두의 장점을 제공하면서도, 에피조명만 구성하여 공간을 절약할 수 있습니다.

[0336] 시료 홀더와 광원을 함께 설계하면, 에피조명 구성으로 시료에 대한 트랜스조명의 양을 증가시킬 수 있고, 특히

균일한 트랜스조명을 제공할 수 있습니다. 일부 구현에서, 거울로 된 표면을 사용할 수 있습니다. 일부 구현에서 내부 전반사(TIR)을 사용할 수 있습니다. 이런 구현을 세밀 조정하여 원하는 트랜스조명을 만들고, 시료에 대해 암시야 조명을 제공하기 위해, 균일한 트랜스조명이 기울어진 각도로 분석 영역 608에 들어 가도록 할 수 있습니다. 큐벳 600을 구성하여, 내부 전반사(TIR), 내부 부분반사(PIR), 또는 둘 모두 같은 반사를 사용하여, 에피조명 구성의 광원만으로 분석 영역 608에 트랜스조명을 제공할 수 있습니다. 비제한적인 한 예에서, 두꺼운 커버 부분 612를 사용하면 내부 전반사(또는 내부 부분반사, 또는 둘 모두)된 빛이 표적 영역 608로 다시 반사됩니다. 또한, 본 문서에 공개된 시스템과 방법은, 내부 전반사(또는 내부 부분반사, 또는 둘 모두)로 인해 분석 영역 608로 되돌아오는 빛을 제공할 뿐만 아니라, 분석 영역 608로 되돌아오는 균일한 빛도 제공합니다. 그림 8A, 8B, 및 8D의 구현들에는 특정 각도로 된 특정 면들이 있고, 특정 검은색 표면이 있으며, 특정 반사 표면이 있어, 빛이 분석 영역 608로 균일하게 되돌아오게 되어, 분석 영역 608에 들어 있는 시료에 대해 균일한 트랜스조명을 제공합니다. 선택적으로, 상단(그림 7A와 7B에 표시된 편평한 커버 부분 612 같은 표면(그러나 이런 것에만 제한되지는 않음), 및 선택적으로 그림 8A, 8B, 및 8C에 있는 영역 613의 상단의 선택 영역) 위에 완전 반사 표면을 올려 놓을 수 있습니다. 이와는 대조적으로, 재래식 하드웨어 내에서 이동하는 빛은 어느 정도의 내부 전반사(또는 내부 부분반사, 또는 둘 모두)를 포함하여 반사가 일어날 수도 있으나, 빛이 영역 608로 되돌아 올 수는 없습니다.

[0337] 비제한적인 예로, 본 문서에 공개된 구현에서는, 레이저 광원이 16 개나 들어 있는, 매우 복잡하고 매우 값비싼 시스템을 사용하는 대신에 기본 플랫폼으로 이미지를 확보합니다. 현재 구현에서는 집적도가 매우 높은 탐지 시스템을 이용하므로, 시료에 들어 있는 세포들과 종류들의 미세한 차이에 대해, 이미지를 확보하고 식별할 수 있습니다.

[0338] 비제한적인 한 예에서, 이런 모든 다른 종류의 정보를 조합하면 원하는 분석 목표를 달성하는 데 편리하고 효과적입니다. 여기에는 정량적 측정 및/또는 정량적 측정과 연관된 정성적 측정, 또는 정량적 측정과 연관된 이미지도 포함됩니다. 본 문서에 공개된 방법과 시스템을 사용하면, 각 채널에 하나 이상의 표적 특정 문자 표지자(즉, 정량적 정보)가 있는, 형광 발광의 서로 다른 채널을 얻을 수 있습니다. 본 문서에 공개된 방법과 시스템에는 현미경법이 포함할 수 있고 현미경법과 함께 사용할 수도 있으며, 본 문서에 공개된 구현에서, 세포 내에서 착색(염색)이 형성되는 배경(예를 들어, 염색이 세포질 내부에서 발생하는지, 염색이 표면, 핵, 또는 다른 어느 곳에 집중되었는지)을 관찰 및 측정할 수 있고, 생성된 정량적 측정으로 확보한 정성적 정보를 이미지와 연결 지을 수 있습니다. 이런 방식으로, 정량적 결과를 얻는 데 사용한 원본 이미지들의 연관성은, 정량적 측정의 결과로 추가 분석이 필요하다는 것을 알게 될 경우, 추가 분석하는 데 사용할 수 있습니다. 본 문서의 구현에서, 분석 영역 608 내에서 시료의 세포에서 염색을 통해 확보한 배경 이미지와 정보를 조사할 수 있습니다. 이런 이미지와 정보를 사용하여, 염색이, 세포 속에서, 세포질 속에서, 핵 속에서, (세포)막 속에서, 또는 기타 소기관 속에서, 또는 세포 위치에서 생성된 것인지의 여부를 판단할 수 있습니다.

[0339] 본 문서에 공개된 방법과 시스템의 일부 구현에서, 세포의 정량적 분산 특성의 조합, 세포의 모양, 및/또는 세포의 크기를 관찰 및 측정하여, 시료를 식별하고 특성화하는 데 사용할 수 있습니다. 본 문서에 공개된 방법과 시스템의 일부 구현에서, 시료 또는 시료의 일부분의 물리적 특성, 광학적 특성, 및 생물학적/생화학적 특성을 동일한 장치에서 동시에 모두 관찰 및 측정할 수 있습니다. 이런 모든 측정과 관찰은 프로그램 가능 프로세서 또는 기타 프로세싱 시스템에서 취합하고 다양한 종류의 정보를 연관 지어 분석 검사(assay)의 목적을 달성할 수 있습니다.(예를 들어, 분석 검사의 임상 목표 달성).

[0340] 재래식 장치는 한 가지 또는 기타 종류의 관찰 또는 측정에 알맞을 수도 있지만, 이런 장치는 단일 광원을 이용한 에피조명과 트랜스조명 모두에 대해서는 적합하지 않습니다. 또한, 이런 서로 다른 종류의 정보 사이에는 아무런 연관성도 없습니다. 예를 들어, 본 문서에 공개된 일부 구현에서, 정량적 측정에 사용된 이미지 정보를 검색할 수 있을 때, 이런 시스템과 방법은 조직 형태 측정(tissue morphology measurement)에 대해 사용할 수 있습니다. 선택적으로, 이 시스템은 재래식 세포학(cytology)과 비슷한 파파니콜로도말시험(또는 패p 테스트, pap smear)에 적용할 수 있습니다. 이것은 재래식 현미경법을 사용하여 수행할 수 있는 모든 것에 적용할 수 있습니다. 현재 구현의 일부의 경우, 소변에서 단지 세포뿐만 아니라 결정을 보고 분석할 수 있습니다. 그래프의 일부분에서 특정 정량적 관찰 값의 원인이 된, 뇨 시료의 무기 염료와 화학물질의 결정을 볼 수 있습니다. 또한, 혈구의 서로 다른 종류와 집단에 대한 분석을 포함하여, 혈액에 있는 세포와 입자를 보고 분석할 수 있습니다. 예를 들어, 그림 1A에서 볼 수 있는, 서로 다른 영역의 데이터가 원으로 표시되어 있습니다. 그러나 이런 것에만 제한되지는 않습니다. 특정 데이터 영역에 대한 이미지 정보를 검색하여, 그래프 또는 도표에 표시된 측정값들의 원인 세포 이미지를 추가 분석할 수 있습니다.

[0341]

본 문서의 일부 구현에서, 이미지 확보 특성과 병리학적 특성을 겸비합니다. 예를 들어, 본 문서에 공개된 광학적 소자가 들어 있는 장치 또는 시스템 내부에서 조직을 준비하고 (시스템은, 예를 들어, 시료의 광학적 및 기타 분석을 위해 하나의 모듈 구성 또는 다수의 모듈 구성이 되거나 포함할 수 있습니다), 이런 플랫폼 내부에서 이렇게 준비한 재료의 이미지를 확보합니다. 그런 다음, 이미지 또는 분석을 서버에 보내, 이미지 분석을 수행하거나, 진단하거나, 또는 디지털방식으로 병리 검사를 수행하여 병리학자가 시료를 분석할 수 있도록 해줍니다.

[0342]

본 문서에 공개된 방법, 시스템, 및 장치의 구현에는, 예를 들어, 그림 8C와 8D에 표시된 시스템과 장치가 포함되어 있습니다. 이런 구현에는 광범위한 세포계산 기능이 포함되어 있으며, 이런 기능을 시료 분석에 함께 적용할 수 있습니다. 이런 세포계산 기능에는 일반적으로 현미경에 제한되는 세포계산 이미지 분석이 포함됩니다. 생체시료에 대한 이런 현미경 이미지 확보와 이미지 분석은 본 문서에 공개된 장치, 시스템, 및 방법에 의해 제공됩니다. 또한, 본 문서에 공개된 시스템과 장치는 생체시료에 대한 분광 광도계 분석을 제공하도록 구성되어 있습니다. 이런 이미지 분석에는 암시야 분석, 명시야 분석, 및 기타 이미지 분석이 포함됩니다. 단일 광원으로부터 에피조명과 트랜스조명 모두를 적용하는, 새롭운 향상된 방법들이 공개되었습니다. 이런 방법들을 사용하면 혈액 시료의 이미지와 혈액 시료를 보다 세밀하고 정확하게 분석할 수 있습니다. 본 문서에 공개된 방법을 사용하면, 적혈구, 백혈구, 및 이런 것들의 하위 범주에 대해 개별적으로 측정할 수 있습니다. 본 문서에 공개된 이미지 분석과 분광 광도계 분석을 사용하여, 혈액 시료의 특성을 파악하는 데 유용한 서로 다른 백혈구 집단을 식별 및 수량화하고 혈액 시료의 특성을 규명하고 수많은 임상 질환을 진단할 수 있습니다. 본 문서에 공개된 장치와 시스템을 사용하여 임상 보고서를 작성할 수 있습니다. 이런 임상 보고서에 일반 화학 분석 정보, 핵산 기반 분석 정보, 항체(또는 단백질 또는 항원결정인자-epitope) 기반 분석 정보, 분광 광도계 분석 정보 등을 포함하고, 또한, 세포의 이미지와 분석한 시료의 이미지를 포함시킬 수 있습니다. 이런 정보를 생산하고, 기타 임상 정보와 함께 이미지를 포함시킬 수 있는 이런 보고서를 작성할 수 있는 능력은 혁신적으로 새롭고 예상치 못한 능력과 결과를 제공할 수 있다고 판단됩니다.

[0343]

또한, 이런 정보와 이런 보고서는 매우 짧은 시간(예를 들어, 한 시간 내에, 또는 50 분 내에, 또는 40분 내에, 또는 30 분 내에, 또는 기타 더 짧은 시간 내에) 내에 생성 및 작성할 수 있습니다. 또한, 이런 정보 및 이런 보고서는 매우 적은 시료, 예를 들어, 작은 양의 혈액 시료 또는 뇨 시료로 생성 및 작성할 수 있습니다. 이런 작은 양의 시료는 약 500 μL 이하, 또는 약 250 μL 이하, 또는 150 μL 이하, 또는 약 100 μL 이하, 또는 약 75 μL 이하, 또는 약 50 μL 이하, 또는 약 40 μL 이하, 또는 약 20 μL 이하, 또는 약 10 μL 이하, 또는 기타 작은 양(부피)이 될 수 있습니다. 시료가 혈액 시료인 구현에서, 이런 작은 시료는 평거스틱(finger-stick)으로 수집할 수도 있습니다. 일반적으로, 평거스틱으로 작은 양의 혈액만 수집합니다(예를 들어, 혈액의 양은 약 250 μL 이하, 또는 약 200 μL 이하, 또는 약 150 μL 이하, 또는 약 100 μL 이하, 또는 약 50 μL 이하, 또는 약 25 μL 이하, 또는 기타 작은 양이 될 수 있습니다).

[0344]

본 문서에 공개된 것(이미지, 분산 도표, 및 기타 광학적 정보와 이미징 정보)처럼, 세포계산(또는 세포 분석) 정보와 이미지가 들어 있는 임상 보고서에는 일반 화학 분석 정보, 핵산 기반 분석 정보, 항체(또는 단백질, 항원결정인자-epitope) 기반 분석 정보, 및 분광 광도계 분석 정보가 들어 있으며, 이런 임상 보고서에는 수많은 임상 질환에 대한 진단과 임상 질환의 특성을 규명하는 데 유용한, 광범위하고 임상적으로 풍부한 정보를 제공하고, 이전 기술에서는 찾을 수 없는 이점을 제공하는 것으로 판단됩니다. 이런 보고서는 (보건의료) 서비스 제공 현장에서 신속하게 준비할 수 있으며, 병리학자나 분석 및 해석하기 위한 다른 임상 전문가에게 신속하게 (예를 들어, 무선 전자 기기로, 일반 전화기로, 광섬유 통신, 또는 기타 통신 연결로) 전달할 수 있습니다. 전문가의 이런 분석과 해석은 신속하게 피험자를 치료하는 임상의에게 전달하거나 다시 (보건의료) 서비스 제공 현장에 전달하거나 또는 둘 모두에 전달하여 신속한 피드백(feedback)을 받을 수 있습니다. 서비스 제공 현장에서 또는 보건의료 제공 현장에서, 시료를 획득, 분석, 또는 획득하고 분석하여 얻은 정보를 바탕으로, 정보를 제공하고 이런 신속한 피드백을 받아, 시기 적절하게 치료하거나, 필요할 경우, 불필요한 치료를 방지할 수 있습니다. 이런 신속한 분석, 보고, 및 피드백으로 인해, 많은 시간이 걸리는 방법에 비교하여 수많은 장점이 있고, 시기 적절하게 치료하고 불필요한 치료를 피할 수 있으므로, 보다 효과적이고, 보다 효율적이며, 보다 저렴한 임상 서비스와 치료를 제공할 수 있습니다. 본 문서에 공개된 장치, 시스템, 및 방법으로 인해 더 이상 불필요하게 된, 이런 시간이 많이 걸리는 방법에는, 다음이 포함되나 이것들에만 국한되지는 않습니다: 피험자가 자신의 집에서부터 먼 거리에 있는, 또는 피험자를 보살피거나 치료하는 임상의로부터 먼 거리에 있는 검사실이나 병원으로 이동해야 하기 때문에, 많이 불편하고 (치료가) 지연될 수 있습니다; 시료를 수집 장소에서 시료 분석 장소까지 시료를 운반해야 하기 때문에 시료의 품질이 저하될 수 있으며 (분석 검사가) 지연될 수 있습니다; 이

런 분석(검사) 결과를 병리학자나 다른 전문의에게 전송해야 하기 때문에 지연될 수 있습니다; 전문의의 의견을 피험자의 임상의에게 전달해야 하기 때문에 지연될 수 있습니다; 전문의의 의견을 임상의에게 전달한 후에, 피험자에 대한 임상의의 진단과 치료를 전달하는 데 지연될 수 있습니다. 이런 지연과 불편함 및 시료의 품질 저하는 본 문서에 공개된 방법, 장치, 및 시스템을 사용하면 줄이거나 없앨 수 있습니다.

[0345] 본 문서에 공개된 것처럼, 그림 6A, 6B, 7, 8A, 8B, 8C, 8D, 및 기타 그림에 표시된 시스템과 장치의 구현은, 하나 또는 그 이상의 기타 시료 분석 장치와 함께 사용할 수 있도록 소형으로 제작된 것을 포함하여, 소형으로 제작된 세포계산(또는 세포 분석) 기능을 제공합니다. 신청자들은 혁신적인 장치와 시스템을 본 문서에서 공개합니다. 다른 시료 분석 기능과 함께 본 문서에서 공개된 이런 장치와 시스템에는 새로운 세포계산 기능이 포함되어 있습니다. 예를 들어, 본 문서에서 신청자들은, 일반 화학 장치로 시료 분석을 위한 장치와 시스템과 함께; 핵산 분석 장치로 시료 분석을 위한 장치와 시스템과 함께; 항체 분석 검사를 이용한 시료 분석용 장치와 시스템과 함께(예를 들어, ELISA 장치); 및 이런 것들의 조합과 함께, 본 문서에 공개된 새로운 세포계산 기능을 제공하는 장치와 시스템을 공개합니다. 그러므로, 본 문서에 공개된 시료 처리 장치는 시료에 대해 다수의 분석 검사를 수행하도록 구성할 수도 있습니다. 이런 시료는 작은 양의 시료가 될 수 있습니다.

[0346] 구현에서, 모든 시료 분석 검사 작업이나 단계는 단일 시료에 대해 수행합니다. 구현에서, 모든 시료 분석 검사 작업이나 단계는 단일 장치 또는 시스템으로 수행되며 단일 장치의 하우징 내에서 수행될 수도 있습니다. 이런 시스템과 장치에는 세포계산 기능(cytometry), 분광 광도계 분석 및 단일 장치에 들어 있는 기타 광학적 분석뿐만 아니라 이미지 분석을 제공하는 세포계산 기능이 들어 있습니다. 이런 시스템과 장치는 새롭고, 예상치 못했던 것으로 판단됩니다. 세포계산 기능(cytometry), 특히 분광 광도계 분석 및 단일 장치에 들어 있는 기타 광학적 분석뿐만 아니라 이미지 분석을 제공하는 세포계산 기능이 들어 있는 시스템과 장치를 제공한다는 것은 종래의 기술에서는 찾아볼 수 없는 이점을 제공하는 것으로 판단됩니다.

[0347] 본 문서에 공개된 것처럼, 그림 6A, 6B, 7, 8A, 8B, 8C, 8D, 및 기타 그림에 표시된 시스템과 장치의 구현은 세포계산(또는 세포 분석) 기능을 휴대용 장치 형태로 제공합니다. 여기에서, 이런 장치와 시스템은 이곳 저곳으로 쉽게 운반할 수 있는 충분히 작은 상자에 넣을 수 있습니다. 예를 들어, 이런 장치와 시스템은 보건의료 서비스 현장(예를 들어, 의사의 진료실, 병원, 임상 검사실, 또는 기타 장소)에서 사용할 수 있도록 쉽게 운반할 수 있습니다. 예를 들어, 이런 장치와 시스템은 서비스 현장(위에서 언급한 보건의료 현장 외에, 예를 들어, 약국, 슈퍼마켓, 또는 기타 소매점 또는 서비스 지점)에서 사용할 수 있도록 즉시 운반할 수 있습니다. 서비스 제공 현장에는, 예를 들어, 피험자가 서비스를 받을 수 있는 모든 장소가 될 수 있습니다(예를 들어, 검사, 감시, 치료, 진단, 지도, 시료 수집, 신원 확인, 의료 서비스, 비의료 서비스, 등등). 서비스 제공 현장은 다음을 포함하나 이것들에만 국한되지는 않습니다; 피험자의 집, 피험자의 직장, 보건 서비스 공급자의 장소(예, 의사), 병원, 응급실, 수술실, 진료소, 전문의 진료실, 검사실, 소매점(예, 약국, 소매 약국, 진료소 약국, 병원 약국, 약방, 슈퍼마켓, 식료품점 등), 교통 수단(예, 자동차, 트럭, 버스, 비행기, 오토바이, 앰뷸런스, 이동 장치, 소방차, 소방 트럭, 응급 차량, 법 집행 차량, 경찰차 또는 기타 피험자를 한 장소에서 다른 장소로 운반하는 운송 수단), 이동식 진료소, 이동 장치, 학교, 어린이집, 보안 검색 장소, 전투 장소, 보건 보조 거주지, 정부 사무실, 사무실 빌딩, 텐트, 체액 시료 수집 장소(예, 헌혈 수집 장소), 피험자가 들어 가고 싶어하는 장소의 입구 근처, 피험자가 사용하고 싶어하는 기계가 있는 장소(예, 피험자가 컴퓨터를 사용하고 싶어할 경우, 컴퓨터가 있는 곳), 시료 처리 기기가 시료를 받는 장소, 또는 본 문서의 기타 위치에서 설명된 기타 서비스 제공 현장.

0348] 난해한 세포계산 및 특수 세포계산 표지자

[0349] 수많은 재래식 고급 또는 난해한 세포계산 분석 검사의 경우, 재래식 시스템은 세포에서 대규모 표지자를 측정해야 합니다. 일반적으로, 이런 표지자들은 동시에 측정됩니다. 이 분야의 일반적인 접근법은, 예를 들어, 이런 모든 표지자들을 동시에 측정하기 위해 6 개 이상의 레이저와 18 개 이상의 PMT 튜브를 포함하여, 고성능 장치에 둑여 있었습니다. 그러나, 수많은 임상 환경에서, 다수의 표지자들을 동시에 측정할 필요는 없습니다. 수많은 임상 요구조건에서, 예를 들어, 1 개의 표지자에 대해 양성인 세포의 개수를 알고 싶어하거나, 2 또는 3 개, 또는 몇몇 개의 표지자들의 이런 조합에 대해 양성인 세포의 개수를 알고 싶어합니다. 본 문서의 일부 구현에서, 염색 체계(staining schemes)의 다수 조합을 제공합니다. 여기에서, 예를 들어, 10 개의 표지자들로 구성된 한 세트를 가질 수 있으며, 3-4 또는 5-6 개의 표지자들로 된 세트들로 조합할 수 있으며, 두 개의 표지자들을 동일한 색으로 결합하는 방식으로도 이것들을 조합할 수 있습니다. 현재 시스템의 일부 구현에서, 어느 신호가 어느 표지자로부터 나오는 것인지 파악하기 위해 이미지와 정보를 분석(de-conolute)할 수 있습니다. 이렇게 하면, 현재 시스템의 일부 구현에서, 광원의 개수, 시료 분석에 사용되는 채널의 개수, 및 기타 단순화

와 효율성 측면에서, 하드웨어 요구조건을 줄일 수 있습니다. 그러므로, 몇몇 표지자들의 서브셋트(subset)을 사용하고 또는 미리 결정된 페어링(pairing)에서 비동시적인(non-simultaneous) 방식으로 표지자들을 사용 또는 측정하면 난해한 세포계산을 하는데 유용할 수 있습니다. 예를 들어, 일부 표지자들은 "게이팅(gating)" 표지자로 간주될 수 있습니다. 이런 표지자들을 먼저 측정할 수 있습니다. 이런 초기 측정의 결과가 음성(예를 들어, 시료에 표지자들이 없거나 소량만 있음)일 경우, 다른 표지자 또는 후속 표지자를 사용하는 측정은 필요하지 않을 수도 있습니다. 구현에서, 이런 비동시(non-simultaneous) 방법과 시스템은 분석에 필요한 시료의 양을 줄일 수 있으며, 분석에 필요한 표지자의 양도 줄일 수 있습니다(예를 들어, 후속 표지자가 분석 시료의 매우 작은 부분에 대해서만 사용될 경우).

[0350] 혈액 시료 또는 높 시료 같은 시료의 세포계산 분석을 위해, 이미지 확보 기법을 사용하면, 실제 세포 개수를 얻을 수 있으므로, 이런 측정이 포함되어 있지 않는 재래식 세포계산 방식보다 더 정확할 수 있습니다. 시료에 들어 있는 세포들(및 입자 또는 구조물)의 이미징을 포함하여, 시료의 이미징은 재래식 흐름세포계산(flow cytometry)같은 다른 방법들보다 실제로 더 정확합니다. 예를 들어, 재래식 흐름세포계산 게이팅의 경우, 실제 개수를 파악할 수 없습니다. 흐름시포계산 방식의 게이팅은 주관적인 것으로 시스템마다 다를 수 있습니다. 또한, 재래식 흐름세포계산 방식은 시료에 들어 있는 세포의 이미지를 제공하지 않습니다.

[0351] 본 문서의 일부 구현에서도 게이팅을 사용하지만, 이런 게이팅은 환자의 건강을 포함하여, 그러나 이것에만 제한되지 않고, 다양한 요소를 바탕으로 알고리즘으로 결정됩니다. 분류 수단은, 환자의 건강 또는 질환 상태를 알고, 환자의 집단에 대하여 학습(trained)됩니다. 본 문서의 일부 구현에서, 환자가 비정상적일 경우 플래그(flag)를 붙여 놓거나, 재검토하기 위해 플래그를 붙입니다. 자체학습 게이팅(self-learning gating)은 환자 건강에 관련된 정보를 바탕으로 다른 게이팅의 필요성 여부를 결정합니다. 그러므로, 본 문서에 공개된 일부 구현에 대한 시료의 게이팅은 알고리즘을 사용하여 수행되며, 프로그램 가능 프로세서를 사용하여 수행될 수도 있습니다. 게이팅은 환자의 건강에 따라 달라집니다.

[0352] 이미징을 위한 방법과 시스템의 구현에서, 필요 하드웨어의 양과 복잡성을 최소화 하기를 원하며, 필요 시료의 양을 최소화 하기 위해, 가능하다면, 시료의 일부 또는 전체를 다시 사용하기를 원합니다. 그러므로, 시료의 이미징에서 더 많은 기능을 뽑아 낼수록 시료에서 더 많은 정보를 얻을 수 있고, 그리고 가능한 경우, 초소한의 시료만으로 가능할 수 있습니다. 그러므로, 최소한의 그림으로 서로 다른 세포 종류를 구별하기 위해 더 많은 정보를 얻을수록, 필요한 시료의 양을 최소한으로 줄일 수 있습니다.

[0353] 선택적으로, 비제한적인 한 예에서, 현미경 스테이지에 사용하기 위한 큐벳은 다음처럼 구성할 수 있습니다(그림 7, 8A, 및 8B에 표시된 구현과 요소 참조). 중간 채널 레이어의 중심(core)은 얇을 플라스틱 막 800으로 구성되어 있으며, 양 쪽에 감압 접착제(psa: pressure-sensitive-adhesive)가 붙어 있습니다. 한 쪽은 창-레이어 606에 접착되고 다른 쪽은 몰딩된 상단 레이어(molded-top-layer) 커버 부분 612에 접착됩니다. 중심(core)은 빛 분산(또는 산란)을 방지하고 서로 다른 액체 채널 간에 광학적 상호 간섭(optical cross-talk)을 방지하기 위해 검은색으로 되어 있으며, 압출 성형된 필름입니다. 중심 막(core membrane)의 두께는 세로와 가로 방향으로 균일해야 하며, 검은색 PET 또는 검은색HDPE(폴리에틸렌)으로 압출 성형된 필름으로 되어 있습니다. 양 쪽에 감압 접착제(psa)가 붙어 있는 하부 레이어는 액체 채널(예를 들어, 분석 영역 608) 전체가 밀착되고 균일한 치수를 유지하도록 가능한 얇은 것이 좋으며, 그러면서도, 액체 채널에 누수가 발생하지 않도록 충분히 두꺼워야 합니다. 구현에서, 이런 시료 홀더에 적합한 감압 접착제는 기본적으로 아크릴 성분으로 되어 있으며, 표면 에너지가 작은 플라스틱에 대해 높은 접착력을 갖고 있어야 합니다. 가운데 레이어에 있는 액체 채널, 포트 및 기타 정렬 장치는 레이저 절삭 또는 다이 절삭 가공을 이용하여 제작할 수 있습니다.

[0354] 이런 구현에는, 또한, 자석을 이용하여 물체를 고정하는 자석 퍽(puck) 또는 디스크, 또는 금속 퍽 또는 디스크 같은 자석 소자를 사용할 수 있으며, 이런 것들은 큐벳에 통합되어 있을 수 있습니다. 예를 들어, 이런 자석 소자는 시료 홀더 또는 큐벳의 몰딩된 상단 레이어에 포함되어 있거나 상단 레이어를 구성하고 있습니다. 자석 소자는 큐벳을 이동하는 데 사용되는 하드웨어 장치를 쉽게 구현하는 데 사용할 수 있습니다. 예를 들어, 취급 장치는 특별한 시료 취급 장치를 추가하지 않고서도 큐벳을 편리하게 이동하기 위해, 큐벳에 들어 있는 자석 장치를 이용할 수 있습니다.

[0355] 본 문서에 제시된 특정 구현을 예로 들어 본 발명에 대해 설명했지만, 이런 기술에 숙련된 사람들은, 본 발명의 정신과 적용 범위에서 크게 이탈하지 않으면서도, 절차와 계획안을 다양하게 조정, 변경, 수정, 대체, 삭제, 또는 추가할 수 있습니다. 예를 들어, 큐벳에 서로 다른 반사 표면을 만들고, 광학 장치의 광로를 따라 다른 반사 표면을 만드는 데 다양한 재질을 사용할 수 있습니다. 선택적으로, 빛의 반사가 빛의 분산(난반사)에 의해서만

발생하도록 반사 표면을 선택할 수 있습니다. 선택적으로, 빛의 반사가 빛의 정반사에 의해서만 발생하도록 반사 표면을 선택할 수 있습니다. 일부 구현의 경우, Coumans, F. A. W., van der Pol, E., & Terstappen, L. W. M. M. (2012), 이중 마이크로 렌즈 어레이를 사용한, 애피 형광 발광 현미경에서 편평한 상단 조명 프로파일 (Flat-top illumination profile in an epifluorescence microscope by dual microlens arrays)에 명시된, 편평한 상단 조명 방식을 사용할 수도 있습니다. Cytometry, 81A: 324-331. doi: 10.1002/cyto.a.22029은, 모든 용도로, 여기에 참조에 의해 완전히 통합되었습니다.

[0356] 또한, 본 문서에 제시된 농도, 양, 및 기타 수치 데이터는 범위 지정 방식으로 작성되었습니다. 이런 범위 지정 방식은 편의성과 간결성을 위한 것으로 융통성 있게 해석되어야 하며, 범위의 한계 값으로 명확하게 명시된 수치 값뿐만 아니라, 각 개별 수치 값 또는 하위 범위가 분명하게 명시된 해당 범위 내에 들어 있는 모든 개별 수치 값 또는 하위 범위로, 융통성 있게 해석해야 됨을 이해해야 합니다. 예를 들어, 약 1 nm ~ 약 200 nm 사이 범위의 크기는 분명하게 명시된 약 1 nm ~ 약 200 nm 사이 범위뿐만 아니라, 2 nm, 3 nm, 4 nm 같은 개별 크기를 포함하며, 10 nm ~ 50 nm, 20 nm ~ 100 nm, 및 기타 하위 범위를 포함한다고 해석해야 합니다.

[0357] 본 문서에 설명 또는 인용된 출판물은, 현재 (특허) 신청 접수 날짜 전에, 공개하기 위한 용도로만 제공되었습니다. 본 문서의 어떠한 내용도 특허 신청 등록(admission)으로 해석하면 안 되며, 현재 발명이 이전 발명에 의한 이런 출판물의 날짜보다 앞선다는 자격을 부여 받지는 않습니다. 또한, 제공된 출판 날짜는 실제 출판 날짜와 다를 수 있으며, 실제 출판 날짜는 개별적으로 확인 받아야 합니다. 본 문서에 언급된 모든 출판물은 참조에 의해 통합되었으며(incorporated by reference), 출판물에서 인용된 구조물 및/또는 방법을 공개하고 설명하기 위한 용도입니다. 아래에 있는 (특허) 신청은, 모든 해당 용도에 대해, 참조에 의해 통합되었습니다: 미국 특허 번호 7,888,125; 미국 특허 번호 8,007,999; 미국 특허 번호 8,088,593; 미국 특허 8,088,593; 미국 특허 8,380,541; 미국 특허 출판물 번호 US20120309636; PCT 신청 번호 PCT/US2012/057155; PCT 신청 번호 PCT/US2011/53188; PCT 신청 번호 PCT/US11/53189; 특허 신청 일련 번호 13/769,779; 미국 특허 신청 13/244,946; 미국 특허 신청 13/244,947; 미국 특허 신청 13/244,949; 미국 특허 신청 13/244,950; 미국 특허 신청 13/244,951; 미국 특허 신청 13/244,952; 미국 특허 신청 13/244,953; 미국 특허 신청 13/244,954; 미국 특허 신청 13/244,956; 미국 특허 신청 13/769,798; 미국 특허 신청 13/769,820; 미국 특허 신청 61/766,113; 미국 신청 일련 번호 61/673,245; 미국 특허 신청 61/786,351; 미국 특허 신청 61/697,797; 및 미국 특허 신청 61/733,886, 공개된 특허 및 특허 신청은 본 문서에서, 모든 목적으로, 그 자체로서 참조에 의해 완전히 통합되었습니다.

[0358] 본 (특허) 신청은 2012년 7월 25일에 접수된 미국 특허 신청 일련 번호 61/675,811 보다 우선함을 주장(청구-claim)합니다. 본 (특허) 신청은 미국 특허 신청 일련 번호 61/676,178 (2012년 7월 26일 접수); 미국 특허 신청 61/766,116 (2013년 2월 18일 접수); 및 미국 특허 신청 61/802,194 (2013년 3월 15일 접수) 보다 우선함을 주장하며, 여기에 공개된 모든 특허 신청은, 모든 용도로, 그 자체로서, 참조에 의해 완전히 통합되었습니다.

[0359] 본 문서에는 저작권 보호를 받은 내용이 들어 있습니다. 저작권 소유자(본 문서에서, 신청자-Applicant)는 특허 문서의 완전한 복사(facsimile reproduction)에 대해 반대하지 않으며, (이런 특허 문서는) 미국 특허 및 상표청(US Patent and Trademark Office)의 특허 파일이나 기록에 표시된 대로 공개된 것이나, 그렇지 않은 경우를 제외하고, 기타 모든 저작권을 소유합니다. 다음 고지 사항(notice)이 적용됩니다: Copyright 2012-2013 Theranos, Inc.

[0360] 상기 내용은 현재 발명의 선호하는 구현에 대한 완전한 설명이지만, 대양한 대체 구현, 변경 및 이와 등가물(equivalents)의 사용도 가능합니다. 그러므로, 현재 발명의 (적용) 범위는 상기 설명을 참조하여 결정하면 안되고, 대신에 첨부된 주장과 등가물(equivalents)의 완전한 범위와 함께 참조하여 결정해야 합니다. 임의의 기능(또는 장치)은, 선호 여부에 관계 없이, 다른 임의의 기능(또는 장치)과, 선호 여부와 관계 없이, 결합할 수 있습니다. 첨부된 청구항(claims)은, "뜻 합니다 또는 의미합니다(means for)"라는 문구를 사용하여 주어진 청구항에서 이런 제한사항을 명시적으로 기재하지 않은 경우, 기능식 청구항(Means-Plus-Function) 제한사항을 포함하는 것으로 해석하면 안 됩니다. 상세 설명(명세서)과 첨부된 주장에 사용된 단수형은 문맥상 별도로 명시하지 않은 경우, 복수에도 해당됩니다. 또한, 본 문서에 사용되었으며 청구항(claims) 전체에서 사용된 "내에서, 속에서, ~의(in)"라는 의미는, 문맥상 별도로 명시하지 않는 한, "~위에, ~상에, ~에 대해(on)"라는 뜻으로도 사용됩니다. 마지막으로, 본 문서의 설명에서 또는 청구항 전체에서, "및, 그리고(and)"와 "또는(or)"의 의미는 모두 접속사(또는 연결형, conjunctive) 및 비접속사(또는 비연결형, disjunctive)로 사용되었으며, 문맥상 별도로 명시하지 않은 경우, 상호 교환 가능합니다. 그러므로, "및, 그리고(and)" 또는 "또는(or)"가 사용된 문맥에서, 이런 접속사의 사용은, 문맥에서 별도로 명시하지 않는 한, "및/또는"의 의미를 배제하

지(exclude) 않습니다.

도면

도면 1a

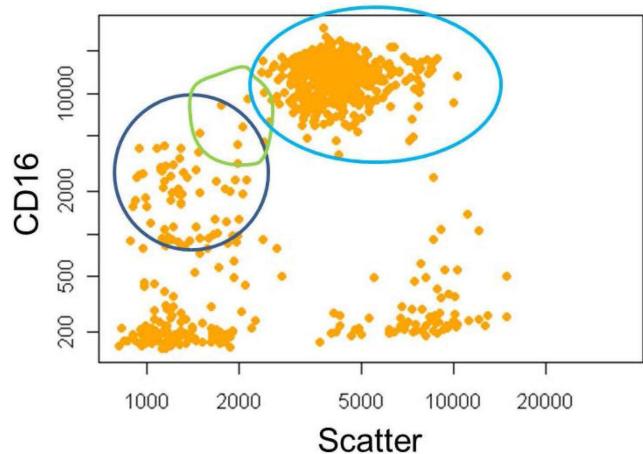


그림 1A

도면 1b

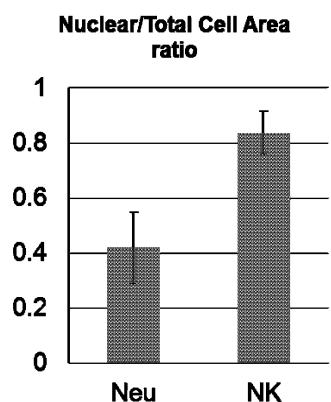


그림 1B

도면 1c

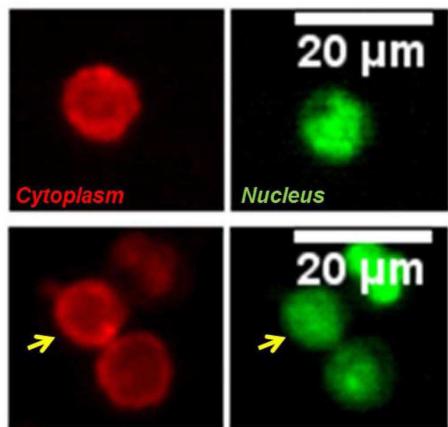


그림 1C

도면 1d

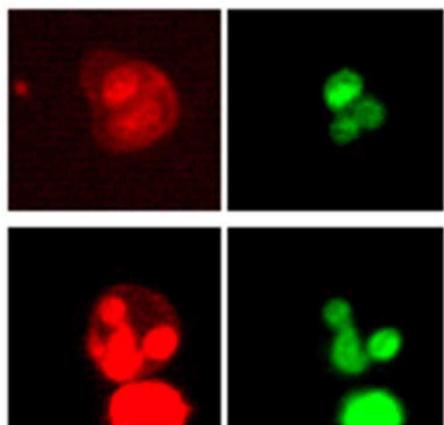


그림 1D

도면 2a

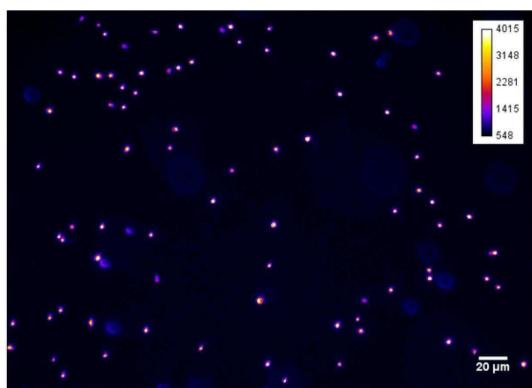


그림 2A

도면2b

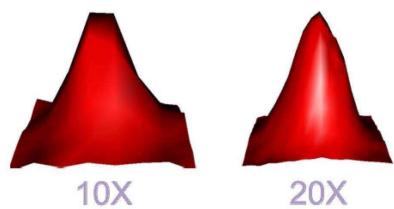


그림 2B

도면2c

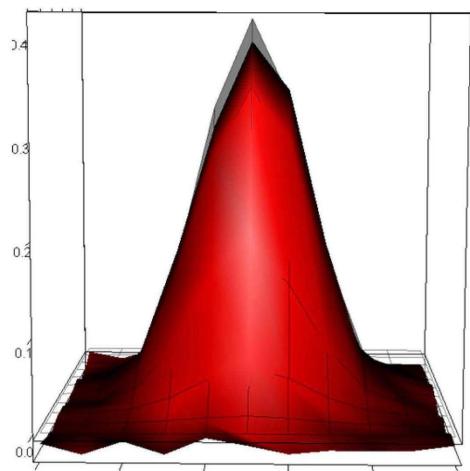


그림 2C

도면3

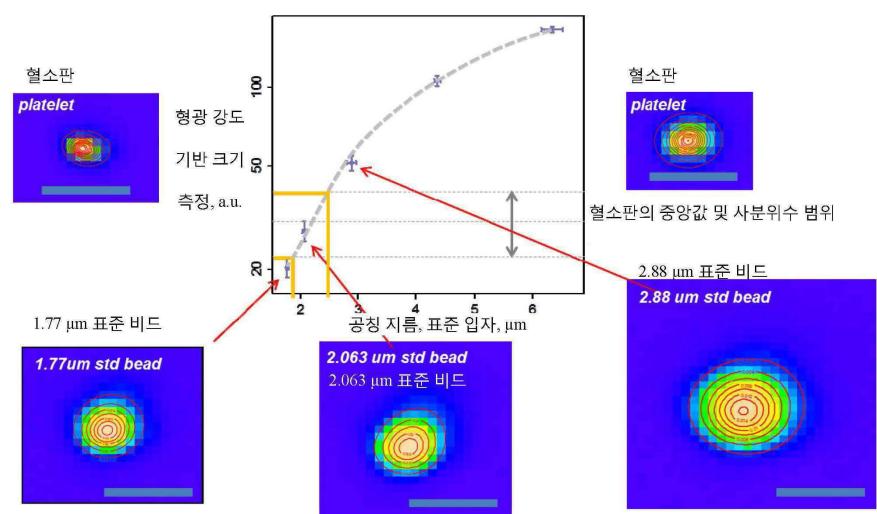


그림 3

도면4

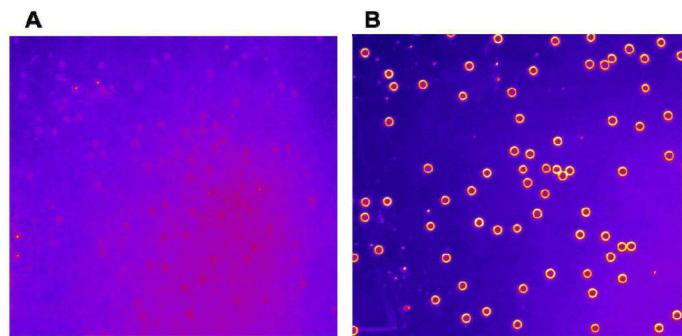


그림 4

도면5a

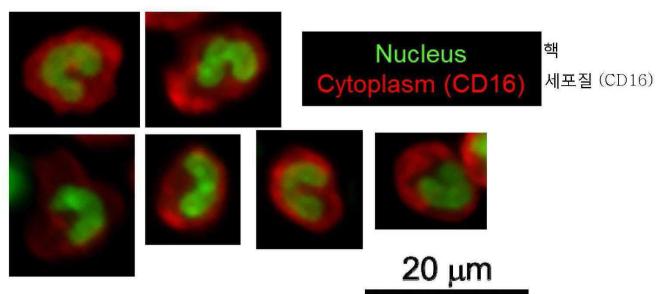


그림 5A

도면5b

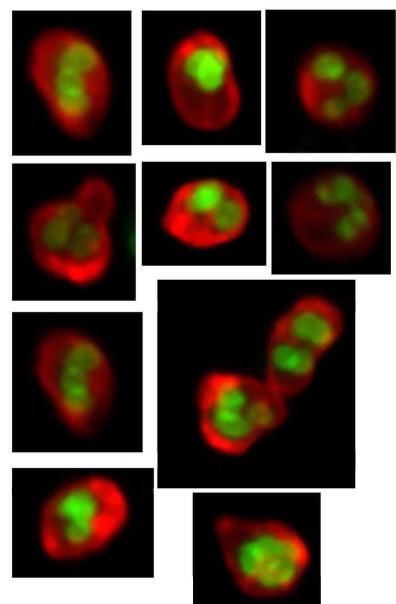


그림 5B

도면6a

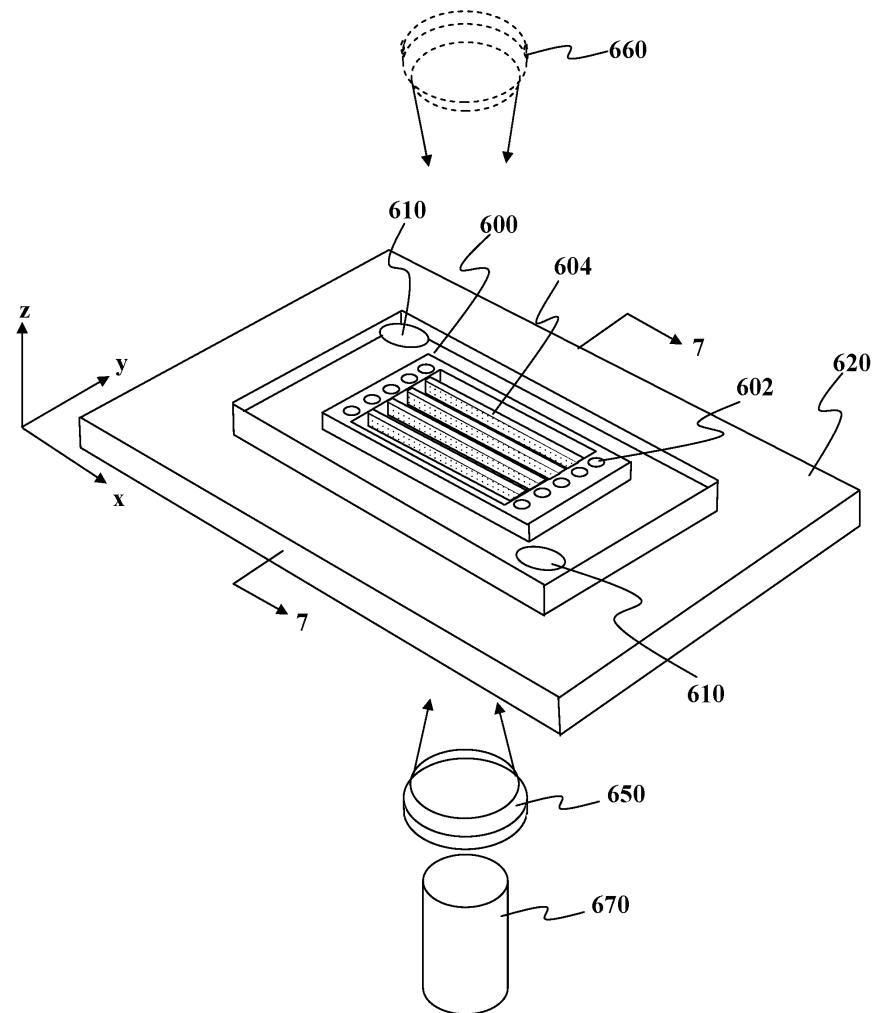


그림 6A

도면6b

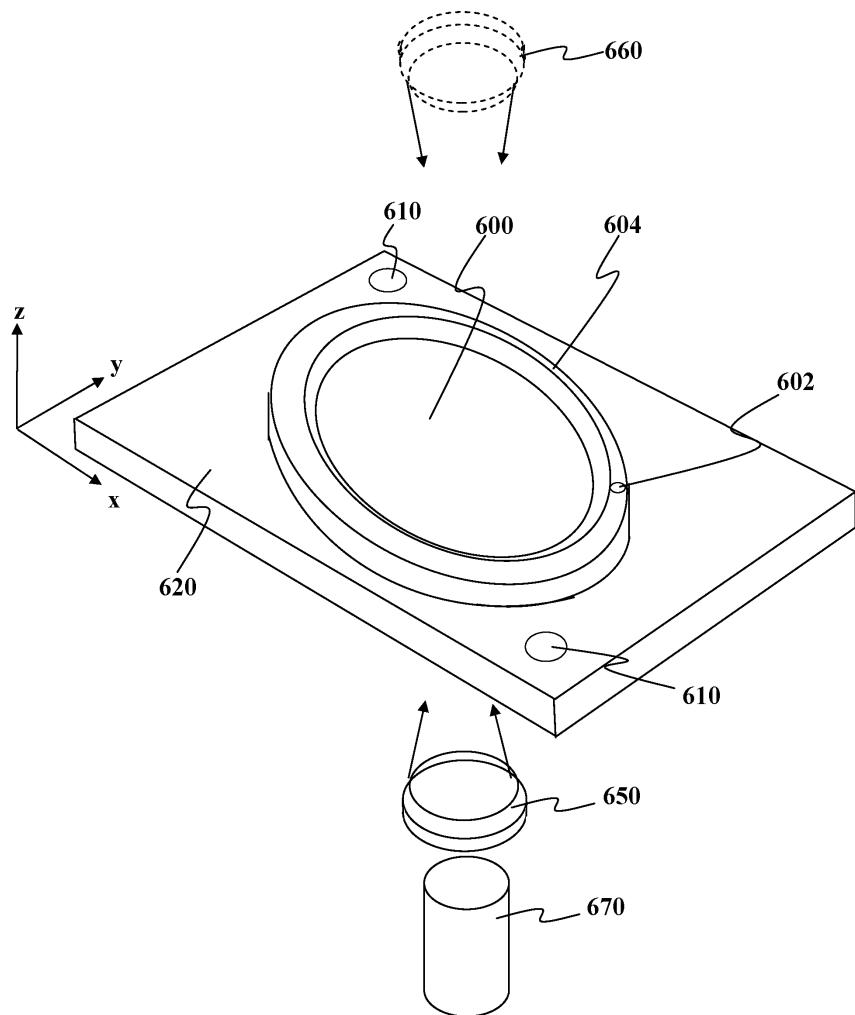


그림 6B

도면7a

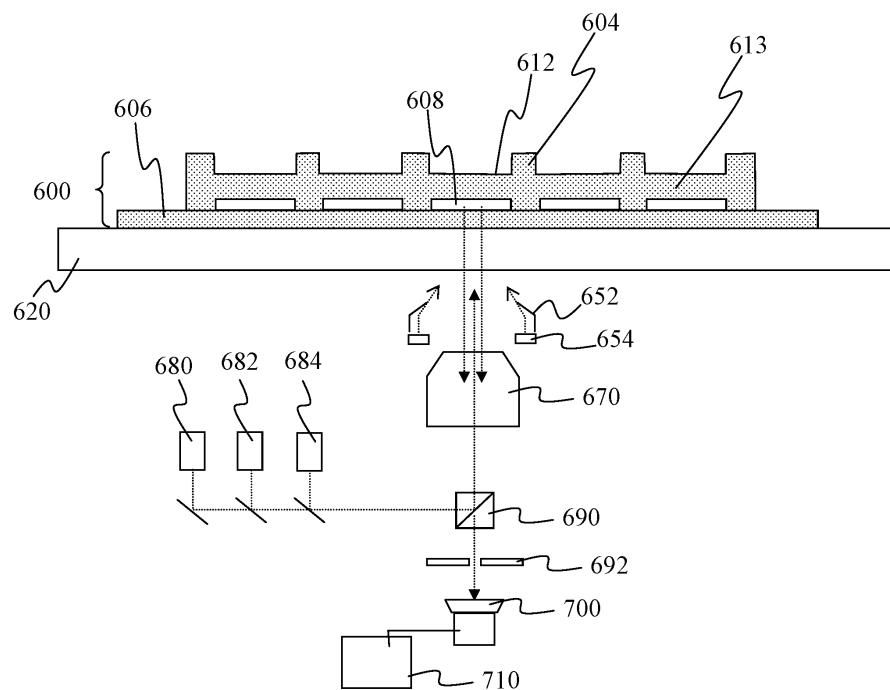


그림 7A

도면7b

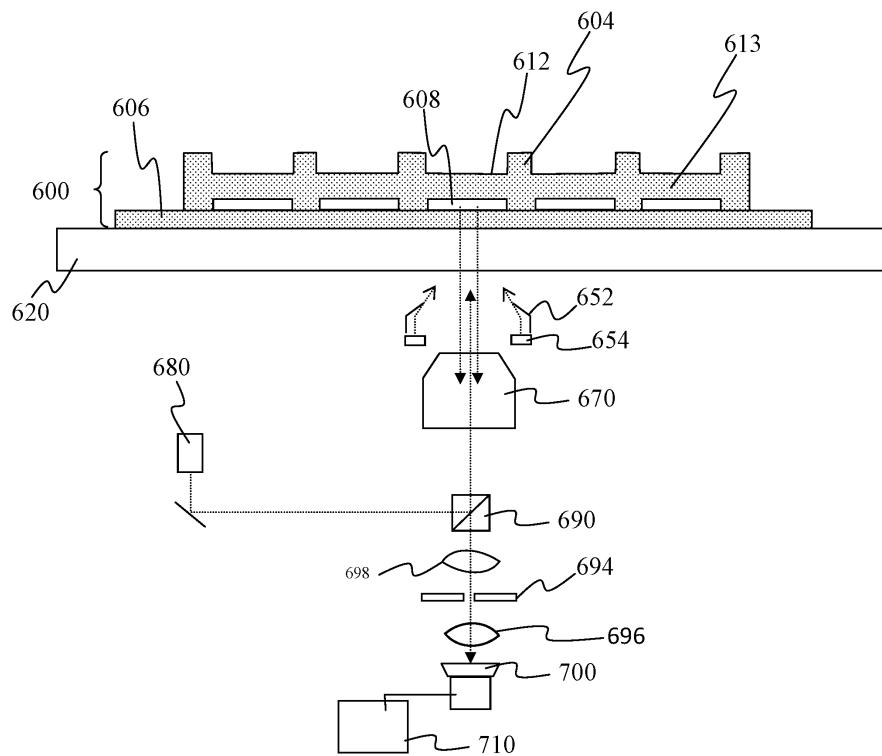


그림 7B

도면8a

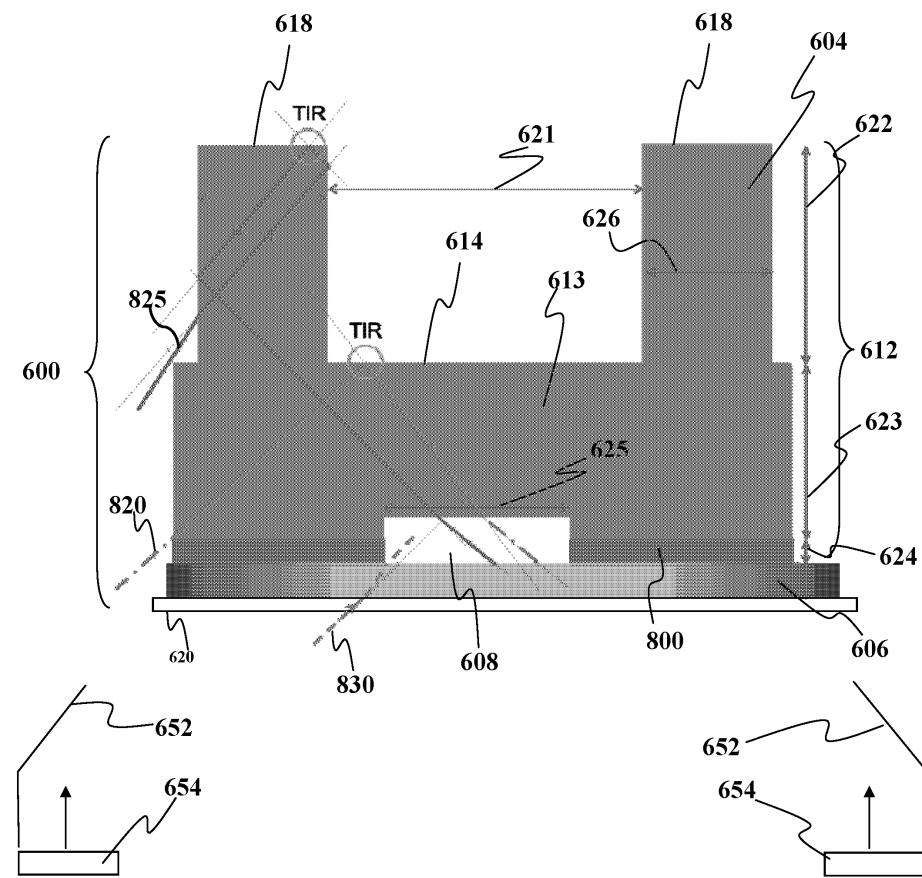


그림 8A

도면8b

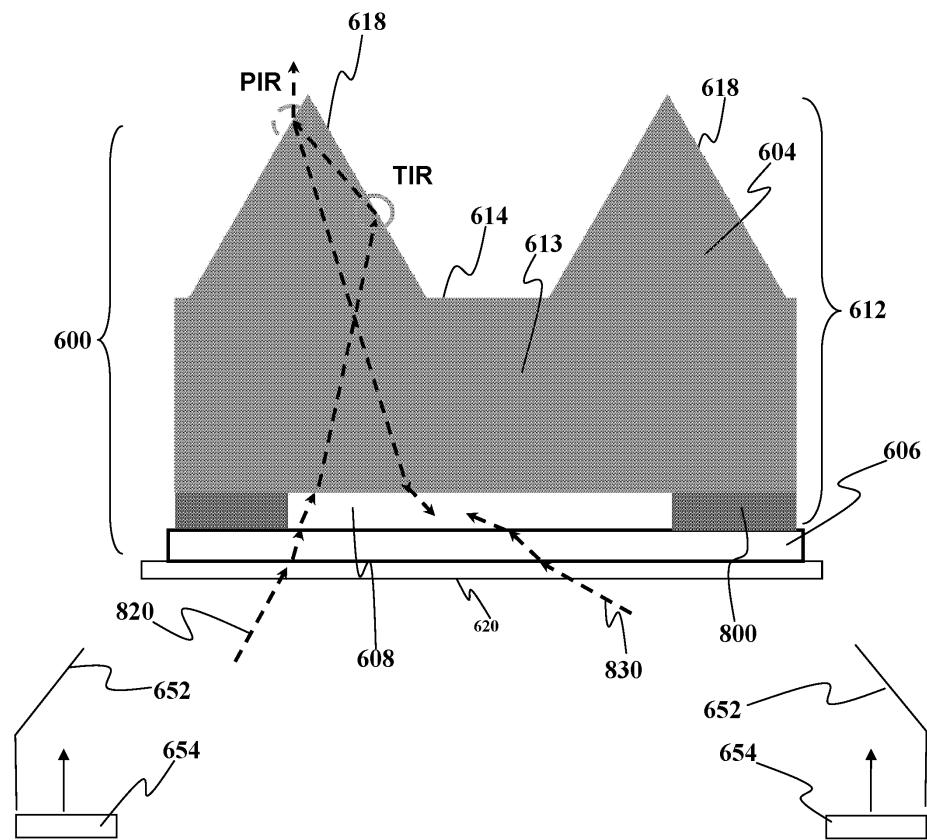


그림 8B

도면8c

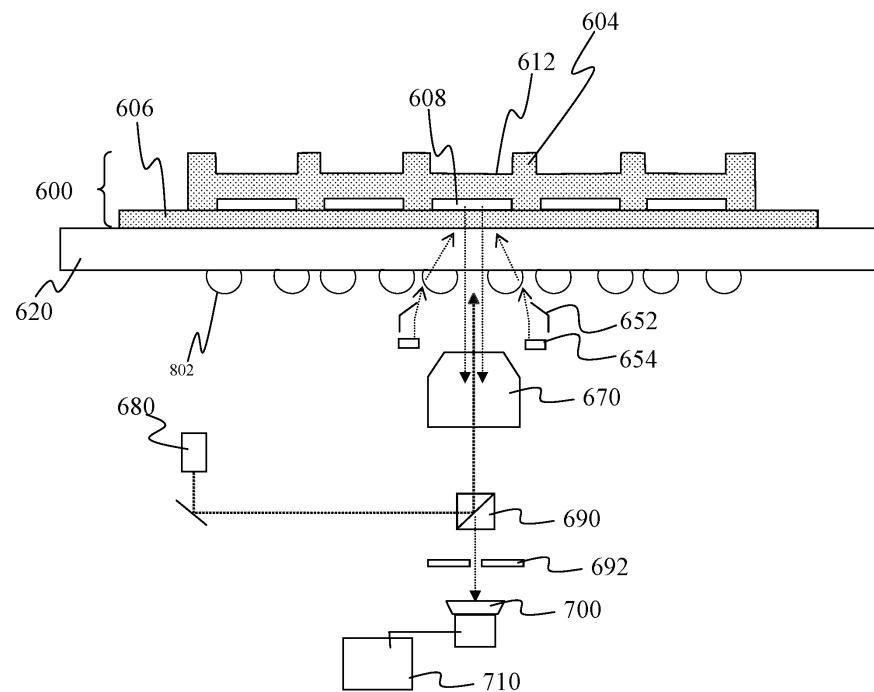


그림 8C

도면8d

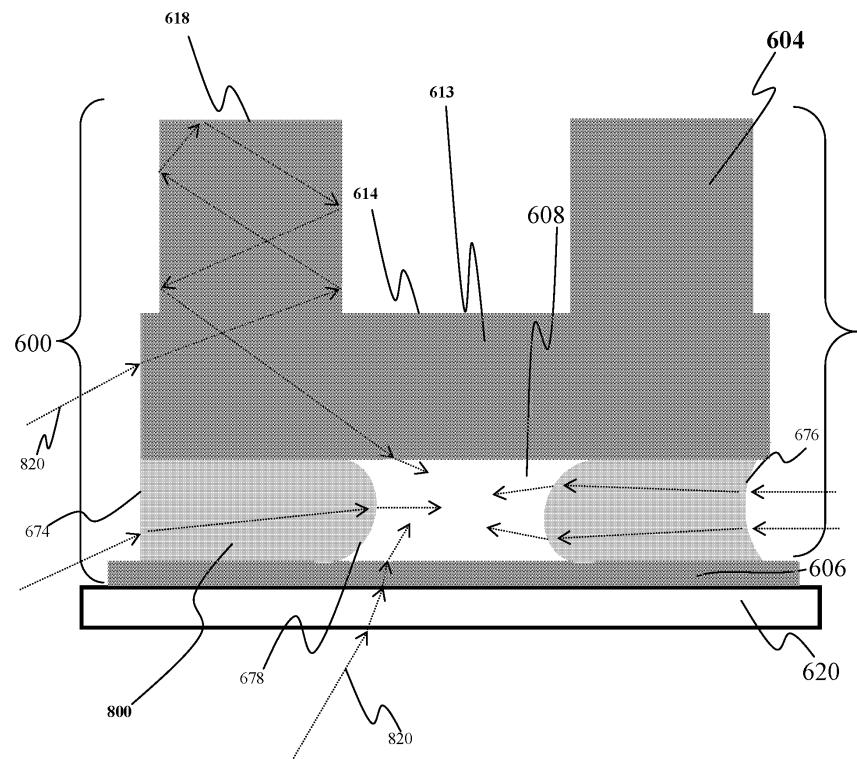


그림 8D

도면8e

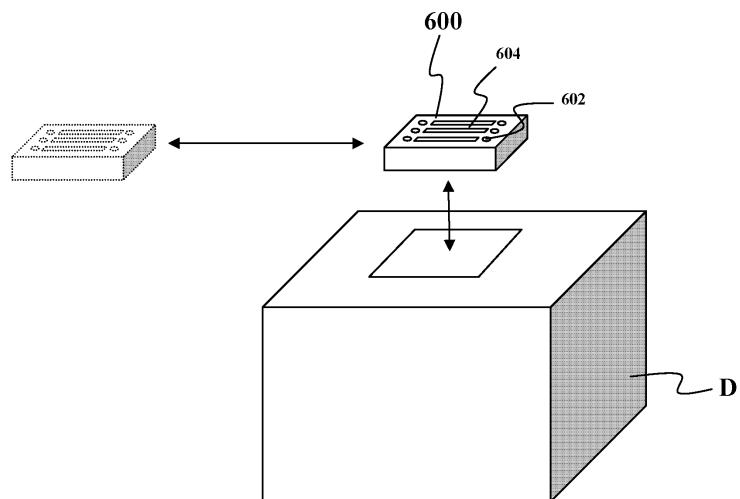


그림 8E

도면8f

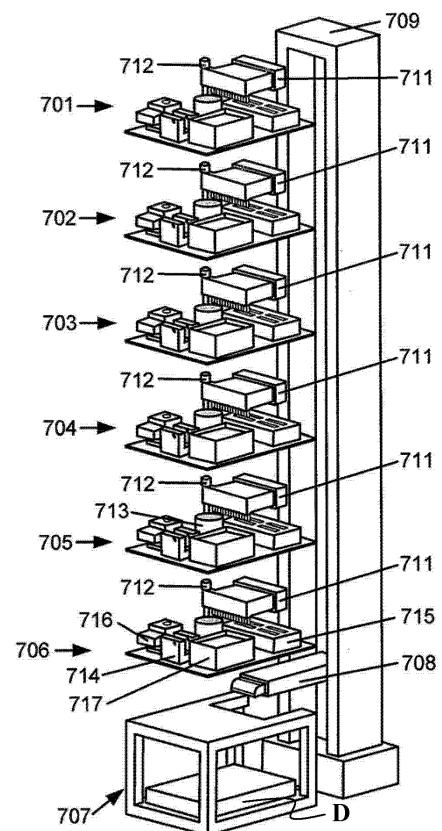
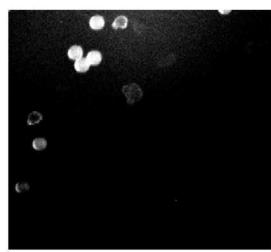


그림 8F

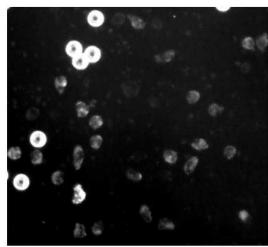
도면9a



분산

그림 9A

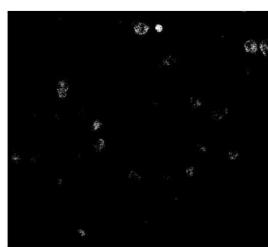
도면9b



CD14 - 단핵구용 Pac Blue

그림 9B

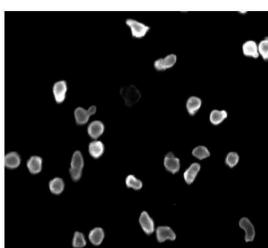
도면9c



CD123-호흡기구용 PE Cy5

그림 9C

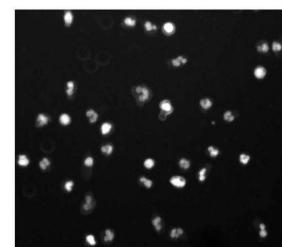
도면9d



CD16-호증구용 PE

그림 9D

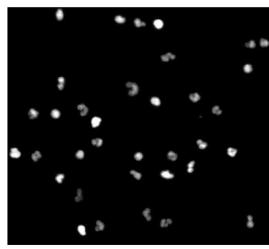
도면9e



CD45-모든 백혈구용 AF647

그림 9E

도면9f



Draq5 핵 염료

그림 9F

도면10

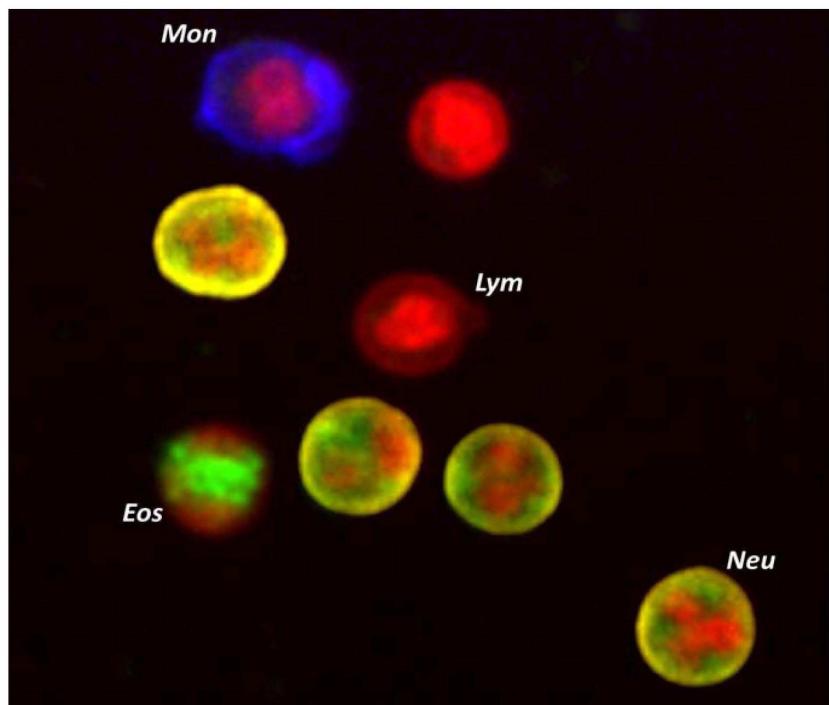


그림 10

도면11a

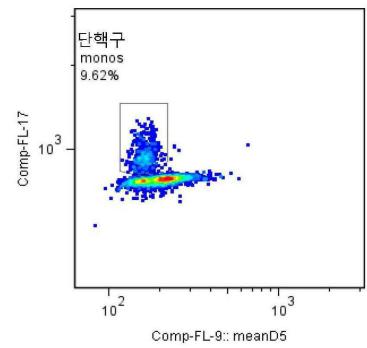


그림 11A

도면11b

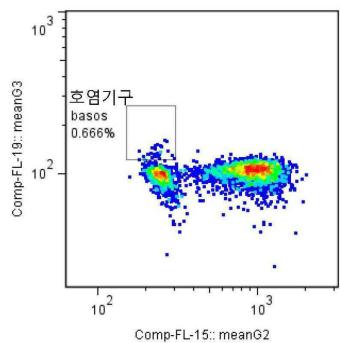


그림 11B

도면11c

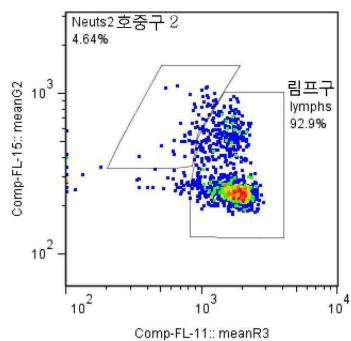


그림 11C

도면11d

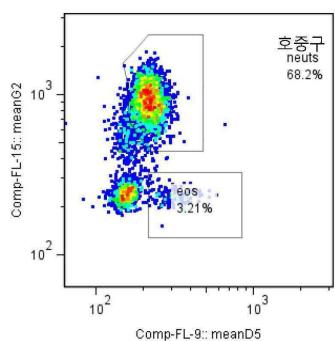


그림 11D

도면12a

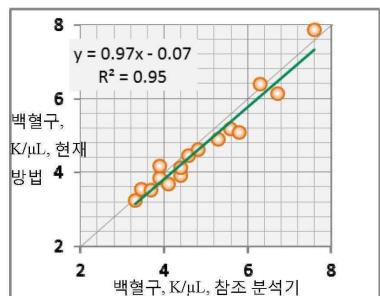


그림 12A

도면12b

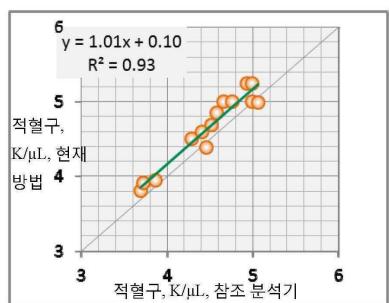


그림 12B

도면12c

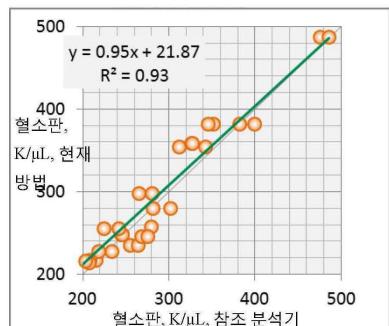


그림 12C

도면12d

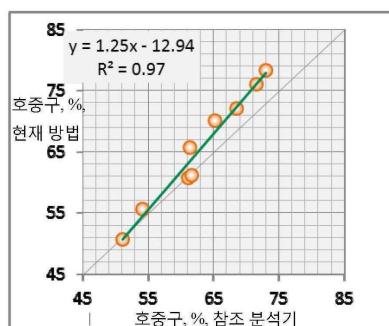


그림 12D

도면12e

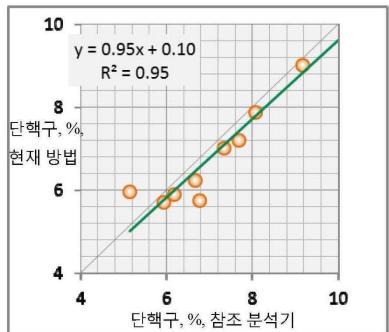


그림 12E

도면12f

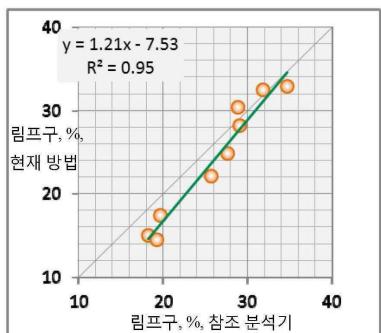


그림 12F