



## (12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106248582 B

(45) 授权公告日 2020.10.20

(21) 申请号 201610652305.X

桑尼·巴尔瓦尼 秦枚·潘加卡

(22) 申请日 2012.01.20

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 106248582 A

代理人 高文静

(43) 申请公布日 2016.12.21

(30) 优先权数据

61/435,250 2011.01.21 US

(51) Int.Cl.

G01N 21/03 (2006.01)

G01N 21/51 (2006.01)

G01N 33/543 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201280014347.0 2012.01.20

(73) 专利权人 拉布拉多诊断有限责任公司

地址 美国特拉华州

(56) 对比文件

CN 101490547 A, 2009.07.22

CN 1653480 A, 2005.08.10

CN 101095052 A, 2007.12.26

CN 1299466 A, 2001.06.13

WO 2004008112 A1, 2004.01.22

(72) 发明人 I·吉博恩斯 托尼·纽金特

安东尼·迪拉克鲁兹

丹尼尔·扬格 伊丽莎白·霍姆斯

安德鲁·德雷克 T·M·坎普

审查员 吴文惠

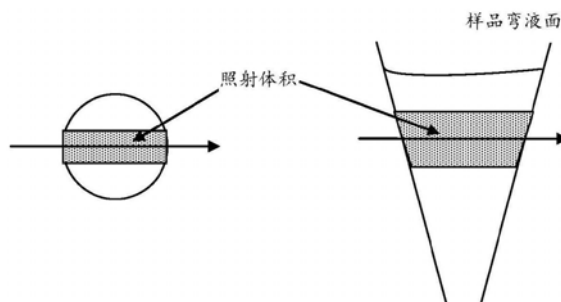
权利要求书1页 说明书84页 附图71页

(54) 发明名称

样品使用最大化的系统和方法

(57) 摘要

本申请涉及样品使用最大化的系统和方法。本发明提供用于定点照护和/或分布式测试装置的系统、装置和方法。本发明的方法和装置旨在自动检测体液中的分析物。该装置的部件可经修改以通过所披露的方法,为多种医学、实验室和其他应用提供更灵活、更强健的使用。通过提高样品准备和分析,本发明的系统、装置和方法可实现样品的有效使用。



1. 一种用于提高分析精度的方法,该方法包括:

(a) 对第一吸头中的样品成像以确定该样品的体积,其中通过使用被配置为捕捉该第一吸头侧面图像的照相机对第一吸头中的样品进行成像,根据所捕捉的侧面图像,计算该样品的高度,根据该样品的高度及该样品的已知截面积,确定体积;

(b) 对第二吸头中的一种或多种试剂成像以确定该一种或多种试剂的体积,其中通过使用被配置为捕捉该第二吸头侧面图像的照相机对第二吸头中的一种或多种试剂进行成像,根据所捕捉的侧面图像,计算一种或多种试剂的高度,根据该一种或多种试剂的高度及该样品的已知截面积,确定体积;

(c) 混合该样品和该一种或多种试剂以形成反应混合物;

(d) 对该反应混合物成像以确定该反应混合物的体积;

(e) 根据所确定的该样品和该一种或多种试剂的体积以及所确定的该反应混合物的体积进行校准;

(f) 通过该校准,计算分析物的浓度。

## 样品使用最大化的系统和方法

[0001] 本申请是申请日为2012年1月20日,申请号为201280014347.0,发明名称为“样品使用最大化的系统和方法”的申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2011年1月21日提交的美国专利临时申请第61/435,250号的优先权,该申请以引用的方式被全文并入本文中。

### 背景技术

[0004] 大量疾病生物标记物、新疗法的发现和微型化医疗系统的建立为在定点照护或其他分布式测试环境中预测、诊断和监测疾病治疗提供了新的途径。定点照护系统可向医疗人员、其他医疗专业人员和病人快速提供结果。对特定癌症和传染病等致命疾病的治疗,疾病或疾病发展的早期诊断及治疗监测经常是至关重要的。

[0005] 疾病诊断及治疗可充分利用多路复用生物标记物测量,该技术提供有关病人状况的额外信息。例如,当监测某种药物的效果时,可同时测量三种或更多种的生物标记物。通常使用和其他类似设备进行基于多路复用分离的分析。微量滴定板(例如,384孔微量滴定板)可同时进行很多数量的分析。

[0006] 对于定点照护(POC)装置,能够同时完成的分析数目经常受限于装置的大小和需分析样品的体积。很多POC装置完成的分析数目为约1到10。需要一种能够对小样品进行多路复用分析的POC装置。

[0007] 很多多路复用POC分析装置的缺点是制造装置部件的高昂成本。如果要求一次性的装置,那么由于部件的成本,将无法制造这种POC装置。另外,对于把所有必要的试剂都包含在装置中的多路复用POC装置,只要其中任一种试剂出现不稳定性,那即使所有其他试剂还可使用,也不得不丢弃整个批量的已制装置。

[0008] 如果客户希望把POC装置针对一组特定分析物进行定制,多路复用POC分析系统的制造商经常需要协调搭配该装置的分析 and 所用试剂。专门适用于不同客户的多路复用POC分析会非常贵、难以校准、难以保证质量控制。

[0009] POC方法已经证明对监测疾病和治疗非常有用(例如,糖尿病治疗中的血糖系统、使用华法林的抗凝血疗法中的凝血素时间测量)。通过测量多个标记物,据信可更好地监测和控制需要采用多药物疗法的复杂疾病(如癌症)。

[0010] 有必要采用多个信息来源以监测个人的健康状况或疾病情况,以及监测不同疾病的治疗。尤其重要的是随时间对数个选定分析物(生物标记物、抗体、基因表达水平、代谢产物、治疗药物浓度等)浓度的测量。为了使该程序简便并实现最大效能,能够使用小血液样本(通过手指针刺获得的血滴)或其他合适的样本对任何及所有所需(任何类型的)分析物进行测量的技术尤为有价值。在理想情况下,此类技术可被未经技术培训的用户在分布式环境(如家中、诊所、医生办公室、药房及零售店等)中使用。本发明解决了这些问题,并实现了在病人家中或其他非实验室环境中定期进行此类测量。

[0011] 还有必要尽可能充分地利用可获得的样品,尤其是在样品大小有限制的情况下

(如血样)。绝大多数医学/临床测试都采用血样。在大多数分析前,必须分离血细胞和血浆(或血清),因为细胞的存在会影响分析的化学。例如,经常通过显色化学品测定葡萄糖和胆固醇,而有形成分,特别是红细胞或(来自裂解红细胞的)血红蛋白,会干涉显色化学。

[0012] 理想情况下,分布式测试系统要求通过手指针刺方式获得的小血样。这类血样可少至20微升(uL)(一滴)或更少。较大体积的样品(如大至200uL)通常无法通过手指针刺方式获得,除非对手指进行重复、繁琐的“挤奶”。或者,可以采集数毫升(mL)的静脉样品,不过这需要经过医学训练的抽血士完成。

[0013] 大小为20uL或更少的小血样通常很难完成一项以上的分析。当血样必须经过过滤以去除细胞时更是这样,从如此小的体积中获取的有用血浆量不足。一般只能获取大约5uL或更少的血浆。自动POC系统(Abaxis、Biosite等)可高效分离高达200uL的样品,不过除非有技术人员进行采样,这种分离无法成为可日常完成的操作。

## 发明内容

[0014] 考虑到现有方法的局限性,迫切需要改进自动把血细胞从血浆和/或其他材料中分离出来的方法。还需要提高分析物浓度测量的精确度。为监测疾病治疗和诊断而测定生物标记物和其他血液成分时,使用正确体积的样品非常重要。在实验室环境中,复杂的自动仪器和熟练的专业人员可做到这一点。与之相反,在家里、零售药房和商店等定点照护环境中,所用方法和设备必须使未经技术培训的人能够可靠地获取并处理样品。

[0015] 本发明解决了上述需求并具有有关优点。

[0016] 在一些实施例中,本发明涉及定点照护和/或定点服务装置。在一些实施例中,本发明涉及用于通过定点照护和/或定点服务装置分析样品的系统、装置、用户界面和方法。

[0017] 根据一个方面,所述装置和方法设计用于识别样品类型(血液还是血浆等),在分析流程中尽早测量样品体积,以确保在所期望的分析中使用合适的样品。根据另一方面,本发明还允许修正在分析过程中出现的重大体积错误。

[0018] 根据又一方面,本发明还允许对数个分析物同时进行高精度测量。

[0019] 本发明的一个方面可涉及用于分离生物体液中一种或多种组分的自动系统。该自动系统可包括配置为与抽吸泵配合的移液器吸头或封闭管,其中该移液器吸头或管包括两个相对端,其中至少一端为封闭的或可密封的;及配置为接受该密封移液器吸头或封闭管以对生物体液中一种或多种组分进行该分离的离心分离机。在一个实施例中,所述一种或多种组分选自血浆、血清、血细胞和微粒。在另一实施例中,当移液器吸头与抽吸泵配合时,进行生物体液的抽取。在另一实施例中,移液器吸头具有一个开放端,与抽吸泵形成空气密封。在另一实施例中,该系统还包括成像装置;至少另一移液器吸头,其大小使液体能被分配给该移液器吸头或管(a)或使液体能从该移液器吸头或管(a)中被吸出。在另一实施例中,该移液器吸头或封闭管在离心分离机静止时处于垂直位置。在另一实施例中,该移液器吸头或封闭管在离心分离机以预定旋转速度旋转时处于水平位置。

[0020] 本发明的另一方面可涉及用于分离样品组分的方法,该方法包括以下步骤中的一步或多步:将样品装入移液器吸头或封闭管,该移液器吸头或管包括两个相对端,其中至少一端为可密封的或密封的;在该移液器吸头或管的至少一端密封移液器吸头;离心该密封移液器吸头或管,由此形成将样品分成上清液和沉淀物的界面区;对经离心的移液器吸头



或管成像以确定该界面区的位置；根据该界面区的位置，自动吸取上清液。在一个实施例中，该方法还包括通过该成像步骤确定上清液的位置，并根据上清液的位置自动吸取上清液。在另一实施例中，通过处理器进行所述确定，而该处理器向吸取装置发出指令，使其执行自动吸取步骤。在另一实施例中，通过使用被配置为捕捉该移液器吸头或管侧面图像的相机进行成像。在另一实施例中，上清液包括以下一种或多种：血浆或血清。在另一实施例中，沉淀物包括以下一种或多种：血细胞或微粒。

[0021] 本发明的另一方面可提供一种对被怀疑存在于样品中的某种分析物进行特征分析的计算机辅助方法。该计算机辅助方法可包括获取样品的数字图像，其中该数字图像包括至少一个二维像素点阵，且其中各像素包括多个强度值，各强度值对应于一个不同的检测光谱区域；在可编程装置的协助下，把所获得的强度值与定义各检测光谱区域的动态范围的预定值集相关联；根据所获得的强度值与预定值集的所述关联，预测该分析物在样品中的存在和/或数量。在一个实施例中，所述多个强度值包括红、绿、蓝检测光谱区域的强度值。在另一实施例中，该方法还包括选择照明波长，并在获取该数字图像之前和/或同时用所选照明波长照射样品。在另一实施例中，该方法还包括，在获取该数字图像之后，(a) 选择另一照明波长；(b) 用该另一所选照明波长照射样品；(c) 获取样品的另一数字图像，其中该数字图像包括至少一个二维像素点阵，且其中各像素包括多个强度值，各强度值对应于一个不同的检测光谱区域；及(d) 根据从该数字图像及所述另一数字图像获得的强度值，预测该分析物在样品中的存在和/或数量。

[0022] 而且，本发明的一个方面可涉及测量样品液体中的某种分析物浓度的方法，该方法包括：提供盛在容器中的样品，该容器的尺寸具有多个不同宽度，使得光线能沿着对应于所述多个不同宽度的多个不同路径长度传输；沿所述多个路径长度中的至少一个照射该容器；及对该容器成像，以测量沿所述多个路径长度中的至少一个传输的第一光强度，从而根据所测量的第一光强度确定该分析物的浓度。在一个实施例中，所述方法还包括：(a) 对该容器成像，以测量沿对应于容器另一不同宽度的另一路径长度传输的第二光强度；(b) 比较第一光强度和第二光强度；(c) 根据该比较步骤，确定分析物浓度。在一个实施例中，所述方法还包括按以下一种或多种选择所需的检测路径长度：(a) 相对于样品移动光源，(b) 相对于样品移动检测器，或(c) 相对于光源，在容器中移动样品。在一个实施例中，照明由光源提供，而成像由检测器提供，其中光源和检测器位于容器的相对侧。在一个实施例中，照明由光源提供，而成像由检测器提供，其中光源和检测器位于容器的同一侧。在一个实施例中，该多个不同路径长度与容器长度正交。在一个实施例中，该容器具有第一开放端和第二开放端，其中第一开放端宽度小于第二开放端。在一个实施例中，第二开放端被配置与流体处理装置连接。

[0023] 根据本发明的另一方面，一种检测盛在容器(如试管)中的样品液体中的某种分析物是否存在或其浓度的方法，该方法可包括：沿具有第一路径长度的第一区域照射容器，以生成对穿过该第一路径长度传输的光强度的第一测量；如果该第一测量落在所传输光强度的预定动态范围之外，则把样品液体移至容器中具有另一路径长度的另一区域；沿该另一区域照射容器，以生成对穿过该另一路径长度传输的光强度的另一测量；可选地，重复第二和第三步，直到某次光强度测量落在该预定动态范围之内，由此检测该分析物是否存在或其浓度。在一个实施例中，该方法还包括对图像线扫描进行反卷积，由此检测某种分析物是

否存在或其浓度。在另一实施例中,通过吸取样品把样品从具有第一路径长度的容器第一区域移至具有另一路径长度的容器第二区域。在另一实施例中,该容器的一端与被配置为吸取样品的移液器相连。在另一实施例中,样品沿容器长度被上下移动。在另一实施例中,该容器为移液器吸头。在另一实施例中,该容器呈圆锥形。在另一实施例中,该容器具有两个开放端。在另一实施例中,第一开放端直径大于第二开放端。在另一实施例中,该容器具有多个不同宽度,使得光线可沿多个不同路径长度传输。在另一实施例中,该容器的容量小于100微升。在另一实施例中,对多个不同路径长度同时成像。

[0024] 本发明的另一方面可提供一种方法,该方法可被用于特征分析被怀疑存在于生物体液样品中的某种分析物,该方法包括:提供该生物体液样品;使该分析物与一种或多种与该分析物进行特异性反应的试剂反应,以生成光学可测信号;及使用多个检测光谱区域测量该光学可测信号,其中,该光学可测信号在至少一个检测光谱区域的动态范围内出现表明该分析物在该生物体液样品中的浓度。在一个实施例中,所述多个检测光谱区域选自红、绿、蓝。在一个实施例中,该方法还包括通过评估从该至少一个检测光谱区域测得的值,对所述分析物浓度进行定量的步骤。在一个实施例中,该生物体液是血液、尿液、唾液、脊髓液或精液。在一个实施例中,被配置为测量多个检测光谱区域的成像装置完成该测量。在另一实施例中,该成像装置被配置为同时测量多个检测光谱区域。在另一实施例中,该成像装置被配置为按顺序测量多个检测光谱区域。在一个实施例中,样品在移液吸头中被测量。

[0025] 本发明的一个方面提供一种用于提高分析精度的方法,该方法包括:对第一吸头中的样品成像以确定该第一样品的体积;对第二吸头中的一种或多种试剂成像以确定该一种或多种试剂的体积;混合该样品和该一种或多种试剂以形成反应混合物;对该反应混合物成像;修正根据所确定的该样品和该一种或多种试剂的体积进行的校准;通过该经修正的校准,计算分析物的浓度。在一个实施例中,该方法还包括对该反应混合物成像以确定该反应混合物的体积。在另一实施例中,通过使用被配置为捕捉该第一吸头侧面图像的相机对第一吸头中的样品进行成像。在另一实施例中,通过使用被配置为捕捉该第二吸头侧面图像的相机对第二吸头中的一种或多种试剂进行成像。在另一实施例中,根据所捕捉的侧面图像,计算该样品和该一种或多种试剂的高度。在另一实施例中,根据该样品和该一种或多种试剂的高度及该样品和该一种或多种试剂的已知截面积,分别确定体积。在另一实施例中,该校准也是基于所确定的该反应混合物的体积。

[0026] 本发明的另一方面提供一种装备,该装备包括:被配置为接受并约束样品的器皿,其中该器皿包括内表面、外表面、开放端和相对的关闭端;及被配置为通过开放端延伸入该器皿的吸头,其中该吸头包括第一开放端和第二开放端,其中第二开放端被插入该器皿,其中该器皿或吸头还包括阻止吸头的第二开放端接触该器皿关闭端的内表面底的突起表面特征。在一个实施例中,该表面特征与该器皿的底部内表面形成一体。在另一实施例中,该表面特征包括该器皿的底部内表面上的多个突起。在另一实施例中,该突起的表面特征位于或靠近该关闭端。

[0027] 本发明的另一方面提供一种样品处理设备,该设备包括:样品准备站、分析站和/或检测站;在该样品准备站、分析站和检测站中至少一个的辅助下,带有计算机可执行命令以便在指定地点提供定点服务的控制单元;及被配置为对手指针刺采集的样品进行离心处理的至少一台离心分离机。在一个实施例中,该离心分离机被包容在样品准备站和/或分析

站内。在另一实施例中，该计算机可执行命令被配置为在选自零售商所处地点、病人家中或健康评估/治疗点的地方提供定点服务。

[0028] 本发明的另一方面提供一种动态反馈方法，该方法包括：使用一种检测装置对容器中的样品进行首次测量；根据该首次测量，使用处理器确定该样品的浓度是否处于所需范围内，并使用处理器确定 (a) 如果该样品的浓度高于所需范围，需要进行的稀释程度，或 (b) 如果该样品的浓度低于所需范围，需要进行的浓缩程度；以及根据所确定的稀释或浓缩程度，调整样品浓度。在一个实施例中，该方法还包括对容器中的该样品进行再次测量。在另一实施例中，该方法还包括：根据该再次测量，使用处理器确定该样品的浓度是否处于所需范围内。在另一实施例中，使用该检测装置进行该再次测量。在另一实施例中，该方法还包括：根据该再次测量，确定该样品的特征。在另一实施例中，该特征为选自下列特征中的一种或多种：分析物的存在或浓度、细胞的存在或浓度及该细胞的形态。在另一实施例中，进行该再次测量所使用的检测装置不同于该首次检测装置。在另一实施例中，该首次测量提供了样品的初步细胞浓度测量。在另一实施例中，该再次测量具有高于首次测量分辨率的样品细胞浓度测量。在另一实施例中，通过对样品成像进行该首次测量。在另一实施例中，通过调整样品浓度，可以检测到本来会处于所需范围外的分析物。

[0029] 本发明的另一方面提供一种质量控制方法，该方法包括：捕捉检测装置测量样品特征时所处条件的图像；及根据该图像，使用处理器确定该检测装置的运行是否处于不希望有的条件中。在一个实施例中，该不希望有的条件包括存在有一种或多种不需要的材料。在另一实施例中，该不需要的材料包括干扰样品特征测量的气泡、微粒、纤维、残渣和沉淀物中的一种或多种。在另一实施例中，该检测装置是不同于捕捉该图像的装置的一种装置。在另一实施例中，使用相机捕捉该图像。在另一实施例中，该方法还包括：当检测到一个不希望有的条件时，发出警告。在另一实施例中，该方法还包括：当检测到一个不希望有的条件时，调整样品。在另一实施例中，该图像包括样品的图像。在另一实施例中，该图像包括样品容器或检测装置中的一个或多个的图像。

[0030] 本发明的另一方面为一个用于分离生物体液中一种或多种组分的自动系统，该系统包括：带有被配置为容纳容器以便实施该分离液体样品中一种或多种组分的一个或多个离心桶的离心分离机；及容器，其中该容器具有与离心桶形状特征相配的一个或多个形状特征。在一个实施例中，该一个或多个离心桶是摆动桶，当离心分离机静止时，该桶处于或接近垂直位置，而离心分离机旋转时，该桶处于或接近水平位置。在一个实施例中，所述系统还包括一个或多个在径向对称分开的摆动桶。在一个实施例中，该液体样品是一种生物体液。在一个实施例中，该生物体液是血液。在一个实施例中，该容器被配置为容纳100uL或更少的血液。在一个实施例中，该容器一端封闭，而相对端开放。在一个实施例中，该容器是离心分离器皿。在一个实施例中，该离心分离器皿有设有一个或多个内部小块的圆端。在一个实施例中，该系统还包括提取吸头，该吸头设有与该离心分离器皿的形状特征互补的一个或多个形状特征，且该形状特征被配置为可被装入该离心分离器皿。在一个实施例中，该离心桶形状特征包括一块或多块搁板，而容器的突出部分被配置为放在该搁板上。在另一实施例中，该离心桶被配置为能够容纳具有不同配置的多个容器，且其中该离心桶形状特征包括多块搁板，其中具有第一配置的第一容器被配置为可放在第一搁板上，而具有第二配置的第二容器被配置为可放在第二搁板上。

[0031] 本发明的另一方面提供一个分析单元,该分析单元包括:第一端和第二端;外表面;和具有一个或多个所选式样的内表面,各式样被固定在其上或其中,并带有能捕获被怀疑存在于生物样品中的某种分析物的捕获试剂,其中第一端和第二端的大小不同。

[0032] 本发明的另一方面提供一个包括标识符的分析单元,该标识符用于确定 (a) 被固定在内表面上的该一个或多个捕获试剂;和 (b) 如果该分析单元包含该样品,该生物样品的来源。

[0033] 本发明的另一方面提供一个包括多个所选式样的分析单元,该多个所选式样中的每一个式样均带有一个不同的捕获试剂。

[0034] 通过同时阅读以下的描述和附图,将可更好地理解本发明的其他目的和优点。尽管以下描述可包括描述本发明特定实施例的具体细节,其不应被认为是对本发明保护范围的限定,而只是优选实施例的范例。本领域的普通技术人员了解,正如本文所述,对本发明的各方面可作出诸多变化。在不偏离本发明精神的前提下,可在本发明保护范围内作出各种改变和修改。本文所披露的各种化合物/装置可分开使用,或以任何组合方式一起使用于本文所披露的单个方法或各方法的任何组合中。

[0035] 通过引用的合并

[0036] 在此通过引用合并本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请,等同于各出版物、专利和专利申请各自通过引用被明确地、单独地合并。

## 附图说明

[0037] 所附权利申请书中描述了本发明的新颖特性。通过参考附图及下面对运用本发明原则的示例性实施例的详细描述,可以更好地理解本发明的特征和优点。附图如下:

[0038] 图1示出离心分离机的侧视图。

[0039] 图2示出离心分离机的正视图。

[0040] 图3示出离心分离机的后侧透视图。

[0041] 图4示出样品吸头的俯视图。

[0042] 图5示出样品吸头的侧视图。

[0043] 图6示出样品吸头的剖视图。

[0044] 图7示出样品吸头在样品中并位于血浆/压实细胞界面之上的示意图。

[0045] 图8示出离心时间作为每分钟转数函数的图象。

[0046] 图9示出离心时间作为离心机转子半径函数的图象。

[0047] 图10示出空的戴帽样品吸头。

[0048] 图11示出容纳有体液(如血液)样品的戴帽样品吸头。

[0049] 图12示出容纳有离心后含约23%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0050] 图13示出容纳有离心后含约31%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0051] 图14示出容纳有离心后含约40%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0052] 图15示出容纳有离心后含约52%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0053] 图16示出容纳有离心后含68%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0054] 图17比较对离心样品采用数字成像系统测量的红细胞比容(“红细胞比容,%报告值”)和用标准微量红细胞比容装置测量的红细胞比容(“红细胞比容,%目标值”)。

- [0055] 图18示出用于反应的吸头和用于血液/血浆的吸头(所示尺寸单位是毫米)。
- [0056] 图19示出含有样品的圆柱形毛细管。
- [0057] 图20示出用于计算圆锥体容器(如毛细管)中的体积的角度和尺寸。
- [0058] 图21示出用于计算圆锥体容器(如毛细管)中的体积的角度和尺寸。
- [0059] 图22示出用于计算球形吸头体积的角度和尺寸。
- [0060] 图23示出用于计算容纳在圆柱形吸头中的样品体积的尺寸,其中样品具有单个弯液面。
- [0061] 图24示出用于计算容纳在圆柱形吸头中的样品体积的尺寸,其中样品具有两个弯液面。
- [0062] 图25示出用于计算容纳在圆柱形吸头中和/或与之相连的样品体积的尺寸,其中样品具有两个弯液面,其中一个位于该圆柱形吸头外。
- [0063] 图26示出用于计算容纳在圆柱形吸头中的样品体积的尺寸,该样品中有一个气泡。
- [0064] 图27示出用于计算容纳在圆柱形吸头中的样品体积的尺寸,该样品中的气泡占据该圆柱形吸头的整个宽度。
- [0065] 图28示出用于计算容纳在圆柱形吸头中和/或与之相连的样品体积的尺寸,其中样品包括位于该圆柱形吸头外的悬挂样品微滴。
- [0066] 图29示出用于计算容纳在圆柱形吸头中的残余样品体积的尺寸。
- [0067] 图30示出吸头中与磁性试剂混合前的血样。
- [0068] 图31示出正与磁性试剂混合的血样。
- [0069] 图32示出混合有磁性试剂的血样。
- [0070] 图33示出容纳在吸头中的混合有磁性试剂的血样。
- [0071] 图34示出混合有磁性试剂的血样被移至吸头中的一个所选位置。
- [0072] 图35示出向混合有磁性试剂的血样通过磁铁(M)施加磁力。
- [0073] 图36示出使用磁力将血样分为红细胞组分和血浆组分。
- [0074] 图37示出位于容纳有被分为红细胞组分和血浆组分的血样的吸头下方的孔。
- [0075] 图38示出血浆从吸头转移入孔中的示意图。
- [0076] 图39示出将血浆分配入孔后的吸头。
- [0077] 图40示出含有低吸收率液体的圆柱形吸头的高对比度图像。
- [0078] 图41示出含有高吸收率液体的圆锥形吸头的图像。
- [0079] 图42示出含有高吸收率液体的吸头并显示位于吸头内的两个弯液面。
- [0080] 图43示出含有样品液体的吸头及横跨吸头直径的大气泡。
- [0081] 图44示出含有水的吸头,该水显示在透明吸头或毛细管中有清楚的上弯液面。
- [0082] 图45示出蛋白质-C浓度计算值作为样品体积函数的图象。
- [0083] 图46示出具有毛细管、外壳、活塞、槽和突起特征的样品转移装置。
- [0084] 图47示出样品转移装置的毛细管中含有样品。
- [0085] 图48示出用活塞推出样品后的样品转移装置。
- [0086] 图49示出样品被不完全推出后的样品转移装置。
- [0087] 图50示出含有样品的圆锥体吸头,其中箭头表示位置L3。

- [0088] 图51示出L2和L1之间距离与L3和L1之间距离之比值作为样品体积函数的图象。
- [0089] 图52示出生成有色产品的化学反应示意图。
- [0090] 图53示出从胆固醇生成有色产品的化学反应示意图。
- [0091] 图54示出用还原当量生成有色产品的化学反应示意图。
- [0092] 图55示出当与金属离子络合时改变颜色的化合物示例。
- [0093] 图56示出一系列的吸头图像,从右到左白蛋白的浓度减少两倍,最左的吸头除外,该吸头不含白蛋白。
- [0094] 图57示出一系列的吸头图像,从右到左胆固醇的浓度减少两倍,最左的吸头除外,该吸头不含胆固醇。
- [0095] 图58示出从一块白色不透明塑料中加工出的一系列半球形孔,从右到左各孔所含分析物的浓度减少两倍,最左的孔除外,该孔不含分析物。在一些实施例中,该分析物可为钙。
- [0096] 图59示出从一块白色不透明塑料中加工出的一系列半球形孔,从右到左各孔所含分析物的浓度减少两倍,最左的孔除外,该孔不含分析物。在一些实施例中,该分析物可为镁。
- [0097] 图60示出从一块白色不透明塑料中加工出的一系列半球形孔,从右到左各孔所含分析物的浓度减少两倍,最左的孔除外,该孔不含分析物。在一些实施例中,该分析物可为尿素。
- [0098] 图61示出含有溴酚蓝溶液的一系列吸头。
- [0099] 图62示出具有多个不同光线路径长度的吸头。
- [0100] 图63示出穿过矩形试管的光路。
- [0101] 图64示出穿过微量滴定孔的光路。
- [0102] 图65示出穿过圆锥形试管的光路。
- [0103] 图66示出光强度作为位置函数的图象,在容纳具有用于红、绿和蓝色通道的不同溴酚蓝溶液浓度的样品的吸头处测得该光强度。
- [0104] 图67示出在图66中分析的吸头图像。
- [0105] 图68示出在红、绿和蓝色通道测量的信号作为溴酚蓝浓度函数的图象。可在589nm处测量光密度。
- [0106] 图69示出在蓝色(菱形)和红色(方形)通道测量的信号响应作为溴酚蓝浓度函数的对数图。
- [0107] 图70示出经对数字图像进行颜色分析测量得到的浓度作为实际浓度函数的图象。
- [0108] 图71示出在红色(方形)、绿色(菱形)和蓝色(三角形)通道测量的信号响应作为白蛋白浓度函数的图象。
- [0109] 图72示出在绿色、红色和蓝色通道测量的三个聚苯乙烯胶乳微粒信号响应图。
- [0110] 图73示出分别含有NADH、WST-1、PMS试剂的吸头及含有这些试剂的混合物的两个吸头。
- [0111] 图74示出含有乳酸脱氢酶(LDH)且从左到右其浓度减少两倍的吸头数字图像。
- [0112] 图75示出在450nm处测量的光密度作为LDH的函数的图象。
- [0113] 图76示出加入钾分析条的氯化钾溶液。

[0114] 图77示出含有与用于抗A、抗B、抗D和对照样的血型试剂相混合的血样的吸头(从左至右)。

[0115] 图78示出为与抗A、抗B、抗D和对照样试剂相混合的样品所测量的信号作为红色(左柱)、绿色(中间柱)和蓝色(右柱)中位置的函数的图象。

[0116] 图79示出使用红色、绿色和蓝色通道在窄和宽路径长度上测量的归一化信号作为相对浓度的函数的图象。

[0117] 图80示出测量浓度作为实际浓度的函数的对数图,显示测量算法的精确度。

[0118] 图81示出试管中分析产物的荧光图。

[0119] 图82示出吸头中反应产物的图像。

[0120] 图83示出吸头中反应产物的图像。

[0121] 图84示出吸头中反应产物的图像。

[0122] 图85示出吸头中反应产物的图像。

[0123] 图86示出吸头中反应产物的图像。

[0124] 图87示出吸头中反应产物的图像。

[0125] 图88示出用于校准而获取的背景颜色图像。

[0126] 图89示出用于吸头中反应产物的荧光图。

[0127] 图90示出红色和蓝色通道响应及荧光响应作为DNA副本数量的函数的图象。

[0128] 图91示出经转换的3色信号作为荧光信号的函数的图象。

[0129] 图92示出绿色通道信号响应作为像素位置的函数的图象。

[0130] 图93示出含有溴酚蓝和水的溶液的吸头图像。

[0131] 图94示出可含有溴酚蓝和水的溶液的额外吸头图像。

[0132] 图95示出含有反应混合物以进行多项分析的吸头示意图。

[0133] 图96示出含有溴酚蓝和水的溶液的吸头图像。

[0134] 图97示出多个标准中的样品、水和对照样的信号响应图。所述样品可为含有已知浓度的分析物的水校准物。

[0135] 图98示出含有 $\text{Ca}^{2+}$ (吸头上部区域)和 $\text{Mg}^{2+}$ (吸头下部区域)分析试样的吸头。

[0136] 图99示出含有不同类型:溶血(红色)、脂血症(灰色)、黄疸(黄色)和正常(从左至右)血清样品的四个吸头。

[0137] 图100示出相机和光学部件的示意图。

[0138] 图101示出相机和包括白光源、光圈和传感器在内的光学部件的剖视图。

[0139] 图102示出使用(A)按垂直于激发光束的角度布置以检测光线的传感器和(B)与激发光束平行布置的传感器测量光信号的光学装备示意图。

[0140] 图103示出使用(A)按垂直于传感器的激发光束和(B)与传感器平行的激发光束获取的图像。

[0141] 图104示出可用于校准该光学装备的印刷染料阵列。

[0142] 图105示出信号作为样品体积的函数的图象。第1-5数据列可分别对应于不同的分析物浓度,如0、20、40、60和80。

[0143] 图106示出信号作为样品体积的函数的图象。第1-5数据列可分别对应于不同的分析物浓度,如0、20、40、60和80。

- [0144] 图107示出信号作为样品体积的函数的图象。第1-5数据列可分别对应于不同的分析物浓度,如0、20、40、60和80。
- [0145] 图108示出测量分析物浓度作为实际分析物浓度的函数的图象。
- [0146] 图109示出测量分析物浓度作为实际分析物浓度的函数的图象。
- [0147] 图110示出酶联免疫吸附测定法的一种示范性方法。
- [0148] 图111示出当转子停止时,离心桶垂直的示例。
- [0149] 图112示出当转子以特定速度旋转时,离心桶与水平线形成一个小角度的示例。
- [0150] 图113示出一个离心桶结构示例。
- [0151] 图114示出与离心桶配合的离心分离器皿示例。
- [0152] 图115示出可与离心桶配合的另一离心分离器皿示例。
- [0153] 图116示出离心分离器皿示例。
- [0154] 图117示出提取吸头示例。
- [0155] 图118示出离心分离器皿与提取吸头怎样配合的示例。
- [0156] 图119示出原反应混合物在离心前所拍的图像。
- [0157] 图120示出原反应混合物在离心前所拍的另一图像。
- [0158] 图121示出原反应混合物在离心前所拍的又一图像。
- [0159] 图122示出界面离血浆弯液面的距离结果。
- [0160] 图123为显示经标记白细胞的荧光显微相片的示例。
- [0161] 图124为使用暗场像的胞内模式示例。
- [0162] 图125为对标记细胞样品进行多参数数据采集的示例。
- [0163] 图126为人类全血亮场像的示例。
- [0164] 图127为定量多参数数据采集和分析的示例。
- [0165] 图128示出光线分布的变化。
- [0166] 图129示出五次分析所得的数据。
- [0167] 图130示出一个参数相对于分析物浓度的曲线,以及关于准确度、精确度和预测浓度的图表。
- [0168] 图131示出用数字相机采集的图像。
- [0169] 图132示出反应产物的图像示例。
- [0170] 图133为在离心分离机中旋转前及在离心分离机中旋转后分析的图像示例。
- [0171] 图134示出反应产物的图像示例。
- [0172] 图135示出数个血清样品的光谱。
- [0173] 图136示出本发明使用阵列的检测程序示例。
- [0174] 图137示出本发明使用微球的检测程序示例。
- [0175] 图138示出本发明使用经标记适配体的检测程序示例。
- [0176] 图139示出与互补探针结合的适配体检测。
- [0177] 图140示出适配体与非互补探针之间无结合。
- [0178] 图141示出阵列上的适配体的结合特异性。
- [0179] 图142示出阵列上分析物检测的更详细视图。
- [0180] 图143示出示范性阵列。



- [0181] 图144示出维生素D分析的化学发光与浓度曲线。
- [0182] 图145示出雌二醇分析的化学发光与浓度曲线。
- [0183] 图146示出WBC浓度的分光光度测量值。
- [0184] 图147示出浊度作为时间的函数的图象。
- [0185] 图148示出在800cp/uL和80cp/uL进行的三次试验的转折点图象。
- [0186] 图149示出把磁性微球用于酶联免疫吸附测定法分析蛋白质和小分子的示例。
- [0187] 图150示出把磁性微球用于酶联免疫吸附测定法分析蛋白质和小分子的示例。

### 具体实施方式

[0188] 以上图示并描述了本发明的优选实施例,但是此类实施例仅是示例对本领域技术人员是显而易见的。在不偏离本发明的前提下,本领域技术人员可作出诸多的变化、更改和替换。应当理解,在实施本发明时,可采用本文所述实施例的各种替换方式。

[0189] 本发明提供系统和方法的移动应用以最大化样品使用。本文所述本发明的各方面均适用于下述任何特定应用或任何其他类型的诊断或治疗应用。本发明可作为单独系统或方法应用,或作为综合临床前、临床、实验室或医疗应用中的一部分应用。应当理解,可单独地、共同地或彼此组合地理解本发明的不同方面。

[0190] 本发明的装置和系统提供对实验对象体液中的分析物进行实时检测的有效手段。所述检测方法可被用于各种情况中,包括与特定生物过程、生理条件、疾病或疾病阶段相关的分析物识别和量化。因此,所述系统在例如药物筛选、疾病诊断、系谱分类、亲子鉴定和法医鉴定、疾病发作和复发、单体而不是整个人口对治疗的响应,和/或治疗监测中具有广泛的用途。标的装置和系统对推进疗法的临床前期和临床阶段开发、提高病人依从性、监测与处方所开药物相关的药物不希望有的反应、发展个性化医学、把血样测试从中央实验室外包至家中或按处方进行,和/或在监管批准后监测治疗剂也是特别有用。标的装置和系统可被付款人由于外包中央实验室的血样测试。所述装置和系统可为个性化医学提供灵活的系统。采用同样的系统,装置可经改造或与该系统可编程处理器的协议或指令互换,以进行所述的多种分析。尽管本发明的装置和系统体积小很多和/或是可携式的,但却能实现新颖的特征并提供实验室仪器的很多功能。

[0191] 根据一个方面,本发明的系统包括带有分析单元和试剂单元的装置,该试剂单元包括液体和/或固体相试剂在内的试剂。在一些实施例中,整个装置中至少一个、一个分析单元、一个试剂单元或其组合是一次性的。在本发明的系统中,使用标的装置检测分析物一般是自动化的。可通过内置协议或制造商向系统提供的协议实现此自动化。

[0192] 本发明的装置和系统可提供现有POC系统或综合分析系统无法提供的很多特征。例如,很多POC药筒依靠封闭式液体系统或回路高效地处理小体积的液体。本文所述的药筒等液体装置可在给定的药筒内各单元之间具有开放式液体移动。例如,试剂可被储存在一个单元中,样品储存在样品采集单元中,稀释剂储存在稀释剂单元中,而捕获表面可在分析单元中,而在药筒的一种状态下,没有一个单元与任何其他单元有液体流通。所述单元可以相对于其他单元移动,以便通过系统的液体传递装置把一些单元置于流体流通之中。例如,液体传递装置可包括与分析单元配合的头部,其将分析单元置于与试剂单元的流体流通之中。在一些情况下,该头部是移液管头部,其将分析单元(如吸头)置于与试剂单元的流体流

通之中。

[0193] 相应地,在一个实施例中,本发明提供检测和/或测量体液或组织样品中的分析物浓度的方法,该方法通常包括以下步骤:向本发明的装置和系统提供样品(如血液、尿液、唾液、组织等)、使该样品在装置的至少一个分析单元中反应,并检测该血样中分析物产生的可检测信号。

[0194] 根据本发明的一个方面,使用被配置为最大化样品使用的定点照护装置分析样品。例如,对于体积小于大约1、20、50、100或500 $\mu$ L的样品,可进行超过大约15、25、50、75或100次的分析。该样品可为通过手指针刺采集的血样。可用可密封的毛细管或吸头采集该样品。可通过分离(如离心)和/或稀释程序处理样品来进行样品准备。可将已被分离和稀释的样品与一种或多种试剂在反应室中混合,从而准备一种或多种分析。该反应室可为移液器吸头、小瓶、样品传递装置和/或试管。该一种或多种分析可被配置为测量表示样品中一个或多个分析物浓度的光学信号。该反应室可容纳多个可被空间分开的分析。在单个反应室中,一个分析或多个被空间分开的分析可产生多个光学信号。可通过一台能测量诸如红、绿和蓝等多个检测光谱区域或检测波段的数字成像相机测量该一个或多个光学信号。可在反应室中的分析反应产物上测量该光学信号,而该反应室可为移液器吸头或其他样品容器。可通过可编程逻辑使所述系统、装置和方法完全自动化或半自动化。

[0195] 根据本发明的另一方面,提供准备样品以供分析的系统、装置和方法。可通过一个或多个分离装置准备样品以供分析。例如,可在离心分离机中通过离心准备样品以供分析。还可以根据电荷、大小、疏水性/亲水性和/或挥发性进行其他分离。

[0196] 根据本发明的一个方面,通过基于图像的分析完成样品和反应产物分析。该系统可包括能使用一个或多个检测光谱区域测量光学信号的相机。例如,能使用红、绿和蓝检测光谱区域测量光学信号的相机。所测量的信号可包括三个测量值,并可使用本文所述一个或多个算法诠释该三个测量值。相对于使用一个检测光谱区域进行的测量,使用一个以上的检测光谱区域可扩展分析的动态范围,并可提高测量的准确度。

[0197] 本发明还提供用于对容纳在反应室中的样品和分析反应产物进行光学测量的系统、装置和方法,而各反应室均具有多个不同的路径长度。反应室可具有多个不同的路径长度,从而可观测到更多或更少的吸光量。该多个不同的路径长度(例如,穿过样品和/或反应室)允许所选分析程序的动态范围得到扩展。反应室图像可如本文所述加以分析,以得到关于样品或分析反应产物的信息。在单个反应室中组合使用多个可得路径长度及使用三个通道检测光谱区域显著加强了特定分析的动态范围。

[0198] 用于进行样品准备和分析的系统可包括仪表、一次性部件和试剂。该系统可接受样品并自动执行多项分析,而不需用户介入。如有需要,该仪表可包括图形用户界面、引入可为一次性的药筒的机构、可在三个方向具有机动性的机动台、一个或多个单头液体处理装置、一个或多个多头液体处理装置、一个或多个样品准备装置、可包括PMT和/或成像装置的光学传感器、温度控制器和通信装置。该一次性部件可包括包含样品吸头、吸头密封和试剂的一次性药筒。在一些实施例中,该一次性药筒还可包含被配置为吸收和中和液体分析产物的中和组件。

[0199] 该仪表、一次性部件和试剂可被装在可封闭的环境中,例如盒子或柜子。在一些实施例中,该盒子的横截面面积小于大约4 $m^2$ 、2 $m^2$ 、1 $m^2$ 、0.5 $m^2$ 、0.1 $m^2$ 、0.05 $m^2$ 或更小。本发明提

供分布式测试系统,如可包括一个或多个下列方面的定点照护装置:

[0200] 1. 高效血液分离(离心)和被分离血浆的收回

[0201] 2. 血浆样品被稀释至一个或多个水平(例如1:10、1:100、1:1000),以便可在最佳稀释水平完成各分析

[0202] 3. 样品被优化分配至可涉及数个不同方法的数个不同分析

[0203] 4. 最佳分析程序

[0204] 5. 采用开口式圆形截面试管进行样品分析、与试剂混合、培养及提交至光学系统

[0205] 6. 采用成像技术(扫描和/或摄影和/或显微镜检查)进行试验分析

[0206] 在一个实施例中,本发明的装置为自足式,并包括同时进行多项分析所需的所有液体和固体相试剂。如有需要,该装置被配置为进行至少2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、40、50、100、200、500、1000或更多次的分析。如有需要,还可在该装置中整合入同时进行的一次或多次对照样分析。还可提供校准物用于分析系统的校准。可用于分析系统校准的经干燥对照样和校准物的一些例子可包括分析物的水溶液、含有已知分析物浓度的血清或血浆样品,已知数量的此类校准物 and 对照样还可通过低压冻干法、真空干燥法和其他制造流程干燥(并在分析过程中溶解)。

[0207] 通过在定点照护系统中包括这些部件,病人或用户可在不到大约0.5、1、2、3、4、5、10、20、30、60、120、180、240、480或600分钟的时间内把多种分析物,例如超过大约10、20、30、50、75、100、150或200种分析物定量化。

[0208] 标的装置和系统可被用于进行可在短时间内完成的定量免疫分析。运用本发明装置可完成的其他分析类型包括但不限于核酸序列测定及胆固醇等代谢物或者镁和氯离子等电解质的测定。在一些实施例中,该分析在不到一小时,优选地不到120、60、30、15、10、5、4、3、2或1分钟内完成。在其它实施例中,该分析在不到5分钟内完成。可根据运用本发明装置将要完成的分析类型,对分析检测的时长作出相应的调整。例如,如果需要更高的灵敏度,可培养分析超过一个小时或长达一天。在一些例子中,与临床POC环境相比,需要长时间才能完成的分析对家庭使用等其它POC应用可更为实际。

[0209] 在本发明的其它实施例中,标的装置的试剂单元被配置为一套协调搭配的部件。试剂单元通常储存进行检测特定分析物的分析所需的液体或固体试剂。分析单元有时(可选地,不总是)可包括至少一个能与体液样品中的分析物反应的捕获表面。该分析单元可为其中具有捕获表面的管状吸头。本文描述了本发明的吸头例子。各单个分析和试剂单元均可被配置为具有独立分析的功能。如要装配一个装置,可以即时方式装配这些单元以便用于可采用药筒形式的集成装置中。

[0210] 本发明装置的外壳可用铝、聚苯乙烯或其他可模制或机制的塑料等聚合材料、金属材料或复合材料制成,并可具有明确的位置放置分析单元和试剂单元。该外壳可包括金属或任何其他材料。该外壳可部分地或全部围住分析单元和/或试剂单元。该外壳可支撑分析单元和/或试剂单元的重量。在一个实施例中,该外壳具有让印迹吸头或分析单元去除过量液体的构件。该印迹构件可为醋酸纤维素等多孔膜或滤纸等吸水材料。

[0211] 在一些实施例中,该装置的至少一个部件可由聚合材料制成。聚合材料的非限制性示例包括聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚二甲硅氧烷(PDMS)、聚氨酯、聚氯乙烯(PVC)、聚砜、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、丙烯腈丁二烯苯乙烯共聚物(ABS)和玻璃。

[0212] 该装置或该装置的亚部件可用各种方法制成,包括但不限于冲压法、注模成型法、模压加工法、铸造法、吹塑法、切削法、焊接法、超声焊接法和热结合法。在一个实施例中,装置用注模成型法、热结合法和超声焊接法制成。该装置的亚部件可通过热结合法、超声焊接法、摩擦配合(压配合)、粘结剂彼此连接,或在例如玻璃或半刚性及非刚性聚合基质等特定基质情况下,通过两个部件间的自然附着力相连。

[0213] 所述系统可进行多种分析,不论要检测的分析物是否来自体液样品。储存在外部装置上并依赖于所述装置标识的程序可被转移至读数器组件上,使读数器组件能在装置上执行特定的程序。在一些实施例中,该装置具有可被本文所述标志符检测器检测或读取的标志符(ID)。该标志符使装置和传感器或接受系统之间实现双向通信。该标志符检测器可通过把标志符发送给外部装置的控制器与通信组件进行通信。如有需要,该外部装置根据该标志符把储存在外部装置上的程序传送给通信组件。将在该系统中运行的此程序可包括要求系统控制器执行该程序的指令,包括但不限于需运行的特定分析和需采用的检测方法。一旦系统执行了分析,表明体液样品中分析物的信号就会被生成,并被系统的检测组件检测。该被检测的信号随即可被发送给通信组件,再被发送至外部装置进行处理,包括但不限于计算样品中分析物的浓度。

[0214] 美国专利公开号2009/0088336和美国专利临时申请第60/997,460号描述了使用定点照护装置和可用做反应室的吸头进行样品分析的系统、装置和方法,它们均以引用的方式被全文并入本文中用于所有目的。

#### [0215] 样品处理和反应室

[0216] 本文所述的样品、试剂和组合分析可由多种形式的反应室加以处理和容纳。样品处理装置和反应室可以是孔、管或也可以是试管的开口吸头。如本文所用的那样,吸头也可被称为样品吸头、试管吸头、反应室、试管、毛细管、样品处理装置或样品转移装置。样品可从样品源被采集入吸头或管中。吸头可被密封。此类密封可为永久性是可逆的。经稀释的样品可与一种或多种试剂在诸如吸头(开口试管)或打开或有盖的孔等“分析元件”中混合(如先前申请所述)。当分析准备完毕可以读取时,该分析元件可被送入光学系统进行图像分析或其他类型的读取。或者,分析反应混合物可从一种类型的元件被转移到另一种类型的元件。例如,在吸头中培养的分析可被点至吸收剂或吸收介质上,或者在孔中培养的分析可被吸如吸头中。可同时处理很多分析。根据分析程序和/或培养时间,可以连续或者同时进行分析读数。对于测量变化率的分析,可在不同时间将该分析元件多次送入光学系统。

#### [0217] 流体和材料转移装置

[0218] 流体转移装置可以是系统的一部分。该流体转移装置可包括多个头部。本发明的流体转移装置可具有检测样品中多个分析物要求的任意数目的头部。在一个示例中,流体转移装置有大约8个安装成一行并间隔一定距离的头部。在一个实施例中,头部具有锥形喷嘴与诸如本文所述的分析单元或样品采集单元等多种吸头压配合。该吸头可具有一定的特征使得它们可被仪器自动去除,并在使用后处理入所述的装置外壳中。在一个实施例中,分析吸头是无色透明的且可与试管相似,其中运行的分析可被诸如光电倍增管或相机传感器等光学传感器检测。

[0219] 在一个示例中,系统的可编程处理器(如中央处理器(CPU))可包括或被配置为接受(例如从内存地址)指令或命令,并根据该指令操作流体转移装置,通过在封闭空间里抽

出(用于吸入液体)或推进(用于推出液体)活塞转移液体样品。该处理器可被配置为促进抽吸和/或分配。所移动的空气体积和移动速度均可被例如该可编程处理器精确控制。

[0220] 对于样品(或试剂)与稀释剂(或其他试剂)的混合,可将需混合的组分抽吸入同一管中,然后重复地把相当部分的混合液体体积上下抽吸入吸头中,即可完成混合。可以相似的方式完成干燥试剂在管中的溶解。对于在结合有捕获试剂(例如抗体)的捕获表面培养液体样品和试剂,将合适的液体吸入吸头并将其保持在内一段预定的时间,即可完成。对于移除样品和试剂,把液体排出至所述装置的容器或吸收垫中即可。随后,可根据该可编程处理器发出的指令或程序将另一试剂吸入吸头中。

[0221] 系统可包括用于移动分析单元或吸头的支架或结合件。结合件可包括真空组件或设计用于紧紧插入分析单元吸头凸台的组件。例如,用于移动吸头的构件可以类似与流体转移装置头部的方式被移动。根据结合件或支架的位置,还可在一个台面上移动该装置。

[0222] 在一个实施例中,用于移动吸头的仪器与用于移动一定体积样品的仪器相同,如本文所述的流体转移装置。例如,样品采集吸头可通过该采集吸头上的凸台被插入移液器头部。随后,该采集吸头可被用于把液体分布在整个装置和系统中。当液体被分布后,可丢弃该采集吸头,而移液器头部可通过分析单元上的凸台被插入分析单元。该分析单元吸头随后可从试剂单元被移至试剂单元,而试剂可通过该移液器头部提供的抽吸或移液式动作被分布至该分析单元。该移液器头部还可通过抽吸或移液式动作在采集吸头、分析单元或试剂单元中进行混合。

[0223] 在另一实施例中,包含分析反应混合物等液体的吸头可从移液装置上断开,并“停留”在仪器中的特定位置或在一次性单元中。如有需要,可用密封件(与离心分离机中所用的相同)盖住吸头,以防止液体漏出。在一些实施例中,该密封件可为乙烯基密封件。

[0224] 样品吸头示例

[0225] 多种容器形状均可被用于样品吸头、反应室和试管。例如,试管可为圆形、圆柱形、方形、长方形、立方体、圆锥形、角锥形或任何其他能容纳液体样品的形状。可使用图63中俯视图和剖面图所示长方形试管,其中光束以垂直角度射入试管表面。在此类长方形试管中,被照射的液体样品也是长方形的,并由试管确定。还可使用具有圆形横截面的试管。例如,如图64中俯视图和剖面图所示,有些类型的微量滴定板中,被照射样品体积一部分由样品弯液面确定。

[0226] 不同路径长度的试管可被用于最优化并延伸分析响应,和最小化测定分析所要求的样品体积。试管的长度可长于其在至少一个区域中的横截面。在一些情况下,可根据试管几何形状和/或材料选定试管的路径长度。可为不同分析选定不同的试管。

[0227] 根据本发明,分析试管的一种优选版本在光束方向上具有圆形横截面,如图65所示。使用具有圆形横截面的试管有几个优点,包括但不限于:

[0228] 1.可精确定义光学路径长度。已发现注模成型部件的尺寸精确度优于1-2%CV。传统微量滴定板中不受约束的液体弯液面可造成路径长度的不精确度。

[0229] 2.吸头的开口特征和圆形横截面带来优异的液体处理特性,使得液体抽吸非常精确。

[0230] 3.根据吸头的光学图像可识别吸头位置和液体柱的边界,并非常精确地确定信号最大的吸头中心位置。

[0231] 4.同一吸头中可培养和分析多个液体样品。这是因为在吸头的狭窄部分,邻近液体“团”之间(沿轴向)基本没有材料转移。

[0232] 吸头示例可具有下列一般特征:

[0233] 吸头长度:0.5-4cm

[0234] 吸头外径:0.2-1.0cm

[0235] 吸头内径:0.1-0.5cm

[0236] 吸头液体容量:5-50uL

[0237] 吸头尺寸精确度:一般优于2%或 $\pm 0.001\text{cm}$

[0238] 吸头配置:吸头一般具有与(圆柱形)移液管配合的特征以形成液体密封。具有通常为圆柱形或圆锥形的区域以用于成像。一般地,吸头的光学部分具有至少两个有着不同路径长度的不同部分。吸头的低端通常较窄以便帮助在重力下保持垂直液体柱。

[0239] 吸头材料:透明或均匀反射的塑料(聚苯乙烯、聚丙烯等)(可见光透射率 $>80\%$ )

[0240] 出于成像目的,吸头通常可为透明或半透明的,不过当使用三色分析时,吸头不一定非要是透明的才能用作好的分析试管。看上去“模糊”的吸头试管可具有与透明吸头相似的性能。模糊吸头在具有未经抛光或不平质地表面的模具中注射成型或通过在制造吸头的塑料上加上光散射材料制成。可选定此类模糊吸头的光散射强度,使其不高到模糊要测量的有色液体的程度。一般而言,可选定光散射对所传输光线的作用,使其小于有色材料的作用的10、(20和30%)。可选定此光散射效应,使得模糊吸头具有均匀光散射。

[0241] 本文所述的吸头和反应室可由2cm长、内径大约1-5mm的圆柱形(或圆锥形)轴组成,对应于大约10-50uL的容量。

[0242] 在一个例子中,圆筒上端是一个与该圆筒流体相连的被截短的“台面”,且被设置成能够与移液管的渐缩特征相配合。吸头的底端可变窄,以提供使吸头能够在垂直位置且与移液管不相连时保持其液体内容的特征。吸头可为尖端吸头。吸头底端的外形通常也有些尖锐,其直径从圆柱形轴的主要部分到端部变小,以便能够被柔韧(乙烯基)盖流体密封,而吸头与该盖压配合。吸头通常由模制塑料(聚苯乙烯、聚丙烯等等)制成。吸头可为透明或半透明,以便可通过成像获取关于样品的信息。

[0243] 图4、图5和图6示出吸头示例。该吸头配置有(1)可与移液器头部配合形成气密密封的上部特征,(2)大体上为圆柱形(实际为圆锥形但其锥度非常小)的轴和狭窄、尖锐的底端。此吸头可与盖形成液体密封结构。该尖锐形状有助于稍微用力即与盖形状保持很好的一致。所用的材料是注模成型的聚苯乙烯。总体尺寸为:32mm长,最大外径约7.6mm,有用容量约20uL。吸头的尺寸可放大到更大的体积。例如,对于50uL样品,内径可增加约1.6倍。

[0244] 可使用乙烯或其他材料制成的盖实现密封,通过仪器台在z方向的移动产生的力,该盖很容易与样品盛放构件压配合。当吸头被盖上后,空气气泡可被封在吸头中。可通过离心步骤将该气泡驱至血柱顶部,以便消除气泡的影响。吸头的尺寸和/或离心分离机中吸头支架的尺寸可相匹配,使得吸头能在离心过程中被固定。

[0245] 样品准备

[0246] 本发明提供系统、方法和装置用于处理和分析可从多种来源采集的样品。例如,可从病人、动物或环境采集样品。样品可为体液。如被怀疑含有感兴趣的分析物,任何体液均可与本发明的系统或装置一起使用。通常采用的体液包括但不限于血液、血清、唾液、尿液、

胃液及消化液、眼泪、大便、精液、阴道液体、来自肿瘤组织的间液和脑脊髓液。

[0247] 在一些实施例中,体液是来自人类病人的血样。血源可采集自手指针刺,并具有小于0.5、1、5、10、20、50、100、200、300、400、500或1000uL的体积。

[0248] 体液可从病人抽取并以多种方式被提供至装置,这些方式包括但不限于切割、注射或移液。

[0249] 如本文所述,术语“对象”和“病人”在本文中可互换使用,并指脊椎动物,优选地哺乳动物,更优选地人类。哺乳动物包括但不限于鼠类、猿类、人类、农场动物、比赛动物和宠物。

[0250] 在一个实施例中,用柳叶刀划开皮肤,并通过例如重力、毛细管作用、抽吸或真空力取出样品。该柳叶刀可为装置的一部分,或系统的一部分,或为独立部件。如有需要,可通过多种机械、电、机电或任何其他已知的激活机制或此类方式的任何组合激活该柳叶刀。在另一不需要主动机制的实施例中,病人可简单地把体液提供给装置,例如,在唾液样品的情况下。被采集的液体可被放入装置中的样品采集单元中。在又一实施例中,该装置包括刺穿皮肤的至少一个显微针。

[0251] 用于装置的体液体积可少于约500微升,一般在约1至100微升之间。如有需要,1至50微升、1至40微升、1至30微升、1至10微升或甚至1至3微升的样品可被用于通过该装置检测分析物。在一个实施例中,用于通过标的装置或系统检测分析物的体液体积为一滴液体。例如,采自针刺手指的一滴血可提供本文所述的装置、系统或方法所要分析的体液样品。

[0252] 体液样品可从对象直接采集入本文所述的吸头中,或可稍后被转移至吸头中。

[0253] 样品稀释

[0254] 在一些例子中,命令流体转移的处理器配置使分析单元阵列中的体液样品得到一定程度的稀释以产生处在可检测范围内表示被检测的多种分析物的信号,从而使该多种分析物可被该系统检测。在一个示例中,体液样品包括至少两种分析物,其浓度相差至少1、2、5、10、15、50、100、500、1000、10,000、 $10^5$ 、 $10^6$ 、 $10^7$ 、 $10^8$ 、 $10^9$ 或 $10^{10}$ 倍。在一个示例中,体液样品为一滴血。在一个实施例中,样品中存在的至少两种分析物浓度相差高达10个数量级(例如,第一分析物为0.1pg/mL,而第二分析物是500ug/mL)。在另一示例中,发现有些蛋白质分析物的浓度超过100mg/mL,这会把所感兴趣的范围扩展了约12个数量级。在通过聚合酶反应等指数式扩增方法测量DNA和RNA等核酸分析物时,分析物副本数量可在测定前增加10亿倍。

[0255] 如有需要,体液样品稀释程度可使表示至少两种分析物的信号进入可检测范围内。

[0256] 本文所述系统和装置可在POC环境中实现实验室环境灵活性中的很多特征。例如,可在台面大小或更小的装置或系统中自动采集、处理样品。POC装置的一个共同问题是在进行多个分析时,实现不同的稀释范围,其中的分析可具有极为不同的灵敏度或特异性。例如,样品中可有两种分析物,但一种分析物在样品中的浓度很高,而另一种分析物的浓度极低。在此情况下,本发明的系统和装置可把样品稀释至极为不同的水平以便这两种分析物都被检测到。或者,样品可被分为两个或多个样品,使每种分析物能在不同的稀释水平上得到检测。

[0257] 例如,如果分析物有高浓度,则可对样品进行一系列的稀释,进入合适的检测范

围,并把样品提供给捕获表面进行检测。在同一系统或装置中,具有低浓度分析物的样品可不需要经过稀释。这样,与很多现有POC装置相比,POC装置和系统的分析范围就能得到扩展。

[0258] 在使用含有稀释剂的一次性药筒的POC分析系统中,稀释程度经常有实际限制。例如,如果通过手指针刺获得的小血样(例如,大约20微升)需要被稀释,而可被放入管中的稀释剂最大体积为250微升,则整个样品的实际稀释限制为大约10倍。在本文的一个示例中,系统可抽吸较小体积的样品(例如大约2微升),使最大稀释因子达大约100倍。对很多分析,这样的稀释因子是可以接受的,但是对CRP分析那样的分析(如此示例所述),需要将样品稀释更多倍。基于分离的ELISA分析在结合分析物的捕获表面的容量方面可有固有的限制(例如,对于典型的蛋白质分析物为大约数百ng/ml)。有些分析物在血液中的浓度可达数百微克/毫升。即使被稀释100倍,分析物浓度仍然超出校准范围。在本文所述系统、装置和流体转移装置的一个示范性实施例中,可通过向单个分析单元或样品采集单元进行稀释剂的多次流体转移而实现多次稀释。例如,如果分析物在样品中的浓度如上所述非常高,该样品可被稀释多次,直到该分析物的浓度达到可接受的检测范围。本发明的系统和方法可提供对稀释的精确测定或估计,以便计算分析物的原始浓度。

#### [0259] 样品分离

[0260] 在本发明的一些实施例中,可通过初始分离步骤准备样品用于分析。例如,如果要分析DNA,可采用DNA分离步骤以去除或减少污染物或不需要的源材料。该分离步骤可采用色谱法、离心法、液-液提取法、固-液提取法、亲和结合法或本领域技术人员已知的任何其他机制。

[0261] 在一些实施例中,对需要分析的血样,首步处理可为将血浆成分从血样中分离。此步骤可通过诸如过滤、离心和亲和结合等多种技术完成。离心可为一种分离血样成分的高效方法,且可被用于本发明中。

#### [0262] 血浆分离

[0263] 可通过多种方式把血液引入封闭式或可密封的吸头中,例如,可通过管子提供样品,而可密封的吸头可通过毛细管作用或气动力从该管中接受样品。一种优选引入方式是运用毛细管作用。或者,用于容纳样品以进行离心分离的容器可配置为仅具有一个开口,如同传统离心技术。

[0264] 当充满血液后,吸头可被自动移至一次性药筒中具有密封部件的一个位置。该密封部件可为由可变形(柔软)材料(乙烯、硅酮等)制成的小“盖”,该盖与吸头底端形状配合并密封该底端。吸头被仪器压入密封,由此形成防液体泄漏的连接。该被密封吸头随后被移至一台小型离心分离机(通常位于该仪器中并形成其一部分),并与离心转子的定位特征形成压配合,以便吸头的底(密封)端抵住一块将在离心步骤中支持该吸头的刚性搁板。

[0265] 离心转子可为圆形并具有约10cm直径。含血液的吸头质量(1)小于转子或者(2)在需要的情况下,由位于转子对面部分的配重加以平衡,由此把离心步骤中的震动降到最低。离心转子的一个示范性定位是垂直的(旋转轴水平)。该转子安装在驱动轴中并由电动马达驱动。

[0266] 离心可通过转子以约15000rpm旋转5分钟完成。在此过程中,血液中的特定成分(红细胞和白细胞)沉淀到吸头的密封端,并形成一根紧密压实的柱,而不含细胞的血浆被



分离至远离密封的吸头端。

[0267] 含有经分离样品的吸头随后可被垂直放置,包含安装在移液装置上的窄移液器吸头(“样品获取吸头”)的流体处理装置可到达其位置,而该移液装置则安装在x-y-z台面上。

[0268] 现在,可以高效地从经离心样品中获取血浆。将样品获取吸头沿离心吸头的轴线垂直移动,使其与血浆实现流体接触,然后通过例如气动方式向上抽取血浆,即可完成。

[0269] 可选地,可通过相机或其他成像装置监测此操作,此类装置可被用于测量样品红细胞比容,并向台面/移液器控制器提供有关血浆/红细胞界线位置的信息。在对经分离血液成像的帮助下,装在移液器上的窄移液吸头慢慢地垂直向下移动,使吸头沿样品容器轴线向下移动直到接触血浆。随后继续移动吸头直到其接近(距离小于约3、2、1、0.5或0.1mm)该压实细胞界面。同时,血浆在计算机控制下被吸入该窄移液吸头。可在把窄移液吸头移入血浆柱的同时抽吸血浆,使血浆不会被推到样品容纳构件的上部。可控制抽吸以避免在血浆移除步骤中吸入空气。

[0270] 一般而言,具有非常窄的末端的移液器吸头,比如用于在电泳系统中处理样品的吸头,可被用于从经离心的样品吸头抽吸血浆。该窄吸头通常为圆锥形或渐缩的,尺寸为1-3x0.1-0.5cm(长x直径),由多种材料(聚丙烯、聚苯乙烯等)中的任一种制成。该材料可为可见透明或半透明。吸头一端与移液装置配合。另一端非常窄(外径0.05-0.5mm),使其能在不接触样品吸头内表面的情况下进入样品吸头。即使血浆抽吸吸头和样品吸头有接触,也不会阻碍血浆抽吸。

[0271] 图7示出血浆抽吸过程,图示阶段是在抽吸步骤中,血浆抽吸吸头正位于血浆-压实细胞界面之上。

[0272] 这样,我们发现可去除几乎全部血浆,仅在经离心的样品吸头中留下例如1uL。这对应于从具有40%红细胞比容的20uL血液中获得大约11uL血浆(90%回收率)。另外,血浆样品(关于溶血、脂血和黄疸)的质量可通过该经离心的样品图像确定。

[0273] 被抽吸的血浆可被移至其他地点进行稀释和与分析试剂混合,以便进行对分析物的分析,分析物包括但不限于代谢物、电解质、蛋白质生物标记物、药物和核酸。

[0274] 白细胞分离

[0275] 本发明的另一用途是从血液分离并浓缩白细胞。在本发明的一个方面里,先通过向血液中加入并混合一种试剂(例如BD Pharmlyse™ 555899或BD FACS™裂解液349202),由此处理血样,使红细胞裂解(可选地,同时固定白细胞)。经过短暂的培养,对经裂解的样品如上所述进行离心处理,使得白细胞被浓缩在血液吸头的密封端。然后,被裂解的红细胞溶液可通过抽吸被去除。回收白细胞可通过以下一种方式完成(1)添加少量缓冲液,重复上下抽吸以再悬浮细胞,随后置换入容器中,或者(2)去除密封,通过气压将被压实的细胞向下置换入容器中。

[0276] 另一方案不经红细胞裂解回收白细胞。血液经过离心处理(为公知常识),白细胞在压实红细胞上方形成被称为白膜层的一层。在移除绝大多数血浆(如上所述)后,可高效地以下列方式回收白细胞(1)可选地加入少量体积(如大约5uL)的等渗缓冲液,或(2)使用剩余的血浆,并通过使用样品采集吸头重复抽吸和/或机械搅拌使白细胞再悬浮。可通过抽吸获取由此形成的悬浮白细胞混合物及也被再悬浮的一小部分红细胞,以用于白细胞分析。这样,可回收大部分(通常是全部)白细胞,且仅带有很少量(污染)的红细胞(通常少于

原量的5%)。

[0277] 离心分离机

[0278] 图1、图2和图3示出可被整合入系统中的离心分离机的按比例透视图(图1-侧视图;图2-正视图;图3-后视图)。该离心分离机可包括一台能够以15000rpm转动转子的电机。一种类型的离心转子形状有点像风扇叶片,安装在转子轴上并处于其垂直面上。支持样品容纳构件(吸头)的元件附接在转子上,该元件还提供吸头远离转子轴的一端可以放置其上的架子或搁板,由此在离心过程中提供支撑,使得样品无法脱离。吸头的近端还可由转子的一个机械挡块支持,由此使得离心过程中产生的力不会使吸头穿过其软乙烯盖。吸头可由标准拾取与放置装置,但优选地由移液器插入和去除。转子为单片丙烯酸(或其他材料),其形状可使离心分离机操作过程中的震动和噪声降到最低。转子的形状(可选地)使得当其定位与垂直方向形成特定角度时,仪器中其他可移动部件可越过离心分离机。该样品容纳构件由安装在转子对侧的配重实现离心平衡,这样旋转惯性的中心处于电机的轴向。离心分离机的电机可把位置数据提供给计算机,而该计算机随后可控制转子的停止位置(通常在离心前后是垂直的)。

[0279] 如图8和图9所示,为根据已公布的标准(DIN 58933-1;对于美国,则是CLSI标准H07-A3“微量血细胞比容法测定压实细胞体积的程序”;批准标准-第3版)使离心时间变得最短(而不会在离心过程中产生过高机械应力),方便的转子尺寸在约5-10cm的范围内,转速为约1-2万rpm,压实红细胞时间为约5分钟。

[0280] 计算离心力的示例性公式如下所示:

$$[0281] \quad RCF = \frac{r(2\pi N)^2}{g}$$

[0282] 其中:

[0283]  $g$ 是地球重力加速度,

[0284]  $r$ 是旋转半径,

[0285]  $N$ 是旋转速度,单位为单位时间的转数。

[0286] 其中:

[0287]  $r_{cm}$ 是按厘米(cm)测量的旋转半径,

[0288]  $N_{RPM}$ 是按每分钟转数(RPM)测量的旋转速度。

$$[0289] \quad RCF = 1.118 \times 10^{-5} r_{cm} N_{RPM}^2$$

[0290] 在一些实施例中,离心分离机可为具有摆动桶设计的水平放置的离心分离机。在一些优选实施例中,离心分离机旋转的轴线是垂直的。在替代实施例中,旋转轴线可为水平或任何角度。离心分离机能同时旋转两个或多个器皿,并可被设计为全面整合入运用计算机控制移液器的自动系统中。在一些实施例中,器皿可具有封闭式底部。该摆动桶设计可允许离心器皿在停止时,被动地定位在垂直位置,并在旋转时转出至一个固定角度。在一些实施例中,该摆动桶可允许离心器皿转出至水平方向。或者,它们可转出至位于垂直和水平位置之间的任何角度(如,偏离垂直约15、30、45、60或75度)。具有摆动桶设计的离心分离机可满足采用多个位置系统的机器人系统的位置准确度和可重复性要求。

[0291] 基于计算机的控制系统可使用光编码器提供的位置信息,以便以受控慢速旋转转

子。因为可为高速运转设计适当的电机,不需要仅依靠位置反馈保持准确的静止位置。在一些实施例中,可采用与电磁致动杠杆结合的凸轮,以便非常准确和稳定地停止在固定数目的位置上。通过一个单独的控制系统和电机内置霍尔效应传感器提供的反馈,转子的速度可在高速下得到非常准确的控制。

[0292] 因为多个灵敏仪器必须在分析仪器系统中同时运转,离心分离机的设计优选地最小化或降低震动。转子可按空气动力学设计并具有平滑外表-当离心桶位于水平位置时完全包裹离心桶。同时,在设计外壳时,可在多个位置采用减振器。

[0293] 转子

[0294] 离心分离机转子可为支持并旋转离心器皿的系统部件。旋转轴线可为垂直,因此转子本身可水平放置。但在替代实施例中,可采用不同的旋转轴线和转子位置。在转子的各侧具有被称为离心桶的两个部件,它们容纳离心器皿。可采用替代配置,其中离心桶按径向对称定位,例如三个离心桶按120度定位。可提供任意数量的离心桶,包括但不限于1、2、3、4、5、6、7、8或更多的离心桶。离心桶彼此之间可等距分开。例如,如果提供有n个离心桶,其中n是整数,则这些桶彼此之间可分开 $360/n$ 度。在其他实施例中,离心桶不需要等距分开或具有径向对称。

[0295] 当转子静止时,这些离心桶受重力影响会被动地落下,从而使器皿处于垂直位置,并使移液器能够进出器皿。图111示出当转子停止时,离心桶垂直的示例。在一些实施例中,离心桶会被动地落至一个可为垂直或不垂直的预定角度。当转子旋转时,离心桶受离心力进入近水平的位置或达到一个预定角度。图112示出当转子以特定速度旋转时,离心桶与水平线形成一个小角度的示例。对垂直和水平位置均可设有物理硬挡块,以实现其准确度和位置可重复性。

[0296] 转子可按空气动力学设计并具有盘状外形,并具有尽可能少的物理特征以便尽量降低空气湍流引起的震动。为实现这一点,离心桶的外部几何形状可与转子的外部几何形状严格匹配,这样当转子在旋转且离心桶可被转至水平时,离心桶和转子可完美地对齐。

[0297] 为方便血浆提取,转子可相对于水平朝地面向下形成一个角度。因为离心桶的角度可与转子角度匹配,这即可实现离心桶的固定旋转角度。根据该配置得到的沉淀物在器皿垂直放置时与其形成一个角度。可用一根窄提取吸头从离心器皿的上部抽吸血浆。把提取吸头置于靠近有角度的沉淀物形成的坡度底部,可更有效地提取最后部分的血浆,而不会搅动敏感的白膜层。

[0298] 装置的离心桶中可容纳多种管子设计。在一些实施例中,不同的管子设计可具有封闭端。有些形状类似于具有锥形底的常规离心管。其他管子设计可为圆柱形。高度与横截面积比较低的管子宜用于细胞处理。具有较大比率(>10:1)的管子可适用于红细胞比容的准确测量和其他成像要求。但是,任何高度与横截面积比均可采用。离心桶可由几种塑料(聚苯乙烯、聚丙烯)中的任一种或本文所讨论的任何其他材料制成。离心桶的容量在数微升至约1毫升的范围内。可使用一种“拾取与放置”机制插入并从离心分离机中拔出管子。

[0299] 控制系统

[0300] 因为离心装置的旋转和定位要求,可采用双控制系统方法。为标记转子的具体旋转定位,可执行一种基于位置的控制系统。在一些实施例中,该控制系统可采用PID(比例积分微分)控制系统。可采用本领域中已知的其他反馈控制系统。给位置控制器的位置反馈可

由高分辨率光编码器提供。对于从低速到高速操作离心分离机,可采用速度控制器,同时采用被调整用于速度控制的PID控制系统。给速度控制器的转速反馈可由一套置于电机轴上的简单霍尔效应传感器提供。各传感器可在电机轴每旋转一次的一个周期产生一个方波。

#### [0301] 停止机制

[0302] 可采用一种物理停止机制把转子始终如一地、牢固地定位在某一特定位置。在一个实施例中,该物理停止机制可使用与转子相连的凸轮以及电磁致动杠杆。该凸轮形状如同一个圆形盘,其周边切削有多个“C”形切口。为了定位离心转子,可先将其转速降至最高30RPM。在其他实施例中,转速可被降至任何其他值,包括但不限于约5rpm、10rpm、15rpm、20rpm、25rpm、35rpm、40rpm或50rpm。当速度降到足够低时,可开动杠杆。杠杆末端设有凸轮随动件,其可以最小摩擦力沿凸轮边缘滑动。当凸轮随动件到达凸轮上特定切口的中心时,电磁致动杠杆的力可压过电机的力,使得转子停下。在这一时刻,可以电子方式让电机刹车,并通过与该停止机制结合,旋转位置可被非常准确地、牢固地且无限地保持下去。

#### [0303] 离心桶

[0304] 甩出式离心桶可被配置为容纳不同类型的离心管。在优选实施例中,不同的管子类型可在其上(开口)端具有一个环或凸缘。此环或凸缘特征可放在离心桶的上端,并在离心过程中支持管子。如图113、114和115所示,可容纳各种长度和体积的锥形和圆柱形管子。图113、114和115示出可采用的离心桶和其他桶设计示例。例如,图113示出一个离心桶结构示例。该桶可具有与离心分离机紧密配合并让离心桶自由摆动的侧部。该桶可具有封闭式底和开放式顶部。图114示出与离心桶配合的离心分离器皿示例。如上所述,离心桶可具有接受各种离心分离器皿构造的形状。离心分离器皿的形状可具有一个或多个可放在离心桶上的突出部分。离心分离器皿的形状可具有一个或多个可与离心桶紧密配合的特征。此特征可为器皿的一个形状特征或一个或多个凸起。图115示出可与离心桶配合的另一离心分离器皿示例。如上所述,该离心桶可具有一个或多个形状特征,其可使不同的离心分离器皿构造与离心桶紧密配合。

#### [0305] 离心管和样品提取构件:

[0306] 离心管和提取吸头可单独提供,且可配合在一起用于在离心后提取材料。离心管和提取吸头可被设计在自动化系统中用于复杂处理。图116示出离心分离器皿示例。图117示出提取吸头示例。图118示出离心分离器皿与提取吸头怎样配合的示例。所提供的任何尺寸均仅用于示范,可使用同样或不同比例的其他尺寸。

#### [0307] 本系统可实现以下一种或多种:

[0308] 1. 对小血样(通常为5-50uL)的快速处理

[0309] 2. 红细胞比容的准确和精确测定

[0310] 3. 血浆的高效去除

[0311] 4. 有形成分(红和白细胞)的高效再悬浮

[0312] 5. 白细胞浓缩(在用荧光抗体标记和红细胞的固定及裂解之后)

[0313] 6. 红细胞裂解的光确定和白细胞回收

#### [0314] 离心分离器皿和提取吸头概述:

[0315] 定制器皿和吸头可被用于离心分离机的运行,以便满足该系统上的各种限制。离心分离器皿可为被设计用于在离心分离机中旋转的具有封闭式底的管子。在一些实施例

中,该离心分离器皿可为图116所示的器皿,或可具有图116所示的一个或多个特征。它可具有多个独特的特征以实现多种所需的功能,其中包括红细胞比容测定、RBC裂解和沉淀物再悬浮。在一些实施例中,提取吸头可为图117所示的吸头,或可具有图117所示的一个或多个特征。本文讨论了各吸头的示范性规格。

[0316] 离心分离器皿

[0317] 离心分离器皿可被设计用于处理两种不同的使用情况,每种都有一种不同的阻凝剂和全血容量。

[0318] 第一种使用情况可要求40uL全血,其中肝磷脂被沉淀,最大体积的血浆被回收,且使用计算机视觉测定红细胞比容。在60%或更低红细胞比容的情况下,需要的或优选的血浆体积可为约 $40\text{uL} \times 40\% = 16\text{uL}$ 。

[0319] 在一些实施例中,回收100%的血浆是不可能的,因为不得搅动白膜层,由此吸头底部和沉淀物的上部之间必须保持最小距离。可通过实验确定此最小距离,但可通过 $V(d) = d \times \pi \times 1.25\text{mm}^2$ 估计作为要求安全距离(d)函数的所牺牲的体积(V)。例如,在60%红细胞比容的情况下,对于0.25mm的要求安全距离,所牺牲的体积可为1.23uL。可通过减少离心分离器皿中红细胞比容部分的内部半径,减少此体积。但是,因为在一些实施例中,该窄部分必须完全容纳不得小于1.5mm的提取吸头的外部半径,离心分离器皿的现有尺寸可接近该最小值。

[0320] 除血浆提取外,一些实施例还可要求使用计算机视觉测定红细胞比容。为帮助这一程序,可通过最小化器皿的该窄部分的内径,使给定体积红细胞比容的总高度最大化。通过最大化高度,可最优化红细胞比容体积变化和柱高度物理变化之间的关系,由此增加可被用于测定的像素数目。还可使器皿的该窄部分具有充分的高度,以容纳80%红细胞比容的最不利情况,同时依然在柱顶部留下一小部分的血浆,以便进行高效提取。由此, $40\text{uL} \times 80\% = 32\text{uL}$ 可为准确测定红细胞比容需要的体积容量。所设计吸头的该窄部分的体积可为约35.3uL,其即使在最不利情况下亦可保持一些体积的血浆。

[0321] 第二种使用情况复杂得多,且可要求以下的一项、多项或全部:

- [0322] • 全血沉淀
- [0323] • 提取血浆
- [0324] • 沉淀在裂解液中再悬浮并染色
- [0325] • 剩余白细胞(WBC)沉淀
- [0326] • 去除上清液
- [0327] • WBC再悬浮
- [0328] • WBC悬浮被全部提取

[0329] 为完全再悬浮压实沉淀物,实验表明,可使用能够完全到达含有该沉淀物的器皿底部的吸头物理搅动沉淀物。用于再悬浮的器皿底部的优选几何形状看上去为类似标准商业PCR管的半球形。在其他实施例中,可使用其他器皿底部形状。离心分离器皿与提取吸头一起,可通过遵守这些几何要求被设计用于促进再悬浮过程,同时还使提取吸头能实际上接触到底部。

[0330] 在人工再悬浮实验中,注意到器皿底部和吸头底部之间的物理接触可产生阻止流体移动的密封。可使用精细间距以完全搅动,同时还允许液体流动。为在机器人系统中促进

这一过程,可在离心分离器皿底部增加一个物理特征。在一些实施例中,此特征可包括沿器皿的底部边缘放置的四个半球形小块。当提取吸头被全部插入器皿中,并可实现物理接触时,吸头末端可放在这些小块上,而液体可在小块之间自由流动。这可造成一小部分体积( $\sim .25\mu\text{L}$ )损失在间隙中。

[0331] 在裂解过程中,一些实施例中的最大预期液体体积为 $60\mu\text{L}$ ,该体积与被提取吸头置换的 $25\mu\text{L}$ 一起,可要求 $85\mu\text{L}$ 的总体积容量。现有 $100\mu\text{L}$ 的最大体积设计会超出此要求。第二种使用情况的其他方面要求类似或早已讨论过的吸头特征。

[0332] 离心分离器皿的上部几何形状可被设计与移液器喷嘴紧密配合。可使用本文其他地方描述的或本领域已知的任何移液器喷嘴。该器皿上部的外部几何形状可与反应吸头的外部几何形状严格匹配,现有喷嘴和药筒均可围绕该吸头设计。在一些实施例中,一条小突起可环绕该上部的内表面。此突起可成为最高液体高度的视觉标志,旨在利于使用计算机视觉系统进行自动错误检测。

[0333] 在一些实施例中,从完全配合的喷嘴底部到最高液体线的距离是 $2.5\text{mm}$ 。此距离比提取吸头所遵守的 $4\text{mm}$ 建议距离短 $1.5\text{mm}$ 。这一减少的距离可由最小化提取吸头长度,同时满足最小体积要求的需要造成。对此器皿的特定使用证明需要此减少的距离。因为在一些实施例中,液体可仅从上部与器皿进行交换,当其与喷嘴配合时可具有的最大液体为在任何给定时间所预期的最大全血量( $40\mu\text{L}$ )。此液体的高度可远低于喷嘴的底部。另一顾虑是,在其他时间,器皿中液体的体积可远大于此,且湿润高达喷嘴高度的壁。在一些实施例中,由使用器皿的人确保装在器皿中的任何液体的弯液面不超过最大液体高度,即使总体积小于所规定的最大值时也是如此。在其他实施例中,可提供其他特征以便把液体保持在器皿中。

[0334] 本文所提供的任何尺寸、大小、体积或距离均仅用于示例。可使用与本文所提数目可成比例或不成比例的任何其他尺寸、大小、体积或距离。

[0335] 在交换液体的过程及快速插入及拔出吸头的过程中,离心分离器皿可受到多个力。如果该器皿不经约束,有可能这些力足以提起或以其他方式把器皿移出离心桶。为了防止移动,该器皿应以一定方式固定。为实现这点,增加一条环绕器皿底部外围的环。这条环可很容易地与离心桶上的一个相配机械特征配合。只要小块的保持力大于液体操作中经受的力,但小于与喷嘴配合时的摩擦力,则此问题得以解决。

[0336] 提取吸头

[0337] 提取吸头可被设计与离心分离器皿连接,以高效地提取血浆并再悬浮沉淀细胞如有需要,其总长度(如 $34.5\text{mm}$ )可与另一血液吸头的总长度严格匹配,此另一血液吸头包括但不限于美国序列号12/244,723(通过引用被合并入本文)中所述的吸头,但可具有足够长度以物理接触离心分离器皿的底部。有些实施例中可能要求该接触离心分离器皿底部的能力,这都是为了再悬浮过程及为了全部回收白细胞悬浮。

[0338] 提取吸头的要求体积可根据预期其在任何给定时间需要从离心分离器皿抽吸的最大体积确定。在一些实施例中,此体积可为大约 $60\mu\text{L}$ ,这可少于 $85\mu\text{L}$ 的吸头最大容量。在一些实施例中,可提供具有大于要求体积的吸头。正如离心分离器皿,可采用环绕吸头上部内壁的一个内部特征来标记此最大体积的高度。该最大体积线和相配合的喷嘴顶部之间的距离可为 $4.5\text{mm}$ ,这可被认为是防止喷嘴污染的安全距离。可使用任何可防止喷嘴污染的充

足距离。

[0339] 离心分离机可被用于沉积已沉淀的LDL-胆固醇。可通过成像来证实上清液是澄清的,由此表明沉淀物去除完全。

[0340] 在一个示例中,血浆可被稀释(如1:10)入硫酸葡聚糖(25mg/dL)和硫酸镁(100mM)的混合物中,然后可培养1分钟以沉淀LDL-胆固醇。反应产物可被吸入离心管中,然后盖上盖子,以3000rpm旋转三分钟。图119、120和121分别示出原反应混合物在离心前(显示白色沉淀物)、离心后(显示澄清上清液)和LDL-胆固醇沉淀(去除盖子后)的图像。

[0341] 美国专利第5,693,233、5,578,269、6,599,476号和美国专利公开第2004/0230400、2009/0305392、2010/0047790号描述了可被运用在本发明中的其他离心分离机示例,这些专利文献经引用被全部合并以用于所有目的。

[0342] 程序示例

[0343] 很多程序变更可被用于离心分离和处理。例如,用于离心分离机处理和浓缩白细胞以进行血细胞计数的典型程序可包括以下一个或多个步骤。可以不同的次序提供下列步骤,或者其他步骤可替换任何下列步骤:

[0344] 1.接受10uL加有EDTA抗凝的血液(用移液器将血液注入离心桶底部)

[0345] 2.通过离心沉淀红细胞和白细胞(<5min x 10,000g)。

[0346] 3.通过成像测量红细胞比容

[0347] 4.通过吸入移液器缓慢地移除血浆(4uL,对应于最不利情况[60%红细胞比容]),而不搅动细胞沉淀。

[0348] 5.加入20uL含有溶于缓冲生理盐水+BSA(1mg/mL)的多达五种荧光标记抗体<sup>1</sup>的合适混合液后,再悬浮沉淀物(总反应体积约26uL<sup>2</sup>)。

<sup>1</sup> 浓度将经适当调整,以适应相对标准实验室方法的不同体积比(具体地,要低约5x)

<sup>2</sup> 如有需要,此体积可为更大,以获得最佳染色,但不超过50 uL。

[0349] 6.在37C培养15分钟。

[0350] 7.把红细胞裂解液(氯化铵/碳酸氢钾)与白细胞固定试剂(甲醛)混合,准备裂解/固定试剂。

[0351] 8.加入30uL裂解/固定试剂(总反应体积约60uL)。

[0352] 9.在37C培养15分钟

[0353] 10.通过离心沉淀白细胞(<5min,10,000g)。

[0354] 11.移除上清红细胞溶解液(约57uL)。

[0355] 12.加入8uL缓冲液再悬浮白细胞(等渗缓冲生理盐水)。

[0356] 13.准确测量体积。

[0357] 14.将样品(c 10uL)进行血细胞计数。

[0358] 这些步骤可包括接受样品。样品可为诸如血液等体液,或本文其他地方描述的任何其他样品。样品可具有小体积,如本文其他地方描述的任何体积测量值。在一些情况下,样品可含有阻凝剂。

[0359] 可采用一个单独步骤。例如,可进行基于密度的分离。此类分离可通过离心、磁场分离、裂解或本领域已知的任何其他分离技术完成。在一些实施例中,样品可为血液,而红细胞和白细胞可被分离。

[0360] 可进行测量。在一些情况下,该测量可通过成像或本文其他地方描述的任何其他检测机制完成。例如,可通过成像完成对已分离的血样测定红细胞比容。成像可通过数字相机或本文其他地方描述的任何其他图像捕捉装置完成。

[0361] 可移除样品中的一种或多种成分。例如,如果样品被分离成固体和液体成分,则液体成分可被移除。血样中的血浆可被移除。在一些情况下,诸如血浆等液体成分可使用移液器移除。可移除液体成分,而不搅动固体成分。成像可帮助液体成分或样品中任何其他被选成分的移除。例如,成像可被用于确定血浆所处位置,并可帮助移液器的定位以移除血浆。

[0362] 在一些实施例中,可向样品中加入试剂或其他材料。例如,样品的固体部分可被再悬浮。可加入带有标记的材料。可采用一个或多个培养步骤。在一些情况下,可加入裂解和/或固定试剂。可采用额外的分离和/或再悬浮步骤。如有需要,可进行稀释和/或浓缩步骤。

[0363] 可测量样品体积。在一些情况下,可以精确和/或准确的方式测量样品体积。可在具有如本文其他地方描述的变化系数值的低变化系数的系统中测量样品体积。在一些情况下,可使用成像测量样品体积。可捕捉样品图像,而样品体积可根据该图像计算。

[0364] 可对样品进行所需处理。例如,可对样品进行血细胞计数。

[0365] 在另一示例中,可利用或不利用离心分离机进行核酸纯化的典型程序可包括下列一个或多个步骤。系统可进行DNA/RNA提取,对核酸模板进行指数式扩增反应以便检测。该程序可被设计用于从多种样品中提取核酸,样品包括但不限于全血、血清、病毒转移介质、人类和动物组织样品、食物样品和细菌培养物。此过程可为完全自动化,并可以一致、量的方式提取DNA/RNA。可以不同的次序提供下列步骤,或者其他步骤可替换任何下列步骤。

[0366] 1. 样品裂解。可使用离液盐缓冲使样品中的细胞裂解。该离液盐缓冲可包括下列一种或多种:离液盐,包括但不限于3-6M盐酸胍或硫氰酸胍;具有典型浓度0.1-5%v/v的十二烷基硫酸钠(SDS),具有典型浓度1-5mM的乙二胺四乙酸(EDTA);具有典型浓度1mg/mL的溶解酵素;具有典型浓度1mg/mL的蛋白酶K;且可使用HEPES等缓冲把pH调整于7-7.5。在一些实施例中,样品可在典型温度20-95℃下在缓冲液中培养0-30分钟。可在裂解后,将异丙醇(50%-100%v/v)加入混合物中。

[0367] 2. 表面负载。经裂解的样品可暴露于功能化表面(经常以压实微球床的形式)上,例如但不限于压实在色谱式柱中的树脂载体、与样品以成批方式混合的磁性微球、样品经泵送通过流化床模式的悬浮树脂、样品经泵送通过封闭通道并以切向流方式流过表面。此表面可经功能化,以便在裂解缓冲液中结合核酸(如DNA、RNA、DNA/RNA混合物)。表面类型可包括硅石,以及二乙氨基乙醇(DEAE)等离子交换官能团。经裂解的混合物可暴露于此表面,而核酸结合。

[0368] 3. 清洗。采用0-2M氯化钠和乙醇(20-80%v/v)等盐溶液在pH 7.0-7.5清洗固体表面。清洗可用与负载相同的方式完成。

[0369] 4. 洗提。把表面在pH 7-9暴露于水或缓冲液中,可将核酸从表面洗提出来。洗提可用与负载相同的方式完成。

[0370] 本系统可采用这些程序的很多变更方式或其他程序。此类程序可与本文所述的任何程序或方式结合或替代使用。

[0371] 在一些实施例中,重要的是能够回收经离心压实和浓缩的细胞以便进行血细胞计数。在一些实施例中,可使用移液装置完成这点。液体(通常为等渗缓冲生理盐水、裂解剂、



裂解剂和固定剂混合物或缓冲液中的标记抗体混合物)可被分配入离心桶中,并被重复抽吸和再分配。移液器的吸头可强行进入压实细胞中,以促进此过程。通过客观地证实所有细胞均已被再悬浮,图像分析有助于此过程。

[0372] 使用移液器和离心分离机在分析前处理样品:

[0373] 根据本发明的一个实施例,本系统可具有移液、拾取与放置和离心功能。此等功能可对非常小体积的样品高效实现几乎任何类型的样品预处理和复杂的分析程序。

[0374] 具体而言,本系统可实现有形成分(红细胞和白细胞)与血浆的分离。本系统还可实现有形成分的再悬浮。在一些实施例中,本系统可从经固定和裂解的血液中浓缩白细胞。本系统还可裂解细胞以释放核酸。在一些实施例中,本系统可使用装有(通常为微球形式)固相试剂(如硅石)的吸头进行过滤,由此完成核酸纯化和浓缩。本系统还可在固相提取后进行经纯化核酸的洗提。本系统也可实现对沉淀物的去除和采集(例如使用聚乙二醇沉淀LDL-胆固醇)。

[0375] 在一些实施例中,本系统可实现亲和纯化。维生素D和血清素等小分子可被吸附于微球式(微粒)疏水性基质上,随后通过有机溶剂被洗提。抗原可被提供至被覆有抗体的基质上,并用酸洗提。同样方法可被用于浓缩发现具有低浓度的分析物,如凝血氧烷B2和6-酮-前列腺素F1 $\alpha$ 。抗原可被提供至被覆有抗体或适配体的基质上,然后被洗提。

[0376] 在一些实施例中,本系统可实现分析前的分析物化学修饰。例如,为分析血清素(5-羟色胺),可能要求使用试剂(如乙酸酐)把该分析物转化成衍生物(如乙酰化形式)。生成可被抗体识别的一种分析物形式即可实现这点。

[0377] 可使用移液器(真空抽吸和泵送)移动液体。移液器可被限于较低的正、负压(约0.1-2.0个大气压)。当需要强迫液体通过微球式固相介质时,可使用离心分离机生成高很多的压力。例如,使用半径为5cm、转速为10000rpm的转子,可产生约5,000x g(约7个大气压)的力,足以驱动液体通过压实床等有阻力的介质。可使用本文其他地方讨论或本领域已知的任何离心分离机设计和离心过程。

[0378] 可实现对非常小体积的血液测量红细胞比容。例如,廉价的数字相机即使在对比度较差的情况下也能对小物体拍出良好的图像。通过利用这一功能,本发明的系统可实现使用非常小体积的血液自动测量红细胞比容。

[0379] 例如,1 $\mu$ L的血液可被吸入带有微帽的玻璃毛细管。随后可使用可固化粘结剂密封此毛细管,再将其以10,000x g离心5分钟。可很容易地测量被压实细胞的体积,且血浆弯液面(如箭头所示)也是可见的,这样即可准确地测量红细胞比容。这使得本系统不需要浪费较大体积的血液来完成此测量。在一些实施例中,可按原样使用相机,而不使用显微镜,以取得较大的图像。在其他实施例中,可使用显微镜或其他光学技术放大图像。在一个实施例中,使用数字相机确定红细胞比容,而没有额外的光学干扰,而且所测量的红细胞比容与要求很多微升样品的传统微量血细胞比容实验室方法确定的数值相同。在一些实施例中,可非常精确地测量样品柱的长度和压实红细胞柱的长度(+/-<0.05mm)。因为血样柱可为约10-20mm,红细胞比容的标准偏差可远优于标准实验室方法取得的1%匹配。

[0380] 本系统可实现红细胞沉降率(ESR)的测定。数字相机测定非常小距离及距离的变化率的能力可被用于测定ESR。在一个示例中,三个血样(15 $\mu$ L)被吸入“反应吸头”。以两分钟的间隔在一小时内拍摄图像。图像分析被用于测定红细胞和血浆之间的界面移动。图122

示出界面离血浆弯液面的距离结果。

[0381] 可通过将数据代入多项式函数,并计算数据和拟合曲线(对于全部样品)之间差异的标准偏差,由此估计测量的精确度。在一个示例中,就一小时移动的距离而言,精确度被确定为0.038mm或<2%CV。相应地,可使用此方法精确测量ESR。确定ESR的另一种方法是测量距离与时间关系的最大坡度。

#### [0382] 分析准备

[0383] 在一些实施例中,吸头可被设计用于容纳多个反应或分析。可在本发明的一个吸头中同时进行数个不同分析混合物及一个或多个对照样或一个或多个校准物的测量。为了实现这点,我们利用了按顺序抽吸液体入同一吸头,以便对数个液体源取样的能力。通过按顺序抽吸小体积的空气和小体积的用于在抽吸下一个感兴趣液体之前清洗吸头表面的清洗液,极大地改善了有效的液体分段和分离。

[0384] 如上所述,吸头可具有锥形形状。在一些实施例中,分析可要求氧气作为反应物。在此类反应中,可通过将样品和/或分析混合物移入吸头较宽的部分以提高表面积对体积比,从而提高反应中氧气的可得性。

[0385] 在图93和图94中,溴酚蓝溶液被吸入吸头中。最上段(首先被吸)的6uL来自两倍稀释系列(最高浓度(0.0781mg/mL)在图像右侧,最左侧吸头中的水空白样除外)。随后,空气(2uL)、清洗液(2uL)分别被吸入,接着为6uL体积的固定浓度对照样液(0.625mg/mL)。

[0386] 使用这一方法,可实现数种替代分析配置,例如:

[0387] 1.同时测量试剂和/或样品空白及分析

[0388] 2.同时测量样品、空白样及对照样

[0389] 3.分析的吸头内校准

[0390] 下表显示一些“多路复用类型”,其中分析、对照样和校准物的优选组合是在吸头中组合完成的。

[0391]

多路复用类型	区 #											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	
	顶部										底部	
有对照样的分析	空气	对照样 1	空气	清洗	空气	分析	空气	清洗	对照样 2			
三个分析	空气	分析 1	空气	清洗	空气	分析 2	空气	清洗	空气	分析 3	空气	
校准系列	空气	校准 1	空气	清洗	空气	Cal2	空气	清洗	空气	校准 3	空气	
有空白样的分析	空气	分析	空气	清洗	空气	空白样	空气					

[0392] 图95示出第2种情况。

[0393] 还可使用单个吸头完成对空白溶液、样品、对照样和校准物的系列测定。对于此种情况,吸头装满第一溶液,读数,然后清空。随后,吸头再按次序装满其他样品,并进行读数。通过以下任一个或同时两个步骤,从一个样品到另一样品的有色产品“残留”造成的影响被降低到最小:

[0394] 1.对远离与前一样品首先接触部分的液体柱中部进行读数

[0395] 2.在样品之间清洗吸头。

[0396] 为测量从一端液体至下一段液体的“残留”程度,完成下列程序。少量(如6uL)高浓

度溴酚蓝(如0.625mg/mL)被吸入吸头,接着是2uL空气和2uL清洗液。最后,6uL连续两倍稀释的溴酚蓝被抽吸,获得下列结果(最高浓度(0.0781mg/mL)在右侧,最左侧吸头中为水空白样)。

[0397] 从图96所示图像和图97所示3色分析可看出,可测量数量的高浓度溶液被转移入清洗液。

[0398] 根据计算,平均残留(从高浓度对照样到水清洗液)为1.4%。实际上,因为较迟液体团的先头区域(靠近较早团)起第二次清洗步骤的作用,而且颜色读数是在远离此先头区域的位置(通常在该团的中心区域)进行的,从一个团到下一个团的有效残留通常远低于1%,因此一般地可忽略。当仅用稀释系列样品放入吸头,并由此测量稀释系列时,结果与上文中取得的结果相同。上述内容代表设计用于评估残留程度的“压力测试”。

[0399] 图98示出含有用于两个市场上可买到的离子钙 $\text{Ca}^{2+}$ (上段)和镁 $\text{Mg}^{2+}$ (下段)分析所用反应产物的吸头,它们被吸入吸头以便检测。在此实验中所用 $\text{Ca}^{2+}$ 浓度为0、2.5、5、10、20和40mg/dL; $\text{Mg}^{2+}$ 浓度为0、1.25、2.5、5、10和20mg/dL。分析反应混合物(6uL $[\text{Ca}^{2+}]$ 和4uL $[\text{Mg}^{2+}]$ )被2uL空气、3uL清洗液和又一4uL空气很好地分开。以这种方式读取的各分析结果大体上与每个吸头仅有一种分析反应混合物作出的测量结果相同。

[0400] 如上所述,本发明可以同时评估多个分析。可对同一视野中的很多分析试管成像。具体而言,可完成对分析及同一分析试管中的对照样的同时评估。也可完成对同一分析试管中的数项分析的同时评估。

[0401] 反应环境

[0402] 系统可包括用于加热分析或分析单元和/或控制分析温度的加热块。可在分析反应的培养步骤中采用加热,以促进反应并缩短该培养步骤所需的持续时间。系统可包括被配置为容纳本发明分析单元的加热块。该加热块可被配置为容纳来自本发明装置的多个分析单元。例如,如果一个装置上需运行8项分析,该加热块可被配置为容纳8个分析单元。在一些实施例中,可使用移动分析单元的构件移动分析单元,使其与加热块形成热接触。可使用本领域已知的加热构件完成加热。

[0403] 程序优化

[0404] 可通过多种方式优化用于分析样品的分析程序。当需要在一个样品上运行多项分析时,所有程序可被优化至最严格的反应条件,或者,可根据某一特定分析所需要的性能,优化各分析程序。

[0405] 在一些实施例中,单个程序可被设计成满足所有可能用途情况下的测试要求。例如,在多路复用药筒上,可根据将对该药筒上进行所有测试的情况(即限制情况),规定单个程序。此程序可被设计成满足最低测试要求,比如对该药筒进行的各测试的精确度和动态范围。但是,这种方法对替代用途的情况不是最佳,例如当对药筒将只进行一部分的测试时。在这些情况下,通过使用更多的样品,一些分析可在灵敏度和精确度方面提高性能。在为一项分析分配多少样品和分析灵敏度之间可进行权衡。例如,对于当样品被稀释1:100时灵敏度为1单位/mL的分析,如果稀释因子提高到1:10,则其可以检测0.1单位/mL。在具有被限制样品体积的多路复用分析系统中,使用较低稀释因子的一个缺点可为,即便用最小体积进行分析,此分析所需要的样品部分也增加了10倍。同样,通过使用较高的样品浓度可以提高分析精确度。例如,对于在其检测极限得到(如)0.1吸收率 $\pm 0.02$ (20%信号不精确

度)信号的分析,可通过使用10倍样品浓度加以提高,这样,当分析物浓度低十倍,信号为 $0.1+/-10.020D$ 时,所生成的信号高10倍,且在 $1.0, +/-0.02$ 的信号时,不精确度现在仅为2%。发生这种情况的原因是,分析信号(在较低分析物浓度范围)通常与分析物浓度成正比(因此与样品浓度成正比),然而信号不精确度通常可与信号的平方根相关,由此随着分析物浓度(和样品浓度)的平方根而增加。因此,信号的变化系数(CV)可与信号的平方根成反比;以至于信号10倍的增加对应于信号CV约3倍的减少。因为浓度CV通常与信号CV直接相关,浓度CV随着样品浓度的增加(稀释被降低)而降低。

[0406] 可按照具体的使用情况优化程序,而不是上述典型的一种尺寸适合所有需求的方法。例如,该程序可经优化以提高该多路复用装置中执行的各种测试的精确度。另外,有些测试相对于其他测试可有更高的优化优先度。对事先已知的使用情况,可预先计算程序优化。对事先未知的新使用情况,还可实时执行程序优化。可执行系统确认以囊括全套使用情况。

[0407] 以下通过比较两种用途情况描述程序优化的一个示例。这两种用途情况都提供8uL未经稀释的样品进行所需测试。在此示例中,多路复用装置筒上具有20项测试,其中5项测试需要稀释1:5,其他15项测试需要稀释1:25。

[0408] 在第一种用途情况中,要求对样品进行所有测试。此用途情况的程序(用途情况B)如下:

[0409] 1) 1:5稀释准备(8uL样品+32uL稀释剂)

[0410] 2) 1:25稀释准备(15uL 1:5样品+60uL稀释剂)

[0411] 3) 对各测试( $n=20$ ),把5uL经适当稀释的样品与10uL试剂混合。此程序在所有20个测试中的浓度不精确度为10%CV,符合最低要求。对各1:5稀释分析,样品用量为1uL,而对各1:25稀释分析,样品用量为0.2uL(总计 $5*1+15*0.2=8uL$ ,用完所有可用样品)。

[0412] 在具有相同药筒类型的第二种用途情况(用途情况B)中,仅要求对样品进行10项测试,而不是所有的20项测试。另外,所有这10项测试将在用途情况A的1:25稀释水平完成。程序针对此用途情况进行优化,以通过使用较低的稀释(1:5)最大化所有测试的精确度。此具体用途情况的优化程序如下:

[0413] 1) 1:5稀释准备(8uL样品+32uL稀释剂)

[0414] 2) 对各测试( $n=10$ ),把4uL经稀释的样品与11uL试剂混合

[0415] 样品用量为每次分析0.8uL未经稀释的样品,总计8uL。因为分析中的样品浓度相比用途情况A提高了5倍,分析灵敏度被提高5倍,而分析不精确度被降低约 $2.4(5^{0.5})$ 倍至约4.5%。

[0416] 通过再次优化程序,用途情况B在各项测试中使用了5倍原样品的量,由此提高了整体性能。请注意,上述讨论未计入因计量体积误差引起的不精确度,仅考虑了因光信号测量不精确度引起的误差。在用途情况B中,因体积不精确度引起的不精确度较低,因为其采用了较少的移液步骤。例如,如果在两种用途情况中,体积不精确度均为所报告的分析物浓度造成5%的不精确度,则用途情况A的总分析物不精确度为 $11.2\% (10^2+5^2)^{0.5}$ ,相比之下,用途情况B的总分析物不精确度为 $6.5\% (4.5^2+5^2)^{0.5}$ (按照通常正确的情形假设,导致分析不精确度的因子以各不精确度来源平方和的平方根方式相加)。

[0417] 可在基于冷光的分析情况中更容易看到上述效应,其中分析信号被表达为每单位

时间发出的光子数量。与例如放射性免疫分析中的辐射计数相同,信号不精确度等于信号的平方根,因此信号CV为 $100/(\text{信号平方根})$ 。例如,10000次计数的信号具有的CV将为1%。在生成光子的很多分析中(例如化学发光免疫分析法,信号与分析物浓度几乎严格成比例,至少在较低浓度范围内)。因此,对于远高于检测极限的浓度,所测量的分析物不精确度为 $1/(\text{信号平方根})$ 。所以,在使用样品稀释的分析中,所测量的分析物不精确度将为 $1/(\text{样品稀释})$ 。例如,使用1:100样品稀释的分析的信号和浓度CV是使用1:10样品稀释的分析的大约3.2倍( $10^{0.5}$ ) (而且还具有约10倍高的灵敏度)。

#### [0418] 反应化学

[0419] 可在本发明的流体装置上完成多种分析以检测样品中所感兴趣的分析物。在使用标记的分析中,可从本领域中可得的各种各样标记中选择一种可被用于执行标的分析的标记。在一些实施例中,标记可被分光、光化学、生物化学、电化学、免疫化学或其他化学手段检测。例如,有用的核酸标记包括荧光染料、电子致密试剂和酶。科学和专利文献中都大量报道有各种各样适合于标记生物成分的标记,其一般适用于本发明中以标记生物成分。合适的标记包括酶、荧光部分、化学发光部分、生物发光部分或有色标记。定义分析特异性的试剂可选地包括,例如单克隆抗体、多克隆抗体、适配体、蛋白质、核酸探针或其他聚合物,如亲和介质、碳水化合物或脂质。可使用多种已知方式中的任一种进行检测,这些方法包括对荧光或发光标记的分光光度或光学跟踪,或根据大小、电荷或亲和性跟踪单个分子的其他方法。可检测部分可以是具有可检测物理或化学特性的任何材料。凝胶电泳、柱层析、固体基质、分光光度技术等等领域已经很完善地开发出此类可检测标记,而且一般而言,可用于这些方法的标记可适用于本发明。因此,标记包括但不限于可被分光、光化学、生物化学、免疫化学、基于核酸探针、电、光热学或其他化学手段检测的任何组合物。

[0420] 在一些实施例中,根据本领域中熟知的方法,标记(如有色化合物、萤石或酶)与将要检测的分子直接或间接地结合。在其他实施例中,标记与分析物受体(如抗体、核酸探针、适配体等)连接。如上所示,各种各样的标记被使用,而标记的选择取决于所要求的灵敏度、化合物结合的容易程度、稳定性要求、可得的仪表、和处理规定。经常通过间接手段完成非放射性的标记连接。一般地,将特异于分析物的受体与生成信号的部分相连。有时,将该分析物受体与适配子分子(如生物素或亲和素)相连,成套分析试剂则包括结合部分(如生物素化试剂或亲和素)与适配子和分析物结合。分析物与反应位点上的特异受体结合。经标记的试剂可形成夹层复合物,其中分析物位于中间。试剂还可与分析物争夺反应位点上的受体或与未被分析物占据的反应位点上的空受体结合。标记为本身可检测,或与信号系统结合,该信号系统包括可检测酶、荧光化合物、化学发光化合物或诸如具有致发光基质的酶等致化学发光实体。可使用多个配体和反配体。当某一配体具有天然反配体时,比如生物素、甲状腺素、异羟基洋地黄毒甙元和皮质醇,其可与经标记的反配体一起使用。或者,任何半抗原或抗原化合物可与抗体组合使用。

[0421] 用作标记的所感兴趣的酶主要包括水解酶,尤其是磷酸酶、酯酶和糖苷酶,或氧化还原酶类,尤其是过氧化物酶。荧光化合物包括荧光素和其衍生物、罗丹明和其衍生物、丹磺酰基团及伞形酮。化学发光化合物包括二氧杂环丁烷、吡啶酯、发光素和2,3-二氢二氮杂萘二酮,比如发光氨。

[0422] 检测标记的方法为本领域技术人员熟知。因此,例如,当标记是荧光标记时,可使

用具有合适波长的光激发荧光物,并通过例如显微镜、目视检查、经由照相软片、使用数码相机、电荷耦合器件(CCD)或光电倍增器及光电管等电子检测器,或其他检测装置检测产生的荧光,由此检测该标记。同样地,通过为酶提供合适的基质,并以分光光度方式或通过数字成像(本发明标的)检测所得的反应产物,由此检测酶标记。最后,对于简单比色标记,经常只需观察与标记相关的颜色即可完成检测。例如,胶体金溶胶经常显粉红色,而掺杂燃料的各种微球呈强烈的色彩。

[0423] 在一些实施例中,可检测信号可由冷光源提供。术语“冷光”通常被用于表示从某一物质因任何除其温度升高外的原因而发出的光。一般地,当原子或分子从激发态跃迁至较低能量态(通常为基态)时,它们发射具有电磁能量(如光)的光子。如果激发剂是光子,该冷光过程被称为光致发光或荧光。如果激发原因是电子,该冷光过程可被称为电致发光。更具体地,直接注入和移除电子以形成电子空穴对,随后重组该电子空穴对,以发射光子,由此导致电致发光。因化学反应产生的冷光通常被称为化学发光。有活生物体产生的冷光通常被称为生物发光。如果光致发光是由自旋容许跃迁(如单线态-单线态跃迁、三线态-三线态跃迁)造成的,则该光致发光过程通常被称为荧光。一般地,短暂激发态可通过此类自旋容许跃迁很快地放松,由此消除激发原因,而荧光发射则不会持续。如果光致发光是由自旋禁戒跃迁(如三线态-单线态跃迁)造成的,则该光致发光过程通常被称为磷光。一般地,长效激发态仅可通过此类自旋禁戒跃迁放松,由此消除激发原因,而磷光发射在这之后仍持续较长时间。发冷光的标记可具有任一种上述特性。

[0424] 合适的化学发光源包括经化学反应被电子激发,然后可发射光线当作可检测信号或提供能量给荧光受体的化合物。已发现不同数量的化合物类在各种条件下化学发光。其中一类化合物为2,3-二氢-1,4-二氮杂萘二酮。一种经常使用的化合物是发光氨,即一种5-氨基化合物。该类的其他成员包括5-氨基-6,7,8-三甲氧基-和二甲氨基[ca]苯类似物。这些化合物可与碱性过氧化氢或次氯酸钙和碱发冷光。另一类化合物是2,4,5-三苯基咪唑类,其父级产品的通用名是洛粉碱。化学发光类似物包括对二甲基氨基和甲氧基取代基团。化学发光还可使用草酸盐和过氧化物在碱性条件下取得,草酸盐通常是对硝基苯基等草酰活性酯,而过氧化物的例子则为过氧化氢。其他已知的有用化学发光化合物包括-N-烷基吡啶酯和二氧杂环丁烷。或者,发光素可与萤光素酶或光泽精一起使用提供生物发光。特别优选的化学发光源是“致发光”酶基质,比如二氧杂环丁烷-磷酸酯。这些不发光,但是在碱性磷酸酶等磷酸酶的作用下,会生成发光产品。特别优选的是使用致发光酶基质,因为酶是能够每秒把数千基质分子转化成产品的放大物。发光方法也是优选的,因为它们可使用PMT非常敏感地、在很宽的动态范围上检测信号(光)。

[0425] 本文所用术语“分析物”包括但不限于药品、前药、药剂、药物代谢物、表达蛋白等生物标记物和细胞标记物、抗体、血清蛋白、胆固醇和其它代谢物、电解质、金属离子、多糖、核酸、生物分析物、生物标记物、基因、蛋白质、激素或其中任意组合。分析物可以是多肽、糖蛋白、多糖、脂质和核酸的组合。

[0426] 本系统可被用于检测和/或量化各种分析物。例如,可被检测和/或量化的分析物包括白蛋白、碱性磷酸酶、ALT、AST、胆红素(直接)、胆红素(总量)、血尿素氮(BUN)、钙、氯化物、胆固醇、二氧化碳(CO<sub>2</sub>)、肌氨酸酐、 $\gamma$ -谷氨酰转肽酶(GGT)、球蛋白、葡萄糖、HDL-胆固醇、血红蛋白、高半胱氨酸、铁、乳酸脱氢酶、镁、磷、钾、钠、总蛋白质、甘油三酯和尿酸。可使

用光学、电或任何其他测量类型进行这些分析物的检测和/或量化。

[0427] 特别感兴趣的是与特定疾病或具体疾病阶段相关的生物标记物。此类分析物包括但不限于与自身免疫疾病、肥胖、高血压、糖尿病、神经元和/或肌肉萎缩疾病、心脏病、内分泌障碍、代谢障碍、炎症、心血管疾病、败血症、血管生成、癌症、老年痴呆症、运动并发症和其中任何组合。

[0428] 还感兴趣的是以不同数量存在于受不同疾病影响的一个或多个身体组织中的生物标记物，这些身体组织包括心脏、肝、前列腺、肺、肾、骨髓、血液、皮肤、膀胱、脑、肌肉、神经和所选组织，疾病例如不同类型的癌症（恶性或非转移性的）、自身免疫疾病、发炎或萎缩疾病。

[0429] 还感兴趣的是指示微生物、病毒或衣原体的分析物。微生物示例包括但不限于细菌、病毒、真菌和原生动物。可被标的方法检测的分析物还包括选自表皮葡萄球菌、大肠杆菌、耐甲氧苯青霉素的金黄色葡萄球菌（MSRA）、金黄色葡萄球菌、溶血性葡萄球菌、粪肠球菌、绿脓假单胞菌、头葡萄球菌、瓦氏葡萄球菌、克雷白氏杆菌、流感嗜血杆菌、模仿葡萄球菌、肺炎链球菌和白色念珠菌组成的非限制性组的血源性病原体。

[0430] 可被标的方法检测的分析物还包括多种选自下列疾病的性传播疾病：淋病（淋病奈瑟氏菌）、梅毒（梅毒螺旋菌）、衣原体（沙眼衣原体）、非淋菌性尿道炎（解脲支原体）、酵母菌感染（白色念珠菌）、软性下疳（软性下疳嗜血杆菌）、毛滴虫病（阴道毛滴虫）、生殖器疱疹（HSV第I和II型）、HIV I、HIV II和甲、乙、丙、庚型肝炎，以及由TTV引起的肝炎。

[0431] 可被标的方法检测的更多分析物包括多种呼吸道致病菌，包括但不限于绿脓假单胞菌、耐甲氧苯青霉素的金黄色葡萄球菌（MSRA）、克雷白氏杆菌、流感嗜血杆菌、金黄色葡萄球菌、嗜麦芽寡养单胞菌、副流感嗜血杆菌、大肠杆菌、粪肠球菌、沙雷氏杆菌、副溶血性弧菌、阴沟肠杆菌、白色念珠菌、卡他莫拉菌、肺炎链球菌、弗氏枸橼酸杆菌、尿肠球菌、产酸克雷伯菌、荧光假单胞菌、脑膜炎奈瑟菌、酿脓链球菌、卡氏肺囊虫肺炎、克雷伯氏肺炎菌、嗜肺军团菌、肺炎支原体和结核分枝杆菌。

[0432] 本发明更多的示范性标记物如下所列：茶碱、CRP、CKMB、PSA、肌红蛋白、CA125、黄体酮、TxB2、6-酮-PGF-1- $\alpha$ 和茶碱、雌二醇、促黄体素、甘油三酯、类胰蛋白酶、低密度脂肪蛋白胆固醇、高密度脂肪蛋白胆固醇、胆固醇、IGFR。

[0433] 示范性肝标记物包括但不限于LDH、(LD5)、谷丙转氨酶（ALT）、精氨酸酶1（肝类型）、 $\alpha$ -胎蛋白（AFP）、碱性磷酸酶、乳酸脱氢酶和胆红素。

[0434] 示范性肾标记物包括但不限于TNF $\alpha$ 受体、胱抑素C、脂蛋白型尿前列腺素D、合成酶（LPGDS）、肝细胞生长因子受体、多囊蛋白2、多囊蛋白1、纤维囊蛋白、尿调节素、丙氨酸、氨肽酶、N-乙酰基-B-D-氨基葡萄糖苷酶、白蛋白和视黄醇结合蛋白（RBP）。

[0435] 示范性心脏标记物包括但不限于肌钙蛋白I（TnI）、肌钙蛋白T（TnT）、肌酸激酶（CK）、CKMB、肌红蛋白、脂肪酸结合蛋白（FABP）、C反应蛋白（CRP）、纤维蛋白原D-二聚体、S-100蛋白、脑促尿钠排泄肽（BNP）、NT-proBNP、PAPP-A、髓过氧化物酶（MPO）、糖原磷酸化酶同工酶BB（GPBB）、凝血酶激活纤溶抑制物（TAFI）、纤维蛋白原、缺血修饰白蛋白（IMA）、心肌营养蛋白1和MLC-I（肌球蛋白轻链-I）。

[0436] 示范性胰脏标记物包括但不限于淀粉酶、胰腺炎相关蛋白（PAP-1）和再生蛋白（REG）。

[0437] 示范性肌肉标记物包括但不限于肌抑素。

[0438] 示范性血液标记物包括但不限于促红细胞生成素 (EPO)。

[0439] 示范性骨标记物包括但不限于骨I型胶原交联氨基端肽 (NTx)、骨胶原交联羧端肽、赖氨酸-吡啶啉 (脱氧吡啶啉)、吡啶啉、抗酒石酸盐酸性磷酸酶、I型前骨胶原羧基末端前肽、I型前骨胶原氨基末端前肽、骨钙蛋白 (骨glc蛋白)、碱性磷酸酶、组织蛋白酶K、COMP (软骨低聚物基质蛋白)、骨织素、骨保护素 (OPG)、RANKL、sRANK、TRAP 5 (TRACP 5)、特异性成骨细胞因子1 (OSF-1, 多效蛋白)、可溶性细胞黏附分子、sTfR、sCD4、sCD8、sCD44和特异性成骨细胞因子2 (OSF-2, 骨膜素)。

[0440] 在一些实施例中, 本发明的标记物具有疾病特异性。示范性癌症标记物包括但不限于PSA (总前列腺特异性抗原)、肌氨酸酐、前列腺酸性磷酸酶、PSA复合物、前列腺特异性基因1、CA 12-5、癌胚抗原 (CEA)、甲胎蛋白 (AFP)、hCG (人绒毛膜促性腺素)、抑制素、CAA卵巢C1824、CA 27.29、CA 15-3、CAA乳房C1924、Her-2、胰脏、CA 19-9、CAA胰脏、神经元特异性烯醇化酶、癌细胞血管阻断素DcR3 (可溶诱捕受体3)、内皮抑素、Ep-CAM (MK-1)、自由免疫球蛋白κ轻链、自由免疫球蛋白λ轻链、Herstatin、嗜铬粒蛋白A、肾上腺髓质素、整联蛋白、上表皮生长因子受体、上表皮生长因子受体-酪氨酸激酶、肾上腺髓质素前体N端20肽、血管内皮生长因子、血管内皮生长因子受体、干细胞因子受体、c-试剂盒/KDR、KDR和中期因子。

[0441] 示范性传染病状况包括但不限于: 病毒血症、细菌血症、败血症, 和标记物: PMN弹性蛋白酶、PMN弹性蛋白酶/α1-PI复合体、表面活性物质蛋白D (SP-D)、HBVc抗原、HBVs抗原、抗HBVc、抗HIV、抑制性T细胞抗原、T细胞抗原比率、辅助T细胞抗原、抗HCV、热原、p24抗原、胞壁酰二肽。

[0442] 示范性糖尿病标记物包括但不限于C肽、血红蛋白A1c、糖化白蛋白、晚期糖基化终产物 (AGE)、1,5-脱水葡萄糖醇、抑胃多肽、葡萄糖、血红蛋白A1c、ANGPTL3和4。

[0443] 示范性炎症标记物包括但不限于类风湿病因子 (RF)、抗核抗体 (ANA)、C反应蛋白 (CRP)、克拉拉细胞蛋白 (子宫球蛋白)。

[0444] 示范性过敏标记物包括但不限于总IgE和特异性IgE。

[0445] 示范性自闭症标记物包括但不限于血浆铜蓝蛋白、金属硫蛋白、锌、铜、B6、B12、谷胱甘肽、碱性磷酸酶和阿朴-碱性磷酸酶的激活。

[0446] 示范性血凝障碍标记物包括但不限于b-血小板球蛋白、血小板因子4、温韦伯氏因子。

[0447] 在一些实施例中, 标记物可特定于治疗。指示COX抑制剂作用的标记物包括但不限于TxB2 (Cox-1)、6-酮-PGF-1-α (Cox 2)、11-脱氢-TxB-1a (Cox-1)。

[0448] 本发明的其他标记物包括但不限于瘦素、瘦素受体和原降钙素、脑S100蛋白、物质P、8-异-PGF-2a。

[0449] 示范性衰老标记物包括但不限于神经元特异性烯醇化酶、GFAP和S100B。

[0450] 示范性营养状态标记物包括但不限于前白蛋白、白蛋白、视黄醇结合蛋白 (RBP)、铁传递蛋白、促酰化蛋白 (ASP)、脂联素、刺鼠相关蛋白 (AgRP)、血管生成素样蛋白4 (ANGPTL4, FIAF)、C肽、AFABP (脂肪细胞型脂肪酸结合蛋白, FABP4)、促酰化蛋白 (ASP)、EFABP (表皮脂肪酸结合蛋白, FABP5)、肠高血糖素、胰高血糖素、胰高血糖素样肽1、胰高血糖素样肽2、生长素释放肽、胰岛素、瘦素、瘦素受体、PYY、RELMS、抵抗素和sTfR (可溶性铁传



递蛋白受体)。

[0451] 示范性脂质代谢态标记物包括但不限于载脂蛋白(数个)、Apo-A1、Apo-B、Apo-C-CII、Apo-D、Apo-E。

[0452] 示范性血凝状态标记物包括但不限于因子I:纤维蛋白原、因子II:凝血素、因子III:组织因子、因子IV:钙、因子V:促凝血球蛋白原、因子VI、因子VII:转变加速因子前体、因子VIII:抗溶血因子、因子IX:克雷司马斯因子、因子X:斯图尔特因子、因子XI:血浆促凝血酶原激酶先质、因子XII:哈格曼因子、因子XIII:纤维蛋白稳定因子、前激肽释放酶、高分子量激肽原、蛋白C、蛋白S、D-二聚体、组织纤溶酶原激活物、血纤维蛋白溶酶原、a2-抗纤溶酶、纤溶酶原激活物抑制剂1(PAI1)。

[0453] 示范性单克隆抗体包括用于EGFR、ErbB2和IGF1R的抗体。

[0454] 示范性酪氨酸激酶抑制剂包括但不限于Ab1、Kit、PDGFR、Src、ErbB2、ErbB 4、EGFR、EphB、VEGFR1-4、PDGFRb、FLt3、FGFR、PKC、Met、Tie2、RAF和TrkA。

[0455] 示范性丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂包括但不限于AKT、阿罗拉A/B/B、CDK、CDK(pan)、CDK1-2、VEGFR2、PDGFRb、CDK4/6、MEK1-2、mTOR和PKC- $\beta$ 。

[0456] GPCR目标包括但不限于组织胺受体、血清素受体、血管紧缩素受体、肾上腺素受体、蕈毒碱乙酰胆碱受体、GnRH受体、多巴胺受体、前列腺素受体和ADP受体。

[0457] 胆固醇

[0458] 代谢物的测定可通过使用氧化酶(如胆固醇氧化酶)(以制造H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)和辣根过氧化物酶,加上一种色原体(如N-乙基-N-(2-羟基-3-磺丙基)-3,5-二甲氧基苯胺、钠盐[“DAOS”加上氨基安替比林]以形成有色产物,如Trinder染料)生成有色产物完成。此化学的一个示例如图52和图53所示。

[0459] NADH或NADPH

[0460] 临床分析中经常生成或消耗NADH或NADPH。这是因为这些辅酶是酶的常用基质。例如,对乳酸脱氢酶(LDH)等临床感兴趣的酶的测定可通过NADH生成速率完成。由于NADH在340nm吸收最多的光,且(1)聚苯乙烯和其他塑料在近紫外发光不希望有的,(2)白光源在近紫外基本上不产生光,和(3)相机和扫描仪传感器对近紫外光灵敏度较低,用三色图像分析测定NADH是不现实的。为了解决这个问题,可使用水溶性四唑(如WST-1(同仁分子技术公司))等四唑盐和1-甲氧基-5-甲基吩嗪硫酸甲酯盐(PMS)等“电子媒介体”,把NADH转化成有色产物。

[0461] 在一些实施例中,生成或消耗NADH或NADPH的分析可与允许进行比色测定法的其他反应配对。例如,通过使用吩嗪硫酸甲酯作为电子媒介体,NADH或NADPH可被用于还原2-(4-碘苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺苯基)-2H-四唑、单钠盐(WST-1)等化合物至下列有色甲月替染料,如图54所示。

[0462] 如图73所示,当以毫摩尔浓度混合NADH、WST-1和PMS时,产生一种黄色产物(标为混合物吸头中所示)。

[0463] 根据这种化学设立LDH分析。乳酸盐(mM)、NAD(mM)和LDH被混合,并在37°C培养10分钟,随后加入WST-1和PMS。对于图74所示LDH(1000IU/L)的两倍连续稀释(从左至右),LDH相对于OD 450nm值的剂量响应良好,如图75所示。

[0464] 碱性磷酸酶

[0465] 在其他实施例中,可使用对硝基苯基磷酸酯等发色基质测定使用碱性磷酸酶等酶的分析。酶反应可产生在碱性条件下呈黄色的对硝基苯酚。

[0466] 金属离子

[0467] 还可对诸如在金属离子和螯合染料间形成有色复合物,从而在结合时改变颜色的分析进行测定。例如,邻甲酚酞络合剂(如图55所示)与钙形成复合物,其具有与试剂不同的颜色。此类分析的一般方案是:螯合染料(颜色1)+ $M^{N+}$  $\rightleftharpoons$ 螯合染料: $M^{N+}$ :(颜色2)

[0468] 还可使用有金属针对性的酶测定金属离子分析的光学信号。例如,可通过针对钠的 $\beta$ -半乳糖苷酶活性,以邻硝基苯基半乳糖苷(ONPG)为基质,用酶方式测定钠离子。产物邻硝基苯基在405nm的吸收率与钠浓度成正比。

[0469] 酶联免疫吸附测定法

[0470] 可通过显色酶联免疫吸附测定法测定分析物。已知有很多分别使用辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶和 $\beta$ -半乳糖苷酶等酶及邻苯二胺、对硝基苯基磷酸酯和邻硝基苯基半乳糖苷等发色基质产生颜色的酶联免疫吸附测定法。

[0471] 荧光免疫测定

[0472] 还可进行荧光免疫测定。分析可采用具有荧光基质的酶等化学发光实体。例如,化学发光化合物包括二氧杂环丁烷、吖啶酯、发光素和2,3-二氢二氮杂萘二酮,比如发光氨。

[0473] 另外,合适的化学发光源包括经化学反应被电子激发,然后可发射光线当作可检测信号或提供能量给荧光受体的化合物。已发现不同数量的化合物类在各种条件下化学发光。其中一类化合物为2,3-二氢-1,4-二氮杂萘二酮。一种经常使用的化合物是发光氨,即一种5-氨基化合物。该类的其他成员包括5-氨基-6,7,8-三甲氧基-和二甲氨基[ca]苯类似物。这些化合物可与碱性过氧化氢或次氯酸钙和碱发冷光。另一类化合物是2,4,5-三苯基咪唑类,其父级产品的通用名是洛粉碱。化学发光类似物包括对二甲基氨基和甲氧基取代基团。化学发光还可用于草酸盐和过氧化物在碱性条件下取得,草酸盐通常是对硝基苯基等草酰活性酯,而过氧化物的例子则为过氧化氢。其他已知的有用化学发光化合物包括-N-烷基吖啶酯和二氧杂环丁烷。或者,发光素可与萤光素酶或光泽精一起使用提供生物发光。

[0474] 核酸扩增

[0475] 可执行的分析还包括核酸扩增。这些分析的示例为等温扩增和环介导等温扩增测定(LAMP)。核酸扩增可被用于为核酸目标物(基因等)等分析物生成可见浑浊、荧光或有色的分析反应产物。核酸扩增技术可被用于特定DNA和RNA目标物的等温扩增。Goto等人,“使用羟基萘酚蓝进行环介导等温扩增反应的比色检测”,生物技术,第46卷,第3期,2009年3月,167-172中描述了有关等温核酸扩增的更多信息。

[0476] 核酸扩增可被用于测定DNA,且当与反转录酶一起使用时,测定RNA。当反应开始后,即可通过与作为扩增副产物产生并释放出的焦磷酸盐反应的嵌入染料或显色试剂,检测到经扩增的产物。

[0477] 可通过颜色变化(增强)、荧光或浊度目视观察到此反应。可在不到1小时内检测到很少数量的DNA副本。在本发明中,使用三色图像分析可方便地读出此技术。如下所示,等温核酸扩增分析反应产物的图像可用下述方法测定:(1)背光照明(传输光学)测量光吸收率,(2)通过数字相机捕捉穿过反应产物传输的光图像,或(3)用UV源(或任何其他合适的光源)照射反应产物产生并通过数字相机捕捉的荧光图像。

[0478] 核酸扩增分析一般以“一锅法”形式完成,其中样品和试剂在密封试管中混合,并在高温下培养。在一些形式中,可通过光学特性的变化,实时监测此反应。在其他分析形式中,停止此反应,并在加入一种显色或荧光试剂后可目视观察到反应产物。本发明允许直接在反应容器中或在吸入本文所述的吸头后读取核酸扩增分析产物。

[0479] 浊度

[0480] 本发明还考虑光学浊度分析。例如,可通过测量小胶乳颗粒(50-300nm)凝集设立免疫测定。在这些分析中,颗粒可被覆一种抗原和/或抗体,当样品中加入诸如抗体或抗原等结合对应物时,凝集产生。可以直接(如颗粒上的抗体与多表位蛋白或生物标记物反应)或竞争模式(如颗粒上的药物半抗原和与样品中自由药物竞争的抗药抗体反应)设立分析。胶乳分散变得更加浑浊,而随着透光性降低,可使用3色光学测量浊度。

[0481] 同样,可测定基于大胶乳颗粒(直径约为1 $\mu$ m)凝集的分析或红细胞。分析配置与上述浊度分析相似,但是可使用软件解释凝集物的数量和大小,通过图像分析(扫描仪或相机测量)完成测量。

[0482] 反应化学所需试剂可被包含在上述药筒中,比如在移液器吸头中。可以液体或干燥、冻干或玻璃态储存试剂。

[0483] 本地化试剂

[0484] 在一些实施例中,反应位点的位置和配置是分析装置中的重要组成。大多数(如果不是全部的话)一次性免疫分析装置配有其捕获表面作为装置不可分割的部分。

[0485] 在一个实施例中,模塑塑料分析单元可在市场上获得或通过注模成型法制成,并具有精确的形状和大小。例如,特征尺寸可为0.05-3mm的直径或3至30mm的长度。可采用与被覆微量滴定板所用方法类似的方法在该单元上被覆捕获试剂,不过其优点是,它们可被置于一个大容器中进行批量处理,加入被覆试剂,使用筛子、支架等等处理并收回器件,并按需要进行清洗。

[0486] 分析单元(如包含本文所述吸头、吸头、容器或任何其他器皿)可提供刚性支撑,试剂可被固定在其上。还可选择分析单元以提供适合于与光交互的特性。例如,分析单元可用以下一种材料制成,比如功能化玻璃、Si、Ge、GaAs、GaP、SiO<sub>2</sub>、SiN<sub>4</sub>、改性硅或多种凝胶或聚合物中的任一种,比如(聚)四氟乙烯、(聚)偏二氟乙烯、聚苯乙烯、聚碳酸酯、聚丙烯、聚甲基丙烯酸甲酯(PMMA)、丙烯腈丁二烯苯乙烯共聚物(ABS)或其组合。在一个实施例中,分析单元包括聚苯乙烯。在一些实施例中,分析单元可由均质材料、非均质材料、覆层材料、涂层材料、掺杂材料和/或嵌入材料制成。根据本发明,可使用其他合适材料。透明的反应位点可更佳。另外,当有光学透射窗口使光线可到达光学检测器时,有利的是表面为不透明和/或优选地具有光散射性。在一些实施例中,该分析单元可由透明材料制成。或者,该分析单元的一部分可由透明材料制成。

[0487] 分析单元上可涂有试剂和/或其中掺杂有试剂。在一些实施例中,该试剂可为能够把反应物固定在捕获表面上的捕获试剂。该反应物可为细胞和/或分析物,或本文其他地方描述的任何其他反应物。在一些实施例中,该试剂可为作为细胞捕获剂的分子。细胞捕获剂可在液体传递过程中锚固在所需细胞的表面。在一些实施例中,该捕获试剂可为可与细胞膜互动的抗体、肽、有机分子(如,其可具有脂质链、亲脂性分子)、聚合物基质、蛋白质、蛋白复合材料、糖蛋白。捕获试剂可为分子、交联分子、纳米微粒、纳米结构和/或骨架。在一些实

施例中,可提供微结构,以成为容器中的分析机制。捕获试剂(可包括由分析单元材料形成的捕获结构)可允许细胞被栓住、约束和/或困住。

[0488] 捕获试剂可在处理中固定细胞等反应物。捕获技术可为化学、物理、电、磁性、机械、大小相关、密度相关或其任何组合。在一些实施例中,捕获试剂可被用于在所需位置浓缩细胞等反应物。例如,分析单元可被覆捕获试剂,其可使细胞被捕获至分析单元表面,由此在捕获表面浓缩细胞。捕获试剂可把被捕获的反应物保持固定在细胞表面。这可有助于在成像过程中,保持反应物(如细胞、分析物)静止。

[0489] 在对反应和/或检测具有长获取时间的应用中,固定反应物会有帮助。例如,多个成像应用可要求较长的曝光时间( $\sim 1$ 分钟)或对有激烈布朗运动的小物体( $< 1\mu\text{m}$ )成像。

[0490] 在一些实施例中,捕获试剂可由对成像具有很低或没有背景的材料制成。在一些情况下,分析单元的材料对成像具有很低或没有背景。可选择捕获试剂使其对成像和/或检测无干扰或仅具有很小的干扰。

[0491] 被固定在捕获表面的反应物可为对检测体液样品中感兴趣的分析物有用的任何东西。例如,此类反应物包括但不限于可与某一特定分析物反应的核酸探针、抗体、细胞膜受体、单克隆抗体、抗血清和适配体。可使用各种市场上可得的反应物,如大量专门为特定分析物开发的多克隆和单克隆抗体。

[0492] 本领域技术人员应理解,有很多方式能把不同反应物固定到可发生反应的支持上。此固定可为共价或非共价、通过连接子部分,或把它们栓到固定部分上。把核酸或者抗体等蛋白质分子附接到固体支持上的非限制性示范结合部分包括链酶亲和素或抗生素蛋白/生物素结合、氨基甲酸酯结合、酯结合、酰胺、硫酯、(N)-功能化硫脲、功能化马来酰亚胺、氨基、二硫化物、酰胺、脲结合等等。另外,可采用本领域已知的方法直接在玻璃等基质上给核酸附接甲硅烷基部分。还可通过为表面提供电荷-电荷耦合的聚L赖氨酸栓实现表面固定。

[0493] 在结合捕获表面的最后一步之后,可干燥分析单元。例如,可通过被动暴露于干燥大气中或使用真空歧管和/或应用通过歧管的干净干燥空气或通过低压冻干法,完成干燥。

[0494] 可使用任何技术将捕获表面加至分析单元。例如,捕获表面可漆上、印上、电喷射上、嵌入该材料、掺杂该材料或任何其他技术。捕获试剂可被涂至分析单元材料上、合并入该材料中、共同渗透该材料,或可用该材料制成。例如,捕获试剂等试剂可被嵌入可被用作传感器的聚合物基质中。在一些实施例中,一个或多个小颗粒,如纳米颗粒、微颗粒和/或微球,可被涂至和/或与试剂掺杂。在一些实施例中,捕获试剂可为分析单元材料本身的一部分,或可为加至该材料上的东西。

[0495] 在很多实施例中,分析单元被设计为让该单元能够采用大批量、快速制造工艺制造。例如,吸头可被安装在大规模阵列中,以便能成批地涂刷捕获表面至吸头中或其上。在另一示例中,吸头可被置于移动带或旋转台上,以进行连续处理。在又一示例中,一个大吸头阵列可被连接至真空和/或压力歧管上,以便进行简单处理。

[0496] 可在工艺中的任一点施加捕获试剂至分析单元上。例如,可在制造过程中施加捕获试剂至分析单元上。可在分析单元被装运至目的地前,施加捕获试剂至分析单元上。或者,可在分析单元被发运后施加捕获试剂至分析单元上。在一些情况下,可在服务地点等使用点施加捕获试剂至分析单元上。

[0497] 在一些实施例中,捕获试剂可覆盖分析单元的整个表面或区域。可在分析单元的内表面施加捕获试剂。在一些实施例中,捕获试剂可覆盖分析单元的一部分或零件。可把捕获试剂按某种图案施加在表面上。单元可具有部分表面施加有捕获试剂,部分表面没有施加捕获试剂。例如,可具有被涂刷和未被涂刷的区域。可根据如何施加捕获试剂的几何选择施加捕获试剂至表面上。例如,可以点、行、列、阵列、区域、圆圈、环或任何其他形状或图案施加捕获试剂。可在所需表面位置施加捕获试剂。

[0498] 可在一个分析单元上可选地施加多个捕获试剂。在一些实施例中,可施加多个捕获试剂,使得不同的捕获试剂不重叠(如,不把不同的捕获试剂施加到同一区域或地区)。或者,它们可重叠(如,可把不同的捕获试剂施加到同一区域或地区)。可在不同捕获试剂的区域中间提供或不提供不带任何捕获试剂的空间。不同的捕获试剂可被用于固定不同的反应物。例如,不同的捕获试剂可被用于在捕获表面上固定不同的细胞和/或分析物。通过在选择区域按图案使用多个捕获试剂,可从同一分析单元上检测多个反应物。在一些实施例中,可在一个分析单元的表面上施加2种或更多、3种或更多、4种或更多、5种或更多、7种或更多、10种或更多、15种或更多、20种或更多、30种或更多、40种或更多、70种或更多、100种或更多、150种或更多、200种或更多,或300种或更多不同的捕获试剂。可以任何图案或形状施加这些不同的捕获试剂。例如,可在一个分析单元的内表面上按阵列或连续环的形状施加不同的捕获试剂。例如,可在吸头、容器、器皿、试管或本文其他地方所述的任何其他器皿的内表面上施加不同的捕获试剂。

[0499] 不同捕获试剂在分析单元上的位置可在检测被捕获的反应物前即为已知。在一些实施例中,分析单元可具有一个标识符,其可指示分析单元类型和/或其中捕获试剂的图案。或者,不同捕获试剂在分析单元上的位置可在检测被捕获的反应物前为未知。可根据被捕获反应物被检测到的图案,确定不同捕获试剂的位置。

[0500] 可采用任何技术施加捕获试剂,如本文其他地方所述的那些技术。在一些情况下,可采用掩蔽或平版印刷技术施加不同的捕获试剂。

[0501] 本文对施加至分析单元的捕获试剂和/或涂层的任何描述均适用于本文其他地方所述的任何其他单元或器皿,包括但不限于吸头、容器、试管或试剂单元。

[0502] 试剂装配

[0503] 在本发明的很多实施例中,试剂单元是模块化的。试剂单元可被设计为能以大批量、快速的制造工艺制造。例如,可在大规模工艺中同时装填、密封很多试剂单元。可根据装置将要完成的分析类型,装填试剂单元。例如,如果一个用户需要与另一用户不同的分析,则可根据各用户的优先相应地制造试剂单元,而不要制造整个装置。在另一示例中,试剂单元可被置于移动带或旋转台上以便连续处理。

[0504] 在另一实施例中,试剂单元被直接容纳在装置外壳的孔中。在此实施例中,可对围绕单元的外壳区域进行密封。

[0505] 本发明的试剂包括但不限于清洗缓冲、酶基质、稀释缓冲、共轭物、酶标记的共轭物、DNA扩增物、样品稀释剂、清洗溶液、包括添加剂在内的样品预处理试剂,诸如去污剂、聚合物、螯合剂、白蛋白结合试剂、酶抑制剂、酶、抗凝剂、红细胞凝集剂、抗体等,或其他在装置上运行分析所需的材料。酶标记的共轭物可为用酶标记的多克隆抗体或单克隆抗体,该标记可在与合适基质反应时产生可检测信号。此类酶的非限制性示例有碱性磷酸酶和辣根

过氧化物酶。在一些实施例中，试剂包括免疫分析试剂。一般地，试剂，特别是当与液体混合时较不稳定的试剂，被单独存放在装置内部限定区域（例如，试剂单元）中。

[0506] 在一些实施例中，试剂单元包含大约5微升至大约1毫升的液体。在一些实施例中，该单元可包含大约20–200微升的液体。在又一实施例中，试剂单元包含100微升的液体。在一个实施例中，试剂单元包含约40微升的液体。试剂单元中的液体体积可根据正在运行的分析类型或所提供的体液样品类型而不同。在一个实施例中，不一定要预先确定试剂体积，但其必须多于已知最低值。在一些实施例中，试剂最初被干燥储存，然后在装置上运行的分析开始时加以溶解。

[0507] 在一个实施例中，可使用虹吸、漏斗、移液管、注射器、针头或其组合装填试剂单元。可通过一条装填通道和一条真空抽吸通道向试剂单元装填液体。可单独或作为大量制造工艺的一部分装填试剂单元。

[0508] 在一个实施例中，各单个试剂单元包括一种不同的试剂，以此作为彼此隔离试剂的手段。试剂单元还可被用于包含一种清洗溶液或基质。另外，试剂单元可被用于包含一种发荧光的基质。在另一实施例中，多种试剂被包含在同一试剂单元中。

[0509] 在一些情况下，装置的设置使分析单元和试剂单元能够在目标装置的一次用品被装配前进行预校准。

[0510] 适配体结合分析

[0511] 根据与样品中一种或多种分析物特异结合的结合元件使用，本发明可实现多种分析方法。一般地，作为一个结合对的成员，结合元件能够在存在有多个不同分子的情况下特异地、选择性地与该结合对中另一成员结合。结合元件的示例包括但不限于抗体、抗原、金属结合配合基、核酸探针和引物、本文所述的受体和反应物，及适配体。在一些实施例中，用于检测分析物的结合元件是适配体。术语“适配体”被用于指被选中有能力与一种或多种目标分析物特异结合的肽、核酸或其组合。肽适配体为亲和剂，通常包括在支架蛋白表面显示出一个或多个可变环域。核酸适配体为特异性结合低聚核苷酸，这是一种能选择性地与所想目标分析物形成络合物的低聚核苷酸。此络合是特异于目标的，因为诸如可与该目标分析物在一起的其他分析物的其他材料不会与该适配体以同样大的亲和力络合。众所周知，络合和亲和都是相对的；但是在本文上下文中，“特异于目标”指适配体与目标的结合亲和度远高于其与污染材料的结合。因此在本文上下文中，特异性的含义与适用于例如抗体的特异性含义相似。可采用任何已知方法制备适配体，包括合成、重组和纯化方法。另外，术语“适配体”还包括“次级适配体”，其包含源自两种或多种已知适配体与特定目标比较的共有序列。

[0512] 一般地，核酸适配体为约9至约35个核苷酸长。在一些实施例中，核酸适配体为至少4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、20个、25个、30个、35个、40个、45个、50个、55个、60个、65个、70个、80个、90个、100个或更多个残基长。尽管适配体的低聚核苷酸一般为单链或双链，但认为适配体有时可具有三链或四链结构。。在一些实施例中，核酸适配体是圆形的，比如按US20050176940所述。适配体的特异结合低聚核苷酸应包含序列赋予特异性，但可经侧面区域而被延伸，且可以其他方式被衍生或修饰。被发现与目标分析物结合的适配体可被分离、测序，然后被再次合成为常规DNA或RNA部分，或可为经修饰低聚体。这些修饰包括但不限于包含下列：(1)糖类的经修饰或类似形式（如核酸糖和去

氧核糖)；(2) 替代连接基团；或(3) 嘌呤和嘧啶碱的类似形式。

[0513] 核酸适配体可包括DNA、RNA、功能化或经修饰的核酸碱基、核酸类似物、经修饰或替代骨架化学,或其组合。适配体的低聚核苷酸可包含常规碱基腺嘌呤、鸟嘌呤、胞嘧啶和胸腺嘧啶或尿苷。术语“适配体”中包括合成适配体,其合并有嘌呤和嘧啶的类似形式。嘌呤和嘧啶的“类似”形式为本领域中熟知的形式,其中很多种被用作化疗剂。嘌呤和嘧啶类似形式的非限制性示例(即碱基类似物)包括氮丙啶基胞嘧啶、4-乙酰胞嘧啶、5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、5-羧甲基-氨基甲基尿嘧啶、肌核苷、N6-异戊烯腺嘌呤、1-甲基腺嘌呤、1-甲基假尿嘧啶、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N6-甲基腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基-尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫脲嘧啶、 $\beta$ -D-甘露糖Q核苷、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基-硫-N6-异戊烯腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲基酯、假尿嘧啶、Q核苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫脲嘧啶、2-硫脲嘧啶、4-硫脲嘧啶、5-甲基脲嘧啶、脲嘧啶-5-氧基乙酸、5-戊炔基-脲嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。在本发明中,在脱氧核糖核酸中使用脲嘧啶作为胸腺嘧啶的取代基(下称为“dU”)被认为是嘧啶的“类似”形式。

[0514] 适配体低聚核苷酸可包含本领域中熟知的核酸糖或去氧核糖的类似形式,包括但不限于2'取代糖,比如2'-O-甲基-、2'-O-烯丙基、2'-氟基-或2'-叠氮基-核酸糖、碳环糖类类似物、 $\alpha$ -异头糖、诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖的差向异构糖、吡喃糖、呋喃糖、景天庚酮糖、锁核酸(LNA)、肽核酸(PNA)、无环类似物和脱碱核苷类似物,如甲基核糖甙。

[0515] 适配体还可包括其合成中的中间体。例如,通常存在的任一种羟基可被磷酸酯基团、磷酸盐基团替代,被标准保护基团保护,或被激活以制备与额外的核酸或基质的额外连接。按惯例,5'端OH是自由基,但可被磷酸化;3'端的OH取代基也可被磷酸化。羟基还可被衍生成标准保护基团。一个或多个磷酸二酯连接可被替代性连接基团替换。这些替代性连接基团包括但不限于如下实施例:其中P(O)O被P(O)S(“硫代”)替换、被P(S)S替换(“二硫代”)、被P(O)NR<sub>2</sub>替换(“酰胺化”)、被P(O)R替换、被P(O)OR'替换、被CO替换或被CH<sub>2</sub>替换(“甲缩醛”),其中R或R'各自独立地为H或取代或未被取代的烷基(1-20C),可选地包含一个醚(—O—)连接、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基。

[0516] 可用于本发明的适配体的一个具体实施例是基于第5,270,163和5,475,096号美国专利所披露的RNA适配体,这些专利经引用被合并入本文。前述专利披露SELEX方法,该方法包括从候选低聚核苷酸混合物中作出选择,以及结合、隔离和扩增的逐步迭代,使用同样的通用选择方案,以实现所需的几乎任何结合亲和力和选择性标准。该SELEX方法以优选地包括随机化序列片段的核酸混合物为起始物,并包括以下步骤:将该混合物与诸如目标分析物的目标在有利于结合的条件下接触、把未结合的核酸与那些特异结合至目标分子的核酸隔离开、分离核酸-目标复合物、扩增从核酸-目标复合物被分离出的核酸以生成富含配基的核酸混合物,然后经过所需的多次循环,重复结合、隔离、分离和扩增的步骤以在目标分子上生成高度特异性、具有高亲和力的核酸配基。在一些实施例中,采用负向筛选,其中多个适配体被暴露于需要分析的样品中的分析物或可能与目标分析物一起被发现的其他材料,而只有不结合的适配体被留下。

[0517] 该SELEX方法包括识别高亲和力核酸配基,其中含有经修饰核苷酸以赋予配基经改善的特性,比如经改善的体内稳定性或经改善的递送特性。此类修饰的示例包括在核酸

糖和/或磷酸盐和/或碱基位置的化学取代。在一些实施例中,两个或多个适配体被连在一起以形成一个单个、多价适配体分子。多价适配体分子可包括一个适配体的多个副本,所有副本均瞄准同样的分析物,两个或多个不同的适配体瞄准不同的分析物或其组合。

[0518] 适配体可被用作诊断和预后试剂,如用于发现新颖疗法的试剂、用于监测单体药物反应的试剂,及用于发现新颖疗法目标的试剂。配体可被用于检测、修改或干涉或抑制一种或多种目标分析物的功能。本文所用的术语“分析物”包括但不限于药物、前药、药用成分、药物代谢物、生物标记物,如表达蛋白和细胞标记物、抗体、血清蛋白、胆固醇和其他代谢物、电解质、金属离子、多糖、核酸、生物分析物、生物标记物、基因、蛋白、激素,或其任何组合。分析物可为多肽、糖蛋白、多糖、脂质和核酸的组合。适配体可抑制基因产物的功能,其机理包括但不限于下列机理中的任何一种:(i) 调节蛋白-蛋白相互作用的亲和力;(ii) 调节蛋白在转录水平上的表达;(iii) 调节蛋白在转录后水平上的表达;(iv) 调节蛋白活性;和(v) 调节蛋白位置。可通过生化和基因手段确定肽适配体行为的精确机理,以便查明它们在与其它基因和基因产物的相互作用环境中的具体功能。

[0519] 适配体可被用于根据本文所述检测方案中的任一种检测分析物。在一个实施例中,适配体与基质共价或非共价结合。适配体可与之结合的基质的非限制性示例包括微阵列、微球、移液器吸头、样品转移装置、试管、毛细管或其他管、反应室或任何其他与标的检测系统兼容的合适形式。生物芯片微阵列生产可采用各种半导体制造技术,比如固相化学、组合化学、分子生物和机器人。通常采用的一种工艺是照相平版印刷制造工艺,用于生产单块芯片上具有数百万探针的微阵列。或者,如果探针是预先合成的,可通过微通道抽送、“喷墨”点样、模板冲压或光致交联等技术将它们附接至阵列表面。一个示范性照相平版印刷工艺首先在石英晶圆上涂一种光敏化合物,以防止石英晶圆与要制造的DNA探针的第一个核苷酸结合。可使用光刻掩模抑制或者允许光透射至晶圆表面的特定位置。然后,把表面与一种溶液接触,该溶液可包含腺嘌呤、胸腺嘧啶、胞嘧啶或鸟嘌呤,而结合仅在通过光照而被脱保护的那些玻璃区域发生。结合的核苷酸具有一个光敏保护基团,使得循环可以被重复。以这种方式,通过重复的脱保护和结合循环合成探针,由此制造微阵列。此工艺可被重复直到探针达到其全长。市场上可得的阵列通常以超过每个阵列130万个不同特征的密度制造。根据实验需求和所要求的每阵列探针数,每个晶圆可被分割成数十或数百个单个阵列。

[0520] 可使用其他方法生产生物芯片。生物芯片可为Langmuir-Bodgett膜、功能化玻璃、锗、硅、PTFE、聚苯乙烯、砷化镓、金、银、膜、尼龙、PVP或能够让氨基、羧基、Diels-Alder反应物、硫醇或羟基等官能团结合至其表面的任何其他本领域中熟知的材料。然后,这些基团可被共价地附接至交联剂,使得核酸配基的随后附接及其与目标分子的相互作用在溶液中进行,而不受生物芯片的妨碍。典型的交联基团包括乙二醇低聚体、二胺类和氨基酸。或者,可采用酶流程,如第20100240544号美国专利中所描述的,将适配体结合至阵列。

[0521] 在一些实施例中,适配体被结合至微球的表面。可被用于与低聚核苷酸结合的微球是本领域熟知的,并包括磁性、可磁化的和非磁性微球。可采用1、2、3、4、5、6、7、8、9、10种或更多种染料标记微球,以方便微球编码和识别结合于其上的适配体。可通过微球编码区分单个阵列中的至少个10、50、100、200、300、400、500、600、700、800、900、1000、1500、2000、5000或更多个不同微球,各微球对应于对一种不同分析物具有特异性的一种不同适配体。

[0522] 在一些实施例中,试剂被结合至诸如吸头的反应室表面。例如,吸头的内表面可被



覆有一种对某一单个分析物有特异性的适配体。或者,吸头的内表面可被覆有两种或更多种对不同分析物有特异性的适配体。当两种或更多种不同适配体被结合至同一吸头内表面时,该不同适配体中的每一种均可被结合至不同的已知位置,比如沿吸头轴在不同位置形成不同的有序环或带。在这种情况下,通过把样品抽吸上吸头,并让样品中的分析物与被覆在沿吸头的连续位置上的适配体结合,可分析同一样品中的多个不同分析物。然后,可目视观察结合情况,如本文所述,各条带在带图案中的位置对应于某一具体的已知分析物。

[0523] 在一些实施例中,一种或多种适配体与一种或多种目标分析物的结合可通过光学特征被检测。在一些实施例中,该光学特征是荧光。在一些实施例中,含有要分析的分析物的样品经标记化合物处理,与具有荧光标签的分析物形成共轭。然后,可通过荧光测量结合,以检测一种或多种分析物的存在及可选地,数量,如图136所示,与结合于阵列的适配体联合使用,及如图137,与结合于编码微球的适配体联合使用。在一些实施例中,使用标记化合物处理样品,以便与分析物通过连接子形成共轭。在结合之后,用荧光标签功能化该连接子,并通过荧光测量此阳性事件。在一些实施例中,适配体的分析物结合域被部分杂交至经荧光标记的互补探针。在与分析物结合之后,该互补探针被释放,导致荧光信号出现可光学测量的减弱。在一些实施例中,适配体经荧光标记,并被部分杂交至经荧光猝灭剂标记的互补探针,而荧光猝灭剂靠近荧光标记。在与分析物结合之后,该互补探针被释放,导致与适配体共轭的标记荧光出现可测量的增强。在一些实施例中,适配体被部分杂交至互补探针,该杂交封闭包含次级结构的域。在与分析物结合之后,该互补探针被释放,而该次级结构被提供给被用于生成可测量信号的嵌入染料。可用于检测一对结合对中适配体和分析物之间结合的标记可包括,例如,荧光素、四甲基罗丹明、得克萨斯红或本领域中熟知的任何其他荧光分子。在生物芯片上各地址检测到的标记水平将随被分析的混合物中目标分析物的数量而不同。

[0524] 在一些实施例中,被替代的互补探针与诸如生物素的一对亲和对中一个成员形成共轭。然后,一个可检测分子与诸如抗生素蛋白的该亲和对中另一个成员形成共轭。当测试混合物被施加到生物芯片上后,该共轭可检测分子被加入。生物芯片上各位点的可检测分子数量将与该测试混合物中存在的目标分子的数量呈反向变化。在另一实施例中,被替代的互补探针将被生物素标记,且能通过添加荧光标记的抗生素蛋白被检测;抗生素蛋白本身然后及被连至另一荧光标记的、生物素共轭的化合物。在被替代的低聚核苷酸上的生物素基团也可被用于结合与抗生素蛋白连接的报告子酶;然后,该酶将催化反应,使得可被检测的化合物分解。或者,该报告子酶将催化生成不溶产物,其将局部猝灭固有发荧光生物芯片的荧光。在被替代分析的另一实施例中,将使用诸如异羟基洋地黄毒甙元的免疫可检测探针标记被替代的互补探针。然后,该被替代的互补探针将被特异识别该探针的第一套抗体结合。这些第一抗体随后将被经荧光标记或与报告子酶共轭的第二套抗体识别和结合。这些样品的众多变化是本领域技术人员熟知的或现在将被他们了解。也可使用抗体和作为受体的适配体组合设立与双抗夹心间接ELISA法类似的分析。例如,可使用适配体功能化捕获表面,而检测试剂可为经酶标记的抗体。相反地,该抗体可位于捕获表面,而检测试剂为经标记的适配体。

[0525] 在一些实施例中,含有需分析的分析物的样品被分散至三维水凝胶基质中。该水凝胶基质可被激活,以共价地困住蛋白和小分子。当清洗过量和未结合的样品后,可引入荧

光标记的适配体,以检测存在的特定分析物,如图138所示。在一些实施例中,该三维水凝胶基质被分成小份或微孔,可向其中加入单个适配体,以便对存在的分析物进行特定分析。在一些实施例中,适配体被一套编码量子点或对应于独特签名的荧光标签标记。在一些实施例中,经标记的适配体与样品同时被加入该三维水凝胶基质中。

[0526] 在一些实施例中,在ELISA分析中使用适配体而不是抗体。一般地,样品被暴露于表面,且特异或非特异地与其结合。在夹心ELISA中,通过与结合至表面的第一抗体结合,分析物被特异地结合至该表面。在典型ELISA中,分析物不管是特异还是非特异结合,均通过与携有标记的第二抗体结合,随后被检测。在适配体ELISA中,该第一抗体、第二抗体或两者都被特异地分析物的适配体取代。

#### [0527] 样品和分析反应产物的图像分析

[0528] 在本发明的一些实施例中,样品和分析反应产物的分析可使用数字成像完成。分析试管可被排列好,进行测量,并在一次操作中被扫描或成像。在本发明的仪器系统中,这是通过机械部件自动完成的。分析试管位于药筒中的限定位置,并被移至扫描仪,同时保持同样的定位和间隔。图92所示曲线对应于整个试管宽度上的绿色通道响应。如图所示,试管边缘被很好地限定,与试管中部对应的位置也一样。

[0529] 扫描或成像获得的图像可为二维像素阵列,其中各像素包括与不同检测光谱区域(如红、蓝、绿)对应的多个强度值。可通过线扫描解释图像,线扫描可对应吸头的水平部分。如果吸头是圆形的,则对图像线扫描根据合适的函数进行反卷积,由此确定有效的吸收率。示例函数包括抛物线函数和用于圆的函数。在一些实施例中,可对在多个物理位置拍摄的同一吸头或样品的多个图像进行数据平均。

[0530] 在一个实施例中,提供传感器以确定检测到某一分析时,分析单元相对于检测器的位置。

[0531] 如图61和图62所示,溴酚蓝溶液被抽吸入一套圆锥形吸头中,并在前面照明(光源和检测器位于物体的同一侧)的条件下成像。对0.78mg/mL溶液的一系列小体积(5uL)稀释被用于图像上方的最高浓度。在图61中,左侧的吸头有样品位于圆锥形吸头最宽位置,然而右侧的吸头则把样品放在最窄处。图61中的图像通过扫描光学系统拍摄。

[0532] 图62示出使用背光配置(光源和检测器位于成像物体的对侧)。优选此背光配置,因为其获得更高的图像质量。

[0533] 如图61和图62所示,有色溶液的有效光学路径长度可通过改变吸头设计而改变。特别地,可在单个吸头中改变此路径长度,以提高对光吸收率(长路径长度)测量的灵敏度,或提高测量的动态区间。例如,可通过改变吸头直径改变路径长度。

[0534] 吸头设计的一个额外特征可使得分析能够读取非常少量体积的分析反应产物,从而要求非常少量体积的样品。通常,分析反应混合物在吸头的窄部被培养,液体/空气表面积对体积的比率很高,由此使蒸发降至最低。然后,可把该小体积移至吸头的宽部以测量有色产物,由此使给定反应混合物体积可得的光学路径长度最大(并由此提高光的吸收率)。

[0535] 例如,在下表中,我们比较对10uL分析反应混合物的读数,其中一个1uL样品被稀释1:10。在本发明的吸头中,可在一段13mm长、直径1mm的吸头区域培养反应混合物,然后将其移至3mm直径的区域进行颜色测量。与使用标准尺寸的微量滴定板(通常为384孔板)进行

培养和读取同样的分析比较,暴露在空气中的液体表面面积(允许蒸发)为约5倍小,而光学路径长度为约两倍大。

[0536]	样品体积	1.00	uL	
	稀释因子	10.00	倍	
	反应体积	10.00	uL	
	吸头			
	吸头直径	1.00	mm	用于培养
	暴露表面面积	1.57	mm <sup>2</sup>	用于培养
	液体柱长度	12.73	mm	用于培养
	吸头直径	3.00		用于读数的路径长度
	液体柱长度	1.41	mm	用于读数
[0537]	微量滴定板			
	孔直径	3.00	mm	
	暴露表面面积	7.07	mm <sup>2</sup>	
	液体柱长度	1.41	mm	路径长度

[0538] 优化光学路径长度

[0539] 传统上通过记录在最大吸收波长透过试管的光部分,对有色溶质进行光谱测量。数据随后被转换,得到吸收率(A)或光密度(OD)值。根据比耳定律, $A(\lambda_{\max}) = \epsilon M \cdot l \cdot \text{浓度}$ ,其中 $\epsilon M$ 是摩尔消光系数(L/摩尔·cm), $l$ 是光学路径长度(),而浓度是以摩尔单位计。对 $l=1$ , $OD=A$ 。这就完成了测量A,其与溶质浓度成直接正比。

[0540] 通过吸收率测量分析溶质浓度有两大限制。在低浓度,透射变化很小,背景(或空白样)传输的变化会因此造成不精确。在高浓度,透射很低(例如当 $A=3$ ,透射光是入射光的1/1000分之一。任何“偏离”的光或其他形式的信号噪声对测量都有重大影响,对浓度的响应变得非线性和不精确。通常认为吸收率测量在从约0.1到约2.0(20倍的范围)的范围内是精确和准确的。

[0541] 本发明的方法在很宽的动态范围内(高达1000倍)轻易实现对颜色的测量,由此在很大程度上克服了这些问题。

[0542] 1.不同的路径长度:低浓度可在长路径长度上测量,而高浓度则使用短路径长度。

[0543] 2.不同的颜色通道:低浓度可在最匹配的颜色通道里测量,而高浓度则使用颜色不匹配的颜色通道。

[0544] 图79中的数据说明了这一点。在吸头中两个位置,采用三色法分析从5mg/mL原液经连续稀释获得的溴酚蓝溶液,其中一个位置具有约5mm(“宽”)的最大路径长度,另一位置则为约1mm(“窄”)。三个颜色通道中的信号经归一化至其最高和最低水平,如下图所示。按下列步骤建立最优提取分析物(溴酚蓝)浓度的算法:

[0545] 1.对于10%最大值<信号<90%最大值范围内的归一化信号,计算浓度值 $= a + b \cdot \text{Log}(\text{信号}) + c \cdot (\text{Log}(\text{信号}))^2$ ,q其中为任意常数。对各种颜色在两种路径长度上都进行此

运算。

[0546] 2. 使用熟知的优化程序(例如, 微软Excel中的“Solver”), 对所有颜色和路径长度计算a、b和c的最佳拟合值。

[0547] 3. 对所有颜色和路径长度平均所计算的浓度值。

[0548] 如图80所示, 此方法在1000倍浓度范围内获得准确结果。当此算法被用于计算重复测量(N=3)的浓度值时, 平均CV为3.5%。

[0549] 可在不同路径长度上进行测量。在一些情况下, 路径长度至少部分取决于容器(如试管、吸头、小瓶)几何形状。容器几何形状和/或容器内的特征, 比如分散特征, 可影响容器内的光学路径和路径长度。

[0550] 多色分析

[0551] 扫描仪和相机具有能够测量多个不同颜色通道检测光谱区域(如红、绿、蓝)的检测器。因为这些通道各自的光谱宽度都很宽, 且颜色化学品生成具有宽带宽的有色产物, 可使用多个通道检测光谱检测有色反应产物。例如, 图71示出在红色(方形)、绿色(菱形)和蓝色(三角形)检测通道光谱的响应作为分析物浓度函数的图象。各检测器生成的信号对应于各检测光谱中的光强度, 且通常被表达为0至255的一个数字。如上所示, 当白光透射过含有有色溶质的圆截面试管时, 光被吸收, 光强度被减弱, 检测器相应随之改变。

[0552] 例如, 当溴酚蓝以0至5mg/mL的浓度溶解在碱性缓冲液中, 并在图62中注有“C3”的位置被扫描时, 图66所示信号为在对应于沿试管长度7个像素的区域加以平均的检测器响应。信号被记录在爱普生背光扫描仪上。图66示出对一套11个含有5mg/mL溴酚蓝溶液的2倍连续稀释液和一个“空白”液的试管(图中从左至右)。的三色响应。被扫描吸头的图像如图67所示。对应于溶液的各通道中的信号被减弱至与光学路径相关的程度。相应地, 在试管中部观察到最大信号变化。当试管中部区域的信号经平均(对于从左起第4个试管的小长方形标志的区域)并相对于溴酚蓝浓度绘制时, 可观察到图68所示的剂量-响应曲线。在各颜色“通道”中, 信号随浓度平稳下降。绿色信号改变最大, 蓝色信号最小。同时示出用M5光谱仪(分子装置)在具有最大吸收率的波长处(如589nm)测量的相应光密度。在最高浓度处, 光谱仪响应不再是线性的, 且几乎不随浓度而变化。扫描仪绿色和红色通道响应中观察到类似的效应。与之相反, 蓝色通道响应直到最高浓度都非常轻微。

[0553] 根据比耳定律, 溶液吸收率等于 $\epsilon \times \text{浓度} \times \text{路径长度}$ 。吸收率被定义为 $\text{Log}_{10}(\text{透射}/\text{空白透射})$ , 其中空白透射对应于溶剂的透射。严格而言, 比耳定律适用于垂直穿过长方形试管的平行单色光柱(在实践中为一条数nm宽的带)。光谱仪与浓度成线性响应, 直到大约1.5的吸收率值。对于更高的吸收率, 由于“偏离光”和其他效应, 仪器响应变成非线性。光密度被定义为1cm光学路径长度的吸收率。

[0554] 在常规光谱仪中, 根据线性化光透射的表达式转换上述实验获得的颜色信号数据, 以便获得与浓度成比例的吸收率值( $-\text{Log}(\text{信号}/\text{空白信号})$ ), 图69所示曲线来自绿色(方形)和红色(菱形)通道。

[0555] 绿色通道数据遵循比耳定律, 但红色通道数据不遵循, 对于大约2mg/mL的样品出现平稳水平, 其风格类似于光谱仪OD响应的风格。

[0556] 通过三色分析和光学路径长度优化提高分析使用率

[0557] 使用本发明可抢救否则会提供无法解释的数据的、得自反应装备的分析结果。本

发明通过组合光学路径长度优化和三色分析,扩展了分析的动态范围和灵敏度。因缩小的动态范围而无法抢救数据的困扰是分析管理中的一个重大问题,特别当出于诊断或治疗管理目的而被评估的样品具有下述背景,能以高置信度报告的分析动态范围或分析物值范围非常有限。有两个主要原因为什么无法从基于实验室的分析系统或从分布式测试情况获得分析结果。即,分析物值过高或过低,以致于无法报告。在一些情况下,可通过用不同的稀释再次分析所保留样品的一部分,由此在临床实验室纠正这点。在分布式测试中,除了召回病人,提取新样品并使用不同的(实验室)方法,没有别的方法。这是因为,分析系统采用固定程序和固定水平的样品稀释。在这两种情况下,纠正此问题都非常不便和昂贵。另外,与适当诊断和/或治疗管理相关的有价值信息可被遗失,给病人造成伤害。

[0558] 在本发明的系统中,这些问题通过下述方法被消除:在其执行过程中监测分析、发现任何问题,修改用于测量分析产物的光学路径长度,或利用三色通道对分析颜色及随之对分析物灵敏度的不同灵敏度水平。

[0559] 具体而言,当分析反应产物被测量时,如果所测量的信号过高或过低,系统可作出以下响应:

[0560] 1.采用不同的路径长度(相对于光学系统移动光学试管,使路径长度变大或变小)进行测量。这可通过下列步骤完成:(a)在一个标准的第一位置进行测量,(b)报告结果给管理分析的软件(在仪器中和/或远程服务器上),(c)发现问题条件,和(d)修改读数位置,并进行第二次测量;和/或

[0561] 2.强调信号分析中更敏感或更不敏感的通道。这可通过合适的分析算法自动完成。

[0562] 颜色校准

[0563] 信号响应可经校准以根据成像数据计算有色物种的浓度。可使用下列流程获取预测有色溶质浓度的数据转换。

[0564] 1.对所有浓度的各通道,计算转换 $-\text{Log}(\text{信号}/\text{空白信号})$ ,并被指定为“A”。

[0565] 2.对所有浓度,根据 $a \cdot A + b \cdot A^2 + c \cdot A^3$  (a、b和c的初值为任意值)计算另一转换(“C”), $-\text{Log}(\text{信号}/\text{空白信号})$ ,并被指定为“A”。

[0566] 3.对所有浓度,所有三色通道的C值被求和并被指定为 $C_{\text{总值}}$ 。

[0567] 4.对所有浓度计算目标(已知)浓度和 $C_{\text{总值}}$ 之间平方差的和。

[0568] 5.采用最小化该平方差的熟知算法导出所有通道的a、b和c参数值。

[0569] 图70所示结果显示在整个浓度范围内,对扫描仪响应的准确校准。

[0570] 已开发出其他自动校准算法,并发现它们同等有效。例如,以下是对在反应吸头中完成的胆固醇分析进行的校准示例。

[0571] 被测量的信号被分解成红(R)、绿(G)和蓝(B)色通道。计算校准公式以根据分析设计要求优化准确度、精确度和动态范围。

[0572] 在此分析示例中,只有红和绿色通道被用于计算浓度。这两个信号被转换成计算中间变量(F),如下所示:

[0573]  $F = p_1 + p_2 \cdot G + p_3 \cdot G^2 + p_4 \cdot R + p_5 \cdot R^2$ ;

[0574] 其中 $p_i$ 是校准参数。

[0575] 最后,信号F经由线性转换被用于计算浓度(C)。

[0576]  $C = (F - p_6) / p_7$

[0577] 其中C是计算浓度,  $p_6$ 和 $p_7$ 是校准参数,在该情况中,分别代表线性关系的截距和坡度参数。

[0578] 当用于多种分析物的一大套分析生成覆盖整个可见光谱的有色产物( $\lambda_{\text{最大}}$ 在400–700nm范围内),且同样的方法被用于该套分析时,获得可比较的结果。

[0579] 在传统透射光谱测量中,“空白”值被用于测量的归一化。方法(1),通常通过测量与样品相同但不含任何要测定成分的样品构造空白样。该测量通常在用于样品的同一试管或一个光学相同的试管中进行。因此在光谱分析中,可使用相同的程序,把所有试剂在同样的浓度下组合起来,用零分析物溶液替代样品。方法(2)使用两步程序,对空气等绝对标准(其永远不会改变吸收率)进行测量,然后以该绝对标准为准,测量样品和空白样。随后,把空白值从样品值中扣除,由此计算样品吸收率。方法(3)需采集样品或分析反应产物的光谱,把在最优波长(通常是所测物质最高吸收率的波长)所测的吸收率(或透射率)与该需测物质已知具有零吸收率的波长处的吸收率相比。该吸收率是在此两个波长处所记录的吸收率之差。

[0580] 可采用数字相机和三色分析,但在一些实施例,可根据分析信号的数字(像素化)特性进行改变。即:

[0581] 1.对图像中的各像素及对各种颜色,一个白色标准被成像,且信号强度被调整至对应于无吸收的值。这可通过下列示范性流程完成:

[0582] a.调整光源的强度

[0583] b.调整检测器(优选)的灵敏度,或

[0584] c.软件调整(其本身并不优选)

[0585] 优选方式为上述(b)和(c)的组合。首先,在模拟域调整检测器,然后在数字域微调结果。

[0586] 对于模拟调整,调整光传感器和模拟-数字部分间的放大器增益和偏移,以确保数字化的最大分辨率。所感兴趣的光范围的低端将被设成零,而该范围的低端将被设成正好低于传感器饱和度。

[0587] 随后,可在数字域微调图像。具体而言,优选方法是为 $m \times n$ 个图像使用被称为“双图像校准”的方法。其机理是,首先挡住所有射向检测器的光,采集一个黑图像。我们称此图像为BLACK[m,n]。记录的第二个图像由灵敏度范围最高端处的光组成。我们称此图像为WHITE[m,n]。由此,校准图像a[m,n]可按像素构成如下:

$$[0588] \quad a[m,n] = \frac{c[m,n] - BLACK[m,n]}{WHITE[m,n] - BLACK[m,n]}$$

[0589] 请注意,此数字校正不改善数字化数据的动态范围,但调整其值,使得整个白和黑标准保持一致。

[0590] 2.吸头中物理空白样的图像可被用作逐个像素和逐个颜色的空白样。此空白样可为:

[0591] a.空气;

[0592] b.水;

[0593] c.空白分析反应产物(无分析物);

[0594] d. 样品空白 (无分析试剂); 或

[0595] e. 以上内容的一些组合;

[0596] 3. 来自具有零或弱响应的颜色通道的信号可被用于归一化来自其他通道的信号。

[0597] 控制和归一化光学的另一方法是, 在分析前或其过程中, 对一套物理 (稳定) 标准成像。例如, 可制备印刷染料阵列 (如图104所示) 与一套具有标准强度的标准颜色 (类似与用于校准相机和扫描仪的标准“色轮”) 对应。

[0598] 可使用来自不透明表面的反射率或 (优选地) 穿过透明膜的透射率测量此等标准。

[0599] 根据光学稳定性, 光学校准和归一化可以是 (1) 一次性, (2) 定期进行, 或 (3) 对每次分析进行。

[0600] 校准数字成像器范围

[0601] 在一些实施例中, 可提供方法以校准用于对光密度成像的数字成像器。

[0602] 当测试分析物的光密度时, 以利用尽可能多的图像动态范围为宜。对于正常使用, 此装备可包括较均质的经照明白色背景、成像器和在两者之间透明试管中的需测试分析物。在操作上, 此测试可包括, 将试管置于成像器和白色背光源之间, 并测量被试管中的分析物吸收的光数量。为最大化传感器的整个动态范围, 此背景可被感应作为可测量的最大强度。小心不要使传感器饱和为宜, 因为从传感器饱和开始会丢失信息, 而且无法准确测量衰减。此系统可被配置为高效地最大化背光的测量值, 同时把饱和像素降到最少。

[0603] 经照明的背景可在其整个表面发射同样强度的白光。光输出可有一些变化, 产生成像器检测的像素强度正态分布, 如图128中的曲线所示。对于此示例, 传感器可从各像素返回一个0到256之间的值, 指示其收到的光数量。各像素可在256的值处饱和。换言之, 不管光强度或传感器灵敏度是否进一步增加, 仅有256的值可被记录。图128中的第1系列是点虚线, 显示光过于强烈的区域, 其将正态曲线切断。第3系列是短划线, 显示所有的像素都正确地读取强度, 但是成像器灵敏度低于其对最大动态范围的灵敏度。大多数像素的值低于200。第2系列代表希望的设定, 其中分布的均值尽可能地高, 但是充分小数量的像素饱和。

[0604] 在一个实施例中, 背光的强度可保持恒定, 而成像器设定可加以调节。为了成像器的灵敏度, 可使用两个控制量: 曝光时间和增益。曝光时间可为在该值被读出前, 传感器像素被允许采集光子的时间量。对于给定的光数量, 当曝光时间变得更长时, 此读出值可更大。此控制可以是对应用的“粗”控制。增益控制量可调节加至传感器信号上的放大数量。提高增益可提高传感器发出的信号值。增益可为“细”控制。

[0605] 设定成像器灵敏度参数的示范性程序可包括下列一个或多个步骤:

[0606] 1. 设定曝光时间为已知低于饱和的值。设定增益为最高可用值。

[0607] 2. 向上开始二元搜索, 调整曝光时间以寻找在图像中感兴趣的区域中, 不是全部像素都饱和的设定。通过观察平均像素值变得低于256的点, 由此可检测到所述设定。

[0608] 3. 逐步调低增益, 直到有充分少的像素处于饱和极值。处于可接受水平的像素数量由分布形状决定。宽标准偏差会增加被允许饱和的像素数量。

[0609] 下一步, 可校正白平衡。在数字成像器中, 有三组传感器。各组成员采集不同波长的光, 红、绿或蓝。当检测到白光时, 传感器会优选地看到相同的值, 或红、绿和蓝。白平衡控制调整红和蓝色通道的相对增益。因为来自背光的光被定义为白色, 此程序将仅调整白平衡, 直到通道读取同样的值。在实践中, 绿色通道通常不加以调整, 而红色和蓝色通道随着

控制改变而以彼此相反的方向变化。但是在其他实施例中,诸如红色通道或蓝色通道的另一通道可不加以调整,而其他两个通道可被调整。

[0610] 最后,成像器可在数字域经微调。具体而言,优选方法是为 $m \times n$ 个图像使用被称为“双图像校准”的方法。

[0611] 生成多种有色产物的分析已经在本发明中加以分析。从具有低波长吸收最大值(黄色)到具有高波长吸收最大值(蓝色)的那些产物发出的颜色已被成功测量。一些代表性分析的波长最大值为:405、450、500、510、540、570、612和620nm,表明在整个可见光光谱上读取颜色的能力。

[0612] 可使用很多像素(通常为约1000)的平均数据量化颜色。可选择很好拟合(如最大的 $R^2$ )剂量-响应数据的参数( $f$ )。此参数可首先与形式 $a1+b1*R+c1*R^2+b2*G+c2*G^2+b3*B+c2*B^2$ 拟合,其中 $a$ 、 $b$ 、 $c$ 是常数,而 $R$ 、 $G$ 和 $B$ 分别是红、绿和蓝色通道的强度值。然后,可强制参数 $f$ 具有最大值1和最小值0,由此导出参数 $f$ 。参数 $f$ 与光透射过有色反应产物相关。正如可预期的那样, $f$ 可与用在分光光度测定法中量化吸收物质的参数光密度(OD)紧密相关。当由3-色成像测量的 $1-f$ 相对于在吸收最大值处为微量滴定板中的相同分析反应产物使用分光光度计所测的OD绘制时,可观察到, $1-f$ 大体上与OD成线性相关。在图129中,展示了五个分析的此数据。OD可被归一化成“相对OD” $= (OD - OD_{\text{最小}}) / (OD_{\text{最大}} - OD_{\text{最小}})$ 。在一些情况下,关系有点呈弯曲状,但是相关系数( $R$ )通常 $>0.99$ 。

[0613] 参数 $f$ 可被用于校准由3-色成像分析测量的分析。当相对于分析物浓度绘制时,代表性胆固醇分析的光滑校准关系可如图130所示。导出将浓度与 $f$ 相关联的公式,其形式为浓度 $= a + b*f + c*f^2$ (其中 $a$ 、 $b$ 和 $c$ 是常数),如图130所示,计算浓度与“名义”(预期的、希望的)值大体相同(回归线坡度近1.0,截距近0.0, $R^2=0.998$ )。图130中还示出分析准确度和精确度的图像。准确度近100%(均值100.2%),不精确度(由CV%表示)很低(低于10%,平均CV 3.9%)。

[0614] 分析的同时成像

[0615] 如图56、图57、图58、图59和图60所示,数个分析元件(吸头、孔、印迹)可并行成像。一般地,这些元件可被置于药筒中已知位置或安装在仪器的子系统中,使得特定元件可与特定分析相关。即使这些元件没有被完美地定位或放置,图像分析可被用于通过定位分析元件的特征,而纠正任何此类错误放置。

[0616] 按照制造商的说明使用市场可得的白蛋白(图56)和胆固醇(图57)分析。使用一系列其中分析物浓度从最高浓度按2倍降低的校准物,测量处于有临床意义的范围内的一系列分析物浓度。在图56和图57中,右侧的分析物浓度最高,而最左侧的吸头对应于零分析物。被吸入吸头中的分析反应混合物体积为20 $\mu$ L。

[0617] 图58、图59和图60示出可被并行成像的孔。在一块白色不透明塑料上加工出一套浅半球形孔。在这些孔中,进行三次市场上可得的颜色形成分析,并对反应产物成像。如上所述,最右侧的孔具有最高分析物浓度,而每个邻近孔的浓度都减小两倍,含有零分析物的最左侧孔除外。每个孔中引入7 $\mu$ L分析反应产物。

[0618] 还可以在把反应产物印至多孔膜或纸上后,对其成像,图像在液体渗入介质后形成。还可能使用多种分析化学品中的任一种浸渍入纸或膜中,并在加入样品后,对所得反应产物成像。



#### [0619] 分析浊度

[0620] 通过测量入射光穿过被测量样品后的强度降低,完成浊度测定。此技术被用于分析的结果是提高液体不透明度的分散沉淀的场合。

[0621] 可在胶乳凝集分析中测量浊度。作为胶乳凝集分析响应模型,聚苯乙烯胶乳颗粒(1 $\mu$ m直径)以给定浓度(w/v)被分散在缓冲液中,并接受3色图像分析。从图72可看到,在所有三个通道中都发现良好响应,其可被用于测量胶乳颗粒浓度和胶乳的凝集。

#### [0622] 分析凝集

[0623] 与浊度分析相似,此系统可被用于测量凝集、红血球凝聚和其抑制。

[0624] 此系统可被用于通过红细胞凝聚进行血型定型。血液经稀释,并与来自市场可得定型试剂盒的血型定型试剂(抗A、抗B、抗D)混合。如下所示B+型血,当对混合物成像时,可很容易地被看到适当的凝集响应。而且,当图77中所示图像沿吸头的垂直轴被扫描时,通过测量三色信号的变化,可获得对凝集的定量测量,如图78所示。更大的变化代表凝集,且能在各颜色通道中被检测。很明显,此方法可被用于测量此类凝集反应的程度。

#### [0625] 形状识别

[0626] 图像可经分析以用于形状识别。形状识别可在正常放大率和非常高的放大率下完成。在高放大率下,图像分析可被用于识别细胞的大小和形状。这些技术被常用于细胞计数,以确定红细胞、白细胞和血小板的相对浓度。在正常放大率下,形状识别可被用于观察样品的状态。气泡和其他缺陷识别技术被用于确保正确地抽吸和分配所测量的液体数量。

#### [0627] 分析固相基质上的样品

[0628] 有正面光照的数字成像还可被用于读出固相基质上的分析响应,如图76所示。氯化钾溶液(0、2、4和8mM)被加至设计用于反射率分析系统中的Reflotron™钾分析条上(Boehringer-Mannheim/Roche)。

#### [0629] 分析样品品质

[0630] 特定的样品特性会使分析结果无效。例如,溶血使得钾离子从红细胞泄漏至血浆,导致测量血浆或血清钾离子浓度虚高。同样,黄疸和脂血改变测量吸收率,会干涉数种显色化学品。在本发明中,我们应用图像分析能检测和量化此类干涉物质。随后,会给出假结果的分析可被(1)从分析系统提交的结果清单中删除,或(2)可纠正光信号以考虑测出的干涉剂水平。图99示出不同类型的血清样品的图像(从左至右:溶血、脂血症、黄疸(黄色)和“正常”)。

#### [0631] 数字数据分析

[0632] 根据生成和/或改变颜色的分析方法中数据生成和校准的传统方法,通常测量代表分析混合物的吸收特性改变的模拟信号,该分析混合物由样品与试剂混合而成。反应混合物的一部分接受光照,透射过或被该部分反射的光撞击在检测器上,并被当成模拟信号加以评估。由样品体积和质量、样品处理、分析与分析混合物组合,及将该混合物送至光学系统的物理元件组合确定的分析质量取决于该所使用的物理系统的假定质量。

[0633] 在本发明中,我们可对(1)样品、(2)样品处理程序和(3)分析混合物成像,并采集数据作为一套一个或多个数字图像。分析混合物图像中的每个像素都代表总体的一个非常小部分,但是通过平均来自很多像素的3色信号,我们获得一个分析信号,其至少与传统模拟方法获得的信号一样好。不过,传统方法在平均时会丢失信息,而本发明不仅汇集信息,

还保留被传统方法丢失的细节。在这样的背景下,基于颜色的分析包括对代谢物、电解质、酶、生物标记物(通过免疫分析)、药物(通过免疫分析)和核酸目标(通过“LAMP”技术)的分析。同样的原则可被运用于使用荧光和/或冷光的分析。

#### [0634] 体积确认和校正

[0635] 可光学确定样品或诸如液体或固体的任何其他材料的体积,实现方法是:可通过对已知内部尺寸的容器成像,并用数学方法确定所观察的装有样品的容器部分的样品体积。固体测量主要用于测量离心沉淀的固体。最常见的例子是读取经离心的红细胞体积,以确定红细胞比容水平。示例6-11和16描述了使用图像分析计算样品体积和其他测量。这可获得经改善的分析结果。例如,如果将使用的目标体积是10uL,而本发明的技术方案确定实际体积是8uL,则分析系统可根据体积校正结果(在此示例中,根据10uL样品的假设计算的分析物浓度将乘以10/8)。

[0636] 可通过对样品和试剂成像获得关于实际样品和试剂体积的信息,该信息可被用于校正检测和/或量化样品中分析物所用的计算。

[0637] 如以上很多示例所示,成像的运用使样品和分析混合物能被评估其质量和分析响应。另外,对用作反应器皿及样品获取方式的“吸头”进行成像,可实现(1)精确和准确的样品和试剂体积测量,和(2)使用此类数据校正因体积误差引起的分析结果中的任何不准确和/或不精确。为做到这点,吸头可具有准确和精确了解的几何形状(如通过注模成型的吸头)。通过成像重复对吸头的测量表明,其尺寸精确度优于约1%。如果样品和试剂的移液较不准确和精确,通过了解实际体积(通过图像测量)而校正结果是可能的。

[0638] 例如,考虑其响应直接与分析物浓度成比例的分析(如本文中所述的很多分析)。10%的样品体积误差会导致分析系统报告值中的10%误差。但是如果准确测量此不准确地分配的样品体积(比如,在实际值的2%范围内),则系统响应可被校正,误差被从10%减少至2%。可对试剂体积的体积误差进行相应的校正。校正算法取决于分析系统对体积的响应或对各分析成分(样品、试剂)的了解,而此信息可在分析进展和验证过程中很容易地确定。

[0639] 因此,与传统技术相比,本发明提供了各种优点。在生成“分析信号”时,本发明能够检测分析试管中的物理缺陷、分析混合物中的缺陷(气泡等)。当这些缺陷被发现(图像分析)后,可拒绝分析结果,这样就不会出现错误结果或(优选地)可消除缺陷的影响,并计算准确的分析信号。

[0640] 在配制分析混合物时,可检测出任何和所有缺陷:不正确的样品类型(如,血液相对于血浆)、不正确的样品体积、对于血液样品,无法把血浆与有形成分(红和白细胞)分离、会降低分析结果质量的样品因素(如,脂血、黄疸、溶血、存在沉淀物或其他未识别的非均质性)、分析混合物的配制缺陷(如,存在气泡、无法充分混合(颜色非一致性))、回顾性质量评估及详细档案信息保存的机制、测量样品和试剂体积(以及校正此类体积中的不准确和/或不精确)的机制。

#### [0641] 评估治疗剂

[0642] 在另外一个实施例中,提供了监测超过一个药理学参数的装置和方法,该药理学参数用于评估所提供治疗剂的功效和/或毒性。例如,治疗剂可包括具有治疗功能和/或潜力的任何物质。此类物质包括但不限于生物或化学复合物,如简单或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白质(如抗体)或多核苷酸(如反义)。可合成大量的化合物,比如诸如多肽和多核

苷酸的聚合物,及基于各种核结构的合成有机化合物,而且这些也可以被包括作为治疗剂。另外,不同的天然源可提供化合物用于筛选,比如植物或动物提取物等。应理解,尽管没有总是明确说明,治疗剂可单独或与其他治疗剂一起使用,而这些其他治疗剂与本发明创新筛选识别的治疗剂具有同样或不同的生物活性。这些治疗剂和方法也意在与其他疗法联合使用。例如,经常通过质谱仪测量小分子药物,这会带来不精确。ELISA(基于抗体)分析则会准确及精确得多。

[0643] 本发明的生理参数包括但不限于诸如温度、心率/脉搏、血压和呼吸率。药效参数包括蛋白质等生物标记物、核酸、细胞和细胞标记物的浓度。生物标记物可指示疾病或是药物作用的结果。本发明的药物动力学(PK)参数包括但不限于药物和药物代谢物浓度。为了药物的合适安全性和功效,非常需要实时识别和量化样品的PK参数。如果药物和代谢物浓度超出希望的范围和/或由于药物的意外反应生成意外的代谢物,则需要立刻采取行动,以确保病人的安全。同样,如果治疗过程中任何药物动力学(PK)参数不在希望的范围,也必须立刻采取行动。

[0644] 能够在一个时间段上,监测某一位对象内的分析物浓度或PD或PK参数的变化率,或者对浓度、PD或PK参数进行趋势分析,无论是药物还是其代谢物的浓度,均有助于防止潜在危险的情况出现。例如,如果葡萄糖是感兴趣的分析物,样品中在某一给定时刻的葡萄糖浓度及葡萄糖浓度在某一给定期间的变化率对预计并避免例如低血糖事件非常有用。此类趋势分析对药物剂量选择具有广泛的有利意义。当涉及到多个药物和其代谢物时,经常需要发现趋势并采取主动措施的能力。

[0645] 在一些实施例中,本发明提供一种在提供个性化医疗方面帮助临床医生的业务方法。业务方法可包括通过随时间监测生物标记物趋势,对药物治疗进行处方后监测。该业务方法可包括从接受药物治疗的个人处采集至少一种药理学参数,将体液样品与液体装置中所装反应物接触,由此完成该采集步骤,该装置被提供给该个人以生成一个指示该至少一种药理学参数的可检测信号;在该个人的计算机医疗记录帮助下,与该个人的该至少一种药理学参数进行交叉参考,由此在提供个性化医疗方面帮助该临床医生。

[0646] 本文所述装置、系统和方法实现了对病人药理学参数的自动量化,以及将参数与例如该病人的可能包括参数监测历史的医疗记录或另一组对象的医疗记录的自动比较。例如,将实时分析物监测与可储存数据的外部装置结合,该外部装置还可进行任何类型的数据处理或算法,由此提供了一种可协助典型病人护理的装置,所述护理可包括例如比较当前病人数据和过去的病人数据。因此,本文还提供了一种业务方法,可有效地执行目前由医疗人员执行的病人监测中的至少一部分。

[0647] 样品和反应产物成像的光学装备

[0648] 可使用光学装备完成样品和反应产物分析。该光学装备可包括光源、光圈和传感器或检测器。图100和图101为一种光学装备的示意图。在一些实施例中,相机可为罗技C600网络摄像头,相机传感器可为1/3"2.0MP(1600x1200)CMOS:(MI-2010-SOC),镜头可为具有标准物距网络摄像头镜头的玻璃(镜头至物体距离:35mm)。光源可为Moritex白边光源MEBL-Cw25(白),工作电压为9.4伏。相机图像可按序列拍摄,其中1、2、3、4或更多个吸头由x-y-z台移入光学路径。

[0649] 在一个实施例中,检测器是容纳有检测组件的读数器组件,以检测由装置上至少

一种分析生成的信号。根据例如所运行分析的类型和所采用的检测机制,该检测组件可位于装置上方或相对于该装置的一个不同定位。该检测组件可被移动与分析单元接通,或者分析单元可被移动与该检测组件接通。

[0650] 传感器可为PMT、宽域光电二极管、雪崩光电二极管、单频光电二极管、图像传感器、CMOS芯片和CCD。照射源可为激光、单色LED、荧光灯或LED发出的宽频光、LED阵列、红、绿和蓝光源的混合、LED激活的磷光体、荧光管、白炽光和光弧源,如闪光灯。

[0651] 在很多情况下,光检测器被提供并用作检测装置。非限制性示例包括光电二极管、光电倍增管(PMT)、光子计数仪、雪崩光电二极管或电荷耦合器(CCD)。在一些实施例中,可使用PIN型二极管。在一些实施例中,PIN型二极管可与放大器结合,以形成具有与PMT相当的灵敏度的检测装置。有些分析可生成冷光,如本文所述。在一些实施例中,检测到化学发光。在一些实施例中,检测组件可包括多个光纤线缆,形成一捆与CCD检测器或PMT阵列连接。该光纤捆可由独立的光纤构成,或由很多小光纤熔接在一起形成一整体捆。此类整体捆市场上可得且容易与CCD检测器连接。

[0652] 检测器还可包括光源,比如灯泡或发光二极管(LED)。此光源可照亮分析,以便检测结果。例如,分析可为荧光分析或吸光度分析,如核酸分析中常用的那样。检测器还可包括透镜或光纤等光学器件以将光源投送至分析。

[0653] 在一些实施例中,检测系统可包括非光学检测器或传感器,以检测对象的特定参数。此类传感器可包括温度、传导率、电势信号和电流信号,以用于经氧化或还原的化合物,例如 $O_2$ 、 $H_2O_2$ 和 $I_2$ ,或可被氧化/还原的有机化合物。

[0654] 照明可为背射照明、前射照明和斜(侧)射照明。背射照明可被用于普通化学,以检测光吸收(比色法)或散射(浊度)。此安排具有两种形式,一种是宽广、均匀照明的后场,另一种是具有具体形状、被对象打断的光束。前射照明可被用于反射和荧光激发。对于反射,对象被光源从前面照射,并通过观测被对象反射的光来进行测量。被吸收的颜色生成与液体在背面照明下相同的信息。对于反射,对象还可被斜射照明照亮。使用斜射(从侧面)照明,图像具有3维外观,且能突出否则不可见的特征。一种基于此方法的较新技术是霍夫曼调制相衬,该系统建立在倒置显微镜上,用于细胞培养。斜射照明与亮场显微镜术有着相同的局限(很多生物样品的低对比度;由于物体离焦造成的低可见分辨率),但是可突出否则不可见的特征。

[0655] 在荧光激发中,可从前方照射对象,以便实现荧光照明。这些通常为单色光,最常见的是激光。激光共聚焦扫描显微镜即为其常见实施例。斜射照明也可被用于荧光激发。在荧光血细胞计数中,经常以一个角度,通常为90度,激发对象,而衰变光子则按此角度出现。这种照明形式实现直接在对象背后的散射检测(背光)以及侧面荧光发射。

[0656] 在一些实施例中,可与激发光束成90度对荧光成像。在图102A中,通常为高亮度LED的光子源(S)穿过光束扩散器(D)和修整透镜(L1),生成一个准直或缓慢离散的激发光束。该激发光束通过带通滤波器(F1)并照射由装有带荧光标记样品溶液的器皿(管子、试管或移液吸头)组成的样品。采用合适于通过斯托克斯位移荧光的长或带通滤波器(F2)将各向同性发射的荧光与激发光光谱分离。随后,通过透镜(L2)将光成像于数字相机(C)或其他检测器上。通过图像分析,从获得的图像中提取荧光强度。

[0657] 使用图102A所示光学装备采集的图像生成单管图像(如图103A所示)。连续实验显

示,从采用嵌入染料的负和正LAMP实验获得的荧光强度之间的差别。

[0658] 在其他实施例中,传输的光线经过光过滤后才成像,以去除激发波长的光。在图102B中,通常为高亮度LED的光子源(S)穿过光束扩散器(D)和修整透镜(L1),生成一个缓慢离散的椭圆形激发光束。该激发光束通过带通滤波器(F1)并照射样品,样品形式为样品器皿(管子、试管或移液吸头)阵列,各器皿装有带荧光标记样品的溶液。采用合适于通过斯托克斯位移荧光的长或带通滤波器(F2)将各向同性发射的荧光与激发光光谱分离。随后,通过相机镜头(L2)将光成像于数字相机(C)上。通过图像分析,从获得的图像中提取荧光强度。图103所示的光学装备可被用于同时生成多个管子的阵列图像(如图103B所示)。

[0659] 对于比色法,传感的优选实施例为用白光背射照明对象,其结果由成像传感器感应。在此例中,测量透射颜色吸收。

[0660] 对于浊度测定,传感的优选实施例为用白光背射照明对象,其结果由成像传感器感应。对于浊度测定,测量透射光的强度降低。

[0661] 发光测定不使用照明方法,因为对象自己发射光子。所发射的光可以是弱光,且可使用光电倍增管(PMT)等极灵敏的传感器检测。

[0662] 在一些实施例中,可使用荧光、暗场照明或亮场照明实现成像。此类成像可被用于血细胞计数或其它应用。可使用具有不同波长的三个照明源实现落射荧光照明。另外,如有要求,可同时使用两个不同的源。因此,该成像平台可被用于对很多种荧光染料成像。照明源和发射光学器件的组合可被配置为实现多个光谱独立的成像通道。

[0663] 通过使用(位于样品上方或者下方)环状照明、暗场阿贝聚光镜、带有超环面镜的暗场聚光镜、内置于物镜周围套筒内的落射暗场聚光镜,或者环状照明与带有挡光板的台式聚光镜的组合,可实现暗场照明。从根本上说,这些光学部件生成锥形光束,其数值孔径(NA)大于所使用物镜的NA。照明方案的选择取决于多种考虑,比如所要求的放大、机械设计考虑、成像传感器大小等。基于环状照明的照明方案一般为更宽的区域提供均匀暗场照明,同时整个系统的机械设计还具有充分的灵活性。

[0664] 通过使用白光源及台式聚光镜以生成凯勒照明,可实现亮场照明。

[0665] 在一些实施例中,可采用自动滤光轮。该自动滤光轮可控制成像光学路径,以实现同一视野中的多个荧光体成像。

[0666] 在一些实施例中,可实现基于图像的自动对焦。可使用基于图像的算法控制物镜的z位置(如垂直位置)(即其离样品的距离)以实现自动对焦。简言之,使用暗场照明快速捕捉小图像(例如128x128像素)。可分析此图像以导出自动对焦函数,其为图像清晰度的量度。根据一种快速检索算法计算物镜的下一个z位置。物镜可被移至新的z位置,然后捕捉另一小图像。此闭回路系统不要求使用任何其他硬件进行对焦。显微镜台可与计算机控制的步进电机相连,以实现在X和Y方向(如水平方向)的平移。在每个位置,捕捉所需数量的图像,然后台子被移至下一个XY位置。

[0667] 在检测器的帮助下,可执行成像或其它感应。检测器可包括相机或其它感应设备,其被配置为将电磁辐射转换成电子信号。在一个示例中,相机可为电荷耦合(CCD)或电子倍增CCD(EMCCD)相机。检测器可为传感器,比如有源像素传感器或CMOS传感器。检测器可包括光电倍增管以检测信号。

[0668] 检测器可与样品容器(如试管、吸头、小瓶)光学相通。在一些情况下,检测器在样

品容器的直接视线。在其他情况下,经透镜、镜子、准直器或其组合等一个或多个光学器件的帮助,检测器与样品容器光学相通。

[0669] 可通过成像和血细胞计数完成细胞计数。在对象经亮场照明的情况下,优选实施例是,从前方使用白光照射对象,并使用成像传感器感应细胞。随后的数字处理将计数细胞。如果细胞不多或很小,优选实施例是接上荧光标记,然后用激光照射对象场。优选共聚焦扫描成像。对于流式血细胞计数,用荧光标记物标记对象,然后对象流过感应装置。有两种类型的传感器,一种被放置成使对象受背射照明,测量光束散射,以确定是否存在细胞。另一种传感器的安排使得照明来自侧面,并测量从标记对象中发射出的荧光。

#### [0670] 最终用户系统

[0671] 装置和系统在被制造后,对可一起或单独地被装运至最终用户。本发明的装置或系统可与用户手册或使用说明一起装箱。在一个实施例中,本发明的系统适用于不同装置上运行的分析类型。因为装置的部件可模块化,用户仅需一个系统和多种装置或分析单元或试剂单元,以便在定点照护或其它分布式测试环境中运行大量分析。在此背景下,可用多个装置重复使用系统,而且有必要在装置和系统上都按照传感器,以检测例如装运过程中的此类变化。在装运过程中,压力或温度变化会影响本系统多个部件的性能,由此位于装置或系统上的传感器可将这些变化传递给例如外部装置,以便可在外部装置上的校准或数据处理过程中,进行调整。例如,如果液体装置的温度在装运中被变至特定水平,位于该装置上的传感器会检测到此改变,并当用户把装置插入系统时,将此信息传递给系统。系统中可有一个额外的检测装置完成这些任务,或者,这样的装置可被包括在另一系统部件中。在一些实施例中,可无线传输信息至系统或外部装置,比如个人计算机或电视。同样地,系统中的传感器可检测到类似的变化。在一些实施例中,还需要在装运包装中安装一个传感器,该传感器可代替系统部件中的或者为额外添加的。例如,可被感应到的、使分析药筒或系统失效的不利条件包括暴露于超过最高可容忍的温度,或药筒完整性受破坏,造成潮气渗入。

[0672] 在一个实施例中,系统包括能够从外部装置无线传输和接受信息的通信组件。此无线通信可为蓝牙或RTM技术。可采用各种通信方法,如用调制解调器的拨号有线连接、T1、ISDN或电缆线路等直接连接。在一些实施例中,使用示范性无线网络建立了无线连接,比如手机、卫星或寻呼网络、GPRS或局部数据传输系统,如以太网或局域网上的令牌环网。在一些实施例中,在通过无线网传输此信息前对其加密。在一些实施例中,该通信组件可包括一个无线红外通信部件,以发送和接受信息。系统可包括集成图形卡,以促进信息显示。

[0673] 在一些实施例中,该通信组件可包括一个内存或储存装置,例如本地化RAM,采集的信息可被储存在其中。如果由于例如暂时不能与网络进行无线连接,信息不能在指定时间被传送,则要求有储存装置。信息可与储存装置中的装置识别符相关。在一些实施例中,该通信组件可在特定时间后,重试发送储存的信息。

[0674] 在一些实施例中,外部装置与读数器组件中的该通信组件通信。外部装置可与系统无线或物理通信,但也可以与第三方通信,包括但不限于医疗人员、临床医生、实验室人员或医疗行业其他人。

[0675] 在一些实施例中,系统可包括外部装置,比如计算机系统、服务器或其它能够储存信息或处理信息的电子装置。在一些实施例中,该外部装置包括一个或多个计算机系统、服

务器或其它能够储存信息或处理信息的电子装置。在一些实施例中,外部装置可包括病人信息数据库,例如但不限于医疗记录或病人病史、临床试验记录或临床前试验记录。外部装置可储存将在系统上运行的程序,当它接受指示何种装置已被插入系统的标志符时,可被传送给系统的通信组件。在一些实施例中,程序可取决于装置标识符。在一些实施例中,外部装置为每个装置储存一个以上的程序。在其他实施例中,外部装置上的病人信息包括一个以上的程序。在一些情况下,外部装置储存数学算法以便处理从通信组件发来的光子计数,且在一些实施例中,计算体液样品中的分析物浓度。

[0676] 在一些实施例中,如本领域中熟知,外部装置可包括一个或多个服务器。此类服务器可提供负载平衡、任务管理和备份能力,以防一个或多个服务器或外部装置的其他部件出现故障,并提高服务器的可用性。如本领域中熟知,还可在储存和处理器单元的分布式网络中应用服务器,其中根据本发明的数据处理位于计算机等工作站上,由此不再需要服务器。

[0677] 服务器可包括数据库和系统进程。数据库可位于服务器中,或可位于此服务器可访问的另一服务器系统上。因为数据库中的信息可包含敏感信息,可应用安全系统,以防止未经授权的用户获得对数据库的访问权。

[0678] 本文所述一些特征的优点是,信息可从外部装置被传送至读数器组件,而且还被传送至其他方或其它外部装置,例如但不限于PDA或手机。此类通信可通过本文披露的无线网络实现。在一些实施例中,计算分析物浓度或其它病人信息可被发送至例如但不限于医疗人员或该病人。

[0679] 相应地,使用标的装置和系统生成的数据可被用于对随时间变化的对象中分析物浓度进行趋势分析。

[0680] 本文所述的另一优点是,分析结果可大体上立刻被传递给任何第三方,该方可因获得此结果而获益。例如,当分析物浓度在外部装置上得到确定后,其可被传送给病人或可能需要采取进一步行动的医疗人员。此与第三方的通信步骤可如本文所述以无线方式进行,而且通过把数据传输给第三方的手持装置,几乎可在任何时间和任何地点通知该第三方有关分析结果。因此,在时间紧要的情况下,如果需要采取紧急医疗措施,病人可在任何地方被联系上。

[0681] 如本文其他地方所述,成像可被用于检测。成像可被用于检测样品的一个或多个特征。例如,成像可被用于检测样品的存在或不存在。成像可被用于检测样品的位置、方位、体积或浓度。成像可被用于检测样品中一个或多个分析物的存在、不存在和/或浓度。

[0682] 在一些实施例中,单次测量可被用于捕获关于样品和/或分析物的各种信息。例如,单次测量可被用于捕获关于样品体积和样品中分析物浓度的信息。单次测量可被用于捕获关于多种分析物存在和/或浓度和/或样品中的分析物类型的信息。单次测量可被用于捕获关于1、2或更多信息或本文所述信息类型的信息。

[0683] 此类成像和检测可提供更精确和准确的分析,这对如本文其他地方所述的小样品体积的情况很有利。样品体积的额外示例可包括500 $\mu$ L或更少、250 $\mu$ L或更少、200 $\mu$ L或更少、175 $\mu$ L或更少、150 $\mu$ L或更少、100 $\mu$ L或更少、80 $\mu$ L或更少、70 $\mu$ L或更少、60 $\mu$ L或更少、50 $\mu$ L或更少、30 $\mu$ L或更少、20 $\mu$ L或更少、15 $\mu$ L或更少、10 $\mu$ L或更少、8 $\mu$ L或更少、5 $\mu$ L或更少、1 $\mu$ L或更少、500nL或更少、300nL或更少、100nL或更少、50nL或更少、10nL或更少、1nL或更少、500pL或更



少、250pL或更少、100pL或更少、50pL或更少、10pL或更少、5pL或更少或1pL或更少。在一些实施例中,样品体积可包括少于或等于采自手指针刺的约3滴、少于或等于采自手指针刺的约2滴,或少于或等于采自手指针刺的约1滴。如此小的体积对定点服务应用有用。

[0684] 此类成像和/或检测可提供具有低变化系数的分析。变化系数可为标准偏差与均值的绝对值之间的比率。在一个实施例中,反应和/或分析可具有变化系数(CV)(本文中也称为“相对标准偏差”)小于或等于约20%、15%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%或0.1%。单个反应和/或分析,或具有多个反应和/或分析的流程可具有变化系数小于或等于约20%、15%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%或0.1%。在一些实施例中,一个成像和/或检测步骤,或具有多个成像和/或检测步骤的流程可具有变化系数小于或等于约20%、15%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%或0.1%。

[0685] 在一些实施例中,通过可被放在定点照护地点的装置进行成像可改善该装置的总体性能。其准确度和/或精确度可被提高,和/或变化系数可被降低。装置处理本文所述体积等小样品的性能可被提高。成像可与其他检测系统一起使用、与其他进程一起使用,或作为独立系统。性能改善可包括变化系数降低约15%、12%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%、1%、0.5%、0.3%或0.1%。

[0686] 成像可用于一种或多种类型的分析或样品操作程序所应用的各种检测类型。此类分析或样品操作程序的示例可包括离心、分离、血细胞计数、免疫分析、ELISA、核酸分析、酶分析、比色法或本文其他地方所述的任何其他分析或反应类型。

[0687] 成像系统比其他方法在数据采集、数据处理和结果解释方面具有多重优点。成像系统可最大化或提高小样品的效率和使用,并增强系统层次的性能。成像系统可作为单独系统或与其他检测系统或机制结合使用于检测。

[0688] 在一些系统中,可使用传感器和系统(如光电二极管、光电倍增管和相关的光学器件/装置),这些传感器和系统通常不提供任何有关被研究样品的空间信息。相反,这些系统可在信息按空间被集成后采集关于样品的信息,通常丢失与样品相关的空间信息。尽管把样品的信号集成在空间内可增强传感器检测的信号水平,光学和其他传感器灵敏度方面的进步使得这种集成不再有必要。成像检测可被用于替代此类传感器,或可与这些传感器联合使用。

[0689] 可使用具有一种或多种下列优点特征的成像系统。成像传感器可具有达到和/或超过传统非成像传感器的灵敏度和动态范围。成像装置可保持被研究的样品的空间方面,具有很强的后处理能力。后处理可包括QA/QC(如质量控制,比如自动误差检测和/或病理学家审核),和/或具有相对采集光学器件/传感器平移样品的手段,从而实现样品空间重构的点传感器。从成像装置采集的数据可经处理,以提取非常具体的信息,比如样品的形态特征(比如细胞计数)、从选择的图像区域采集的数据(整个样品的或图像中一个细胞中的荧光峰值)。从成像装置采集的数据可实现对被成像的整个样品上的信号变化进行评估。数据可经后处理,以便计算整个样品或在样品图像上识别的任何感兴趣区域内的均值、标准偏差、最大值、最小值和/或其它适用的统计数据。成像装置采集多个图像,并比较随时间和空间在图像中发生的变化,由此实现对样品随时间发生的变化进行研究。这些变化比如在集合过程中很明显的变化(比如凝血素时间分析)或其它样品中随时间和空间发生的(如,化学、



物理、生物、电、形态)变化。成像装置可实现更多的阵列快速数据获取、组织切片和其他分析/样品配置。

#### [0690] 血细胞计数

[0691] 在一些实施例中,本文所述的任何实施例可经调整,使系统能进行血细胞计数。系统中的血细胞计数(如细胞的计数和功能分析)可通过图像分析完成。可使用本文上述的移液器和离心分离机处理血液。一般地,已知测量体积的血液(1-50uL)可首先经离心,然后去除血浆部分。随后,通过用移液器重复进行分配和抽吸,可把细胞部分再悬浮成缓冲液。荧光抗体的混合液可被指向所选择的细胞标记物(比如CD45、CD4等)。经过简短培养,可加入作为白细胞固定剂和红细胞裂解剂的试剂。再经过另一次培养,可通过离心收集白细胞,通过抽吸移除上清裂解液。经染色的白细胞可在经测量体积的缓冲液(通常少于原血液体积(比如1-20uL))中被再悬浮,并分配入透明毛细通道中进行图像分析。一般地,使用具有不同荧光标记的抗体和/或用不同荧光/蛋白比率标记的抗体,可对多达3或甚至5或更多细胞类型成像。当必须计数或分析更多细胞类型时,可使用超过一种的反应混合物。在一些实施例中,反应混合物可被用于计数或分析各种数量的细胞类型。

[0692] 在一些实施例中,毛细通道通常为约10-100um深,0.5-2mm宽和0.5-5cm长。毛细通道可具有其他尺寸,包括但不限于本文其他地方所述的其他尺寸。染色细胞分散液通常可通过毛细作用填入通道,让细胞沉淀在较低通道的表面。可采用一种或多种激光或其它光源(如LED)照明通道。光学系列可具有一种或多种光学元件,比如分色镜或透镜,且可放大或不放大视野。在一些实施例中,视野可被放大2-100倍。通常可采集一系列的图像,代表约1mm x 0.5mm的视野,并包含1-10,000个细胞(理想地,300个感兴趣的细胞)被成像至具有约1000x1000像素(总计1百万)的面积传感器。

[0693] 可采集代表通道邻近部分的一系列图像。可使用机械台相对光源移动通道。在一些情况下,伺服机构可在垂直方向移动此台,以便对焦图像。在一些实施例中,光源或一个或多个光学元件可相对此台移动以对焦图像。一般使用光源和滤光片的一种或多种组合成像。根据需要,光源可被打开和关闭,而滤光片被移入光路。优选地,可计数高达1000个任何给定类型的细胞。在其他实施例中,可计数各种数量的任何给定类型的细胞,包括但不限于超过、少于或等于约1个细胞、5个细胞、10个细胞、30个细胞、50个细胞、100个细胞、150个细胞、200个细胞、300个细胞、500个细胞、700个细胞、1000个细胞、1500个细胞、2000个细胞、3000个细胞、5000个细胞。可使用可得的计数算法计数细胞。可根据其特征荧光、大小和形状识别细胞。可采用图案识别算法排除染色细胞碎片,且在大多数有聚合细胞的情况下,这些可被排除出分析或解释为聚合体。

[0694] 血细胞计数平台可为集成自动显微装置,能够在全面自动化、受控的环境中执行下列任务。下列一个或多个任务可发生在血细胞计数应用中。以下任务可按其出现的顺序或以其他顺序发生,或其他任务可进行合适的替换。

[0695] 1. 分离所需类型的血细胞

[0696] 2. 用荧光和/或有色染料和/或微球标记细胞

[0697] 3. 将细胞悬浮液限制在光学兼容的试管中

[0698] 4. 使用荧光显微、暗场照明和/或亮场照明对细胞成像

[0699] 5. 对图像的自动化分析以提取所需的细胞属性

[0700] 6. 运用高级统计和分类方法导出可临床报告的信息,由此完成对提取信息的自动化分析。

[0701] 在下列部分中,详细讨论了各项任务;在需要的地方提供了图像和草图。

[0702] 1. 分离所需类型的血细胞。所需类型的血细胞可根据本文其他地方所述的一个或多个实施例加以分离。例如,此类分离可根据上文中关于血细胞计数或离心分离机描述进行。

[0703] 2. 用荧光和/或有色染料和/或微球标记细胞。

[0704] 可采用特异荧光染料。感兴趣的细胞可与荧光标记结合子(如抗体、适配体等)的预先分好的溶液一起培养,该结合子特异于这些细胞上的标记物。关键的考虑是,把“亮”或高消光系数和高量子产率荧光与细胞具有较低结合能力的标记物配对;反之亦然。例如,标记物CD22可在约为CD45十分之一的水平被表达于B淋巴细胞上。根据这一相对表达,CD22可用“亮”染料标记,而CD45可用“较暗”染料标记。使用此技术标记的标记物可为细胞内或细胞表面标记物。通过为低表达标记物使用二级标记方案,可提高检测和量化的灵敏度。简言之,主要结合子可与可被次要结合子特异识别的另一分子共轭。然后,用较多数量的荧光体标记的次要结合子可与主要结合子就地结合,并增强荧光信号。实现这点的方案可为使用与抗CD22抗体共轭的生物素,而该抗体反过来可被标记有异硫氰酸荧光素(FITC)的抗生物素抗体识别。使用可大幅度地增强荧光信号。图123提供了显示经标记粒细胞的荧光显微相片示例。此示例显示被Alexa-Fluor 647-抗-CD45标记的人类白细胞在固定、裂解血样中的荧光显微相片。伪色方案被用于增强“亮”细胞(具有高CD45表达)和“暗”细胞(具有低CD45表达)之间不同的认识能力。

[0705] 细胞涂片的染色也可被运用在系统中。例如,StainRITE™ Wright-Giemsa染料(Polysciences Inc.)中提供的手动程序可被自动化,并在本发明操作中读取。

[0706] 在一些实施例中,可使用非特异荧光染料。为了区分粒细胞的子群,平台也可使用可与核酸(如SYTO、Hoechst)或脂质膜(如DiI、DiD、FM-4-64)结合的荧光染料。

[0707] 3. 将细胞悬浮液限制在光学兼容的试管中。

[0708] 在一些实施例中,血小板计数试管可被设计成限制具有固定体积的预标记细胞悬浮液在“通道”中,制造此通道以便在细胞的上面和下面提供光学透明成像材料。样品可通过样品入口被引入通道中。在离样品入口一些距离的地方,排气孔使得空气压被释放,样品流入通道中。

[0709] 通道尺寸可被设计成夹持预定的已知体积的液体,不管在样品入口分配的体积量。各试管可具有相同和/或不同体积的多个通道,各通道具有至少一个样品入口和至少一个排气孔。

[0710] 样品中感兴趣的细胞浓度可在样品准备过程中加以调整,以便在被限制在试管中后,可实现成像系统中各视野所希望的细胞数量。一种实现这点的的方法是,对具有细胞分散液的容器成像,然后测量浊度。可使用预先建立的浊度和细胞计数间的关系计算细胞密度。通常地,细胞分散液在一定体积的缓冲液中制成,这样,在细胞计数尽可能低的情况下,细胞浓度将大于基于图像的细胞计数的最佳值。然后,可添加更多的缓冲液,以便把分散液提高到最佳水平。

[0711] 可设计试管的成像部分,以便为所感兴趣的应用提供充分数量的细胞。例如,为大

量的RBC计数可要求仅计数1000-2000个细胞,因此稀释样品及仅需试管中的一小块成像区域。但是,计数难得一见的成髓细胞可要求,在一些情况下,对超过100000(总计)细胞成像的能力。在这种情况下,系统可浓缩细胞悬浮液,使得100000个细胞可使用合理数量的视野成像。因此,试管上专用于RBC成像的通道小于专用于成髓细胞成像的山区。

[0712] 试管可被设计为被标准移液机制以自动方式提起,使试管被传送至成像平台。移液机制的吸头推出器可把试管从移液机制推至成像平台。把试管定位至成像平台可用两步完成。当试管被传送至成像平台后,试管上的静定位特征可与成像平台上的配合特征相互作用,使试管与成像平台的光学轴(X,Y定位)平行。随后,可通过位于成像平台上的机制完成定位。此机制可把试管偏移抵住垂直于成像平台光学轴的平面(Z定位),由此将样品限制在成像平台的焦点范围内。

[0713] 4. 使用荧光显微、暗场照明和/或亮场照明对细胞成像。细胞成像的方法还可被用于本文其他地方所述的本发明的其他应用中。如上所述,成像技术可被用于其他成像用途。

[0714] 照明能力:血细胞计数平台可被设计具有三种类型的照明方案:落射荧光、暗场和亮场。由于装备的模块化性质,相衬和微分干涉差(DIC)也能被整合入此装备。

[0715] 可使用三条激光线(如488nm、532nm和640nm)实现落射荧光照明,但由于系统的模块化性质,其他激光源、LED和标准弧灯(如氙、汞和卤素)等其他光源也能被整合入此系统。另外,如有要求,可同时使用两种不同的光源。因此,该血细胞计数平台可被用于对很多种荧光染料成像。照明源和发射光学器件的组合可被配置为实现多个(如3-5)光谱独立的成像通道。

[0716] 通过使用(位于样品上方或者下方)环状照明、暗场阿贝聚光镜、带有超环面镜的暗场聚光镜、内置于物镜周围套筒内的落射暗场聚光镜,或者环状照明与带有挡光板的台式聚光镜的组合,可实现暗场照明。从根本上说,这些光学部件生成锥形光束,其数值孔径(NA)大于所使用物镜的NA。照明方案的选择取决于多种考虑,比如所要求的放大、机械设计考虑、成像传感器大小等。基于环状照明的照明方案一般为更宽的区域提供均匀暗场照明,同时整个系统的机械设计还具有充分的灵活性。图124为使用暗场像的胞内模式示例。此示例显示人类白细胞在暗场图像中的不同胞内模式。(a)由于嗜酸粒细胞中存在颗粒造成的强散射模式,(b)具有特有核仁叶的多形核中性粒细胞,和(c)无高光学散射程度的细胞(淋巴细胞或嗜碱粒细胞)。

[0717] 通过使用白光源及台式聚光镜以生成凯勒照明,可实现亮场照明。图126为人类全血亮场像的示例。该示例显示为经Wright-Giemsa染色方法染色的人类全血涂片亮场像。可明显看到人类白细胞染色的特有模式。在这些图像中,还可以识别具有特有形状的红细胞。

[0718] 自动滤光轮:自动滤光轮可控制成像光学路径,以实现同一视野中的多个荧光体成像。

[0719] 基于图像的自动对焦:血细胞计数平台可使用基于图像的算法控制物镜的z位置(如垂直位置)(即其离样品的距离)以实现自动对焦。简言之,使用暗场照明快速捕捉小图像(例如128x128像素)。可分析此图像以导出自动对焦函数,其可被用于量度图像的清晰度。根据一种快速检索算法计算物镜的下一个z位置。物镜可被移至新的z位置,然后捕捉另一小图像。在一些实施例中,此闭环系统不要求使用任何其他硬件进行对焦。

[0720] 台子平移:显微镜台可与计算机控制的步进电机相连,以实现在X和Y方向(如水平

方向)的平移。在每个位置,捕捉所需数量的图像,然后台子被移至下一个XY位置。

[0721] 成像传感器:带有CCD、EMCCD、CMOS或有些情况下光电倍增管的相机可被用于检测信号。

[0722] 5.分析图像的以提取所需的细胞属性。

[0723] 血细胞计数平台可使用不同的照明技术以获取展现细胞不同属性和特点的图像。采用细胞标记物特异的结合子进行标记可显示该特定标记物在细胞表面或细胞内的表达程度。暗场图像可显示细胞的光散射属性。在暗场图像中,散射更多光的细胞内部和外部特征看上去更亮,而散射较少光的特征看上去更暗。粒细胞等细胞具有处于尺寸范围(100-500nm)内的内部颗粒,它们会分散大量的光,且在暗场图像中一般看上去更亮。另外,任何细胞的外边缘会散射光,看上去像一个亮光环。此环的直径可直接给出细胞的尺寸。细胞的亮场图像可显示细胞尺寸、细胞中的密相材料,以及细胞内的有色特征(如果细胞事先经染色)。

[0724] 图像处理库可为各细胞提取一种或多种下列信息(但不限于下列信息):

[0725] 1.细胞尺寸

[0726] 2.细胞粒度(在流式血细胞计数术语中,又通称为“侧向散射”)的定量测量

[0727] 3.在补偿过光谱通道间的干扰后,对各成像光谱通道中的荧光进行的定量测量

[0728] 4.由标准及习惯属性量化的细胞形状,比如高宽比、弗里特直径、峭度、惯性矩、环状、实度等。

[0729] 5.当细胞经染料染色(不是附于抗体或其他类型的受体)时,细胞颜色、颜色分布和形状。

[0730] 6.定义为生物特征的定量度量的染色或散射或颜色的胞内模式,例如暗场图像中的细胞内颗粒密度,或多形核中性粒细胞的Giemsa-Wright染色图像中核仁叶的数量和尺寸。

[0731] 7.不同图像中显示的细胞特征的共同定位

[0732] 此步骤中运用的该图像处理算法库可使用对象的图像过滤、边缘检测、模板匹配、自动阈值、形态学操作及形状分析的组合。

[0733] 6.运用高级统计和分类方法导出可临床报告的信息,由此完成对提取信息的分析。

[0734] 可从细胞图像中提取任意数量的测量属性。例如,从图像提取的各细胞测量属性可在7-15的范围内,由此生成一个7至15维的空间,在该空间中,各细胞是一个点。如果从图像提取n个测量属性,可提供n维空间,其中各细胞是一个点。

[0735] 根据为大量细胞(如100-100,000个细胞)获取的数据,可生成复杂的n维分散数据集。

[0736] 可采用统计方法将细胞聚类成此n维空间中的各独立群。这些方法还可在聚类和细胞群体识别中运用来自细胞生物学和血液学的最新知识。

[0737] 图125为对标记细胞样品进行多参数数据采集的示例。用泛白细胞标记物抗CD45-Alexa Fluor 700(图中显示为绿色)和B细胞标记物抗CD22-APC(图中显示为红色)标记人类白细胞。各通道显示不同的CD45、CD22表达和侧向散射型态。对CD22和CD45呈阳性的细胞(B淋巴细胞)显示特有的低侧向散射。在另一方面,具有高侧向散射的中性白细胞和嗜酸粒

细胞等细胞不显示CD22的标记。

[0738] 图127为定量多参数数据采集和分析的示例。例如,可提供直方图显示人类白细胞上的CD45强度分布。可运用任何其他图像数据分布技术显示该分布。在一些实施例中,可提供侧向散射的散布图。此侧向散射可由人类白细胞的暗场图像分析相对CD45荧光强度确定。此侧向散射图可显示粒细胞(上左)和淋巴细胞(下右)两个主要群。

[0739] 以上部分描述了血细胞计数平台和应用的主要成分和能力。根据这些能力,各种基于细胞的分析可被设计在此平台上工作。例如,可提供执行5部分白细胞分类的分析。此种情况下,可报告的为对于下列白细胞类型,每微升血液中的细胞数量:单核细胞、淋巴细胞、中性白细胞、嗜碱粒细胞和嗜酸粒细胞。在血细胞计数平台上开发这种分析的基本策略是将其转换成一个问题,其中测量白细胞的一些属性,比如侧向散射、CD45荧光强度或CD20荧光强度,这样在此n维空间中,白细胞可被分离成(如5个)不同的群。围着一群细胞的区域可在2维空间中被定位在散布图上,并根据流式血细胞计数术语被称为“门”。

[0740]	<b>标记物</b>	<b>标记</b>	<b>目的</b>
	CD2/CRTH2/CD19/CD3 混合物	PE-Cy7	识别淋巴细胞、标记嗜碱粒细胞和嗜酸粒细胞
	CD45	Alexa-Fluor 647	泛白细胞标记物, 以标记所有白细胞
	CD14/CD36 混合物	FITC	识别单核细胞

[0741]	细胞类型	“门”
	嗜碱粒细胞	CD2/CRTH2/CD19/CD3阳, SSC低, CD45中, CD14/CD36低
	嗜酸粒细胞	CD2/CRTH2/CD19/CD3阳, SSC高, CD45高, CD14/CD36低
	中性白细胞	CD2/CRTH2/CD19/CD3阴, SSC高, CD45中 (较少嗜酸粒细胞)
	淋巴细胞	CD2/CRTH2/CD19/CD3阳, SSC低, CD45高, CD14/CD36低
	单核细胞	CD2/CRTH2/CD19/CD3阴, SSC中, CD45中, CD14/CD36阳

[0742] 使用有序样品, 本文所述血细胞计数平台和分析系统可有利地实现自动样品准备和执行。与VCS (体积、传导率和散射) 形成对照, 所述系统和方法还可实现特异性细胞识别, 这可提高识别置信度, 减少确认测试的情况。本文所述图像分析还可保存细胞图像用于今后要求的确认、分析。另外的优点是可以获得细胞的形态特征。在一些实施例中, 可提供样品准备和成像参数的动态调整, 以处理具有各种各样浓度的细胞样品。

[0743] 在一些实施例中, 可使用离心分离机准备和浓缩细胞群体。方法可包括在本文其他地方所述的细胞准备和成像及分析系统中使用离心分离机。

[0744] 在一些实施例中, 可使用暗场成像与染有多个荧光抗体的细胞成像的组合。此类组合可在装置中提供FACS分析的相等物, 而此装置比其他技术要简单、便宜得多。

[0745] 根据本发明的一些实施例, 本文所述的系统和方法可实现一个或多个下列特征。此类特征对各种应用有利。在一些实施例中, 可实现自动样品检查和处理。此类样品检查和处理可包括一个或多个下列内容: 样品质量、样品体积测量、稀释 (和稀释因子测量), 和红细胞从血浆中的分离。

[0746] 还可采用一种自动化学/分析相关进程。这可包括沉淀、混合或沉降。

[0747] 在一些实施例中, 可对生成冷光或改变光线 (如颜色化学品) 的任何及所有分析进行自动测量。这些可包括一个或多个下列技术: 分光光度测定法、荧光测定、发光测定、浊度

测定、散射测浊法、折射测定、3色图像分析、旋光测定法、凝集测量、图像分析(其可运用一个或多个下列技术:相机、数字相机、扫描仪、无透镜摄影、3维摄影、视频摄影),或显微镜检查。

[0748] 还可在本文所述的系统和方法中提供自动分析质量控制和/或校准。

[0749] 在一些实施例中,可提供双向通信。此类通信可实现所有分析步骤的记录保存。该双向通信还可改变分析程序以优化或提高多项分析的完成。

[0750] 质量控制/补充应用

[0751] 在一些实施例中,成像可与一个或多个其他测量或检测步骤一起使用。成像可作为对其他技术、流程、反应和/或分析的补充。例如,成像可被用于对样品准备、分析或检测步骤等任何其他行动进行一个或多个质量控制检查或步骤。成像可被用于促进其他检测。成像可被用于提高所采集数据的准确度和/或精确度。成像可成为核实数据、结果和/或任何测量的质量控制部分。成像可成为控制机制或改善机制。成像可被用于检测可能影响所采集数据和/或该数据的准确度和/或精确度的一种或多种状况。因此,成像可提高样品准备、分析或检测操作。对具有小样品体积的情况,比如本文其他地方所述的体积,这可极为有利。

[0752] 在一个示例中,可具有检测步骤以确定分析物的存在和/或浓度。可检测一种或多种信号,该信号代表对随后定性和/或定量评估有用的数据。检测可包括或不包括可见光检测。检测可包括测量电磁光谱中任一点发出的能量(如红外、微波、紫外、 $\gamma$ 射线、X射线、可见光)。可使用任何类型的传感器进行检测,传感器可包括光传感器、温度传感器、运动传感器、压力传感器、电传感器、声音传感器、化学传感器、光谱仪,或本文其他地方所述的任何其他传感器,或其任意组合。在一些实施例中,检测可包括或不包括光和/或能量的空间分布。在一些情况下,检测可包括或不包括能量密度分布。

[0753] 成像可能够检测一种或多种执行检测的条件。成像可被用于检测样品、试剂、容器、可被用于检测的装置的部分的状况。在一些实施例中,成像可为可视成像。例如,成像可包括捕捉快照、照片和/或相片。成像可包括捕捉电磁光谱中能量的空间分布。该电磁光谱中能量可包括可见光,或可包括其他范围(如红外、紫外或任何其他本文所述的范围)。例如,可见光的空间分布可包括二维图像。在一些实施例中,成像可包括使用图像捕捉装置,该装置在本文其他地方已详细描述。图像捕捉装置的一些示例包括相机,如无透镜(计算)相机(如Frankencamera)或开源相机。图像捕捉装置可能够捕捉信号,而该信号能够生成被成像物体的一维、二维或三维表现。在一些情况下,图像捕捉装置可运动感应输入装置,被配置为提供物体的三维或伪三维表现。

[0754] 成像技术可与所用检测机制相同或不同。在一些情况下,检测步骤和质量控制成像步骤之间采用不同类型的检测机制。在一些情况下,检测可包括能量带评估或能量密度分布,比如使用光谱仪,而质量控制成像可包括可见光的空间分布,比如用相机。

[0755] 可通过成像实现灵敏检测。例如,成像装置可能够捕捉以下尺寸内的图像:1mm、500微米( $\mu\text{m}$ )、200 $\mu\text{m}$ 、100 $\mu\text{m}$ 、75 $\mu\text{m}$ 、50 $\mu\text{m}$ 、25 $\mu\text{m}$ 、15 $\mu\text{m}$ 、10 $\mu\text{m}$ 、7 $\mu\text{m}$ 、5 $\mu\text{m}$ 、1 $\mu\text{m}$ 、800纳米(nm)、700nm、500nm、300nm、100nm、50nm、30nm、10nm、5nm、1nm、500皮米(pm)、300pm或100pm。在一个示例中,可通过相机实现该成像,该相机可具有高于或等于约2百万像素、4百万像素、6百万像素、8百万像素、10百万像素、12百万像素、15百万像素、20百万像素、25百万像素、30百

万像素、40百万像素、50百万像素或更高的分辨率。

[0756] 成像可被用于检测错误或其他故障状态。成像可被用于确定会提高错误可能性和/或导致不精确度和/或不准确度的条件。例如,成像可被用于确定一种或多种不希望有的材料的存在和/或不存在。不希望有的材料的示例可包括气泡、颗粒、纤维、微粒、残渣、沉淀物或可影响测量的其他材料。在另一示例中,成像可被用于确定一定体积的样品、试剂或其他材料是否处在所需范围内,或样品、试剂或其他材料是否位于所希望的位置。成像可被用于确定样品、试剂或其他材料的浓度,或样品、试剂或其他材料是否处在所需浓度范围内。

[0757] 在一个示例中,可在小体积的样品上完成酶分析。本文其他地方已提供了体积值的示例。光谱仪或本文其他地方所述的其他检测方法或机制可被用于执行酶分析的检测步骤。可执行成像步骤以确定进行检测所处的条件。例如,该成像步骤可确定是否有气泡等不希望有的微粒或任何其他不希望有的条件。该成像步骤可核实分析是否按计划进行。该成像步骤可证实分析进行和/或检测被执行所处操作条件是否处于所需的公差或优化条件内。在一些示例中,成像可包括对容器中发生的反应拍快照。可分析所捕捉的图像以发现任何不希望有的和/或希望有的条件。在一些情况下,可用计算机辅助方法自动分析所捕捉的图像。一个或多个处理器可帮助对所捕捉图像的分析,在某些情况下,通过储存在内存上的机器可执行编码,运行一个或多个程序完成。成像可被用于质量控制,而不要求人类的介入。

[0758] 成像可为系统提供情报。成像步骤可提供关于样品准备、分析和/或检测所处条件的情报。当在质量控制操作中使用成像时,检测方法可在定点服务装置或该装置的部件上提供更可靠、准确和/或精确的测量。

#### [0759] 动态反馈

[0760] 在一些实施例中,可在样品处理步骤中提供动态反馈。例如,可在样品准备步骤、分析步骤和/或检测步骤中进行动态反馈。在一些实施例中,动态反馈可通过成像提供。或者,动态反馈可经由任何其他检测机制进行,比如本文其他地方所述的那些机制。在一些实施例中,动态反馈机制可使用光学检测、机电、阻抗、电化学、微流体、任何其他机制或其组合。

[0761] 动态反馈机制可选地可使用成像或其他检测机制。动态反馈可被包括在系统的自动决策中。例如,可捕捉一个图像,然后可捕捉要在决定步骤中考虑的数据。成像传感器等传感器可捕捉物理信息,而此物理信息可被用于决定下一步或操作。此类下一步或操作可以自动方式在运行中确定。

[0762] 在一个示例中,可进行动态稀释。试管或本文所述的任何其他容器等容器中可含有一个样品。动态反馈机制(如成像、光谱仪或其他检测机制)可确定样品的浓度。在一些实施例中,该确定可为大约或粗确定。起初的确定可为粗略确定,以提供反馈把样品放入一种状态,从而进行更精确或经微调的检测和/或分析。在一个示例中,该动态反馈机制可为一种成像方法,其可通过最初荧光检测完成对浓度的最初估计。

[0763] 动态反馈机制可确定样品浓度是否在可接受范围内。在一个示例中,该浓度可为细胞浓度。可进行大约的细胞计数以确定细胞浓度。来自动态反馈机制的一个或多个信号可被用于细胞计数。在一些实施例中,细胞浓度可处于一个很宽的范围内。在一些情况下,

该浓度可在1、2、3、4、5、6、7或更多的数量级上变化。在一些实施例中,取决于要测量和/或分析的细胞或分析物,可在同一样品中提供不同的浓度。根据所确定的浓度,该样品可被稀释或浓缩和/或扩增。例如,如果浓度高于所需范围,样品可被稀释。如果浓度低于所需范围,样品可被浓缩和/或扩增。稀释和/或浓缩/扩增的程度可根据所估计的浓度在运行中确定。

[0764] 可通过自动方式确定稀释和/或浓缩/扩增的程度。动态反馈可被自动化。动态反馈机制(如成像或其他检测机制)可提供经分析可用于确定操作条件的数据。例如,可根据动态反馈机制确定样品浓度。可提供能够接受和/或处理来自动态反馈机制的一个或多个信号的处理器。根据所收到的信号,处理器可确定浓度和该浓度是否在所需范围内。如果该浓度在所需范围内,处理器可决定不再需要稀释或浓缩/扩增。如果该浓度高于所需范围,处理器可决定需要稀释。根据浓度偏离所需范围的程度,处理器可决定需要的稀释程度。如果该浓度低于所需范围,处理器可决定需要浓缩(或扩增)。根据浓度偏离所需范围的程度,处理器可决定需要的扩增程度。此类确定可基于有形计算机可读介质,其可包括执行一步或更多步骤的编码、逻辑或指令。此类确定可被自动化,因此不需要人类介入即可完成。这可适用于所有操作条件,且不限于细胞浓度等样品浓度。

[0765] 在一些实施例中,在最初反馈测量和稀释或浓缩/扩增步骤后,可进行更精确的测量。例如,可在样品被确定在所需范围内后,进行更精确的细胞计数测量。在一些实施例中,经过单次稀释和/或浓缩/扩增步骤后,样品可达到所需范围。在其他实施例中,如有需要,可执行更多的反馈步骤,并提供更多的稀释和/或浓缩/扩增步骤。例如,如果最初确定发现样品具有高浓度,可执行稀释步骤。在稀释步骤后,可选地执行又一反馈步骤。如果样品浓度没有在所需(或预定的)范围内,可执行又一稀释或浓缩/扩增步骤,分别取决于测量浓度是高于还是低于所需范围。这可重复需要的次数,直到样品在所需范围内。或者,可重复或不重复反馈步骤,或被重复固定次数。在一些实施例中,每次反馈步骤都具有更高的精确度。或者,可在每次反馈步骤中使用同样的精确度。

[0766] 在一些实施例中,当样品浓度(如细胞浓度、分析物浓度)在所需范围内时,可有效地分析该样品。例如,样品细胞浓度可具有有利于成像的所需范围。可为每个视野提供需要数量的细胞。

[0767] 可通过在成像过程中控制细胞密度,并由此限制细胞的拥挤和聚类,从而加强依靠成像进行的细胞量化和计数。因此,其中分析是线性的分析物浓度范围可被最大化或增加。为了扩展分析的线性范围,动态系统可采用具有高动态范围的方法对样品进行预先、非破坏性的测量,以确定样品中的大约细胞浓度。随后,可通过算法计算使细胞浓度处于主测量能接受的范围所需的稀释比。可相应提供稀释和/或浓缩/扩增,由此提供动态稀释和/或浓缩。

[0768] 动态稀释等此类动态反馈可有利于采用小体积的系统。在一些实施例中,总样品体积可包括本文其他地方所述的任一种体积。在一些情况下,需分析样品特定部分的体积可为本文其他地方所述的任一种体积。动态稀释有助于提供低变化系数。例如,样品准备、分析和/或检测步骤的变化系数可为本文其他地方所述的变化系数。这有利于定点服务装置,其可使用小体积和/或具有低变化系数。

[0769] 动态反馈可有利于实现对样品的非破坏性测试。这对采用小体积的系统有利。同



样的样品可被用于最初反馈检测及随后的检测。同一样品可在同一容器(如试管、小瓶、吸头)中被用于最初反馈检测及随后的检测。器皿中可装有在其最初状态处于所需和/或可检测范围之外的样品。例如,一种或多种分析物和/或细胞的浓度最初可处于所需和/或可检测浓度范围之外。同一样品可在同一器皿中经测量在范围内。在一些实施例中,同一器皿中的该一种或多种分析物和/或细胞的浓度随后可处于所需和/或可检测浓度范围内。在一些实施例中,可对样品执行稀释和/或浓缩/扩增等一个或多个介入步骤,以便使样品进入该所需和/或可检测浓度范围。可以自动方式执行此类介入步骤。

[0770] 在一些实施例中,可以自动方式对样品进行稀释。例如,一种稀释剂可被分配入装有样品的容器中,并与样品混合以达到新的样品体积。在一些情况下,该稀释剂包括单个稀释剂。在其他情况下,该稀释剂包括多个稀释剂。可通过泵送系统、阀门和/或流体流动通道促进流动,将稀释剂分配入容器中,比如具有一个或多个微流体通道和/或一个或多个微流体泵的微流体系统。该微流体系统可包括一个或多个机械和/或机电部件,比如机械泵送系统,其具有一个或多个致动(如气动致动)阀门以促进流体的流动。在一些情况下,该泵送系统包括被配置为促进流体流动的机械泵。该泵送系统可包括一个或多个传感器以测量并向控制系统传递操作参数,比如流体流速、浓度、温度和/或压力。在一个示例中,稀释剂经由一个微流体系统被分配入容器中,该稀释剂经由一个微流体系统具有与微流体通道相连的机械泵,使得容器与稀释剂池成流体连通。

[0771] 在一些情况下,提供泵送系统以便根据所测量的样品稀释放入稀释剂。可通过例如光传感器等传感器测量该样品稀释。在一个示例中,该光传感器与光源相连,以引导光束通过样品,随后至少部分根据通过样品的光散射测量样品稀释。如果所测量的样品(如细胞、组织)浓度高于预定极限(或阈值),则该泵送系统将稀释剂(如水)从稀释剂池引入含有样品的容器。

[0772] 在一些实施例中,在流体流动系统帮助下,动态稀释经电子自动化,该系统具有一台与流体流动通道(如微流体通道)成流体连通的泵(如微流体泵),且更包括一个或多个阀门用于调节流体流动。稀释自动化可被用于测试和/或调节校准设定,比如用于实现所需浓度的预置稀释流体体积。

[0773] 在一些情况下,该泵包括一个或多个阀门,比如气动致动阀门。该泵、流体流动通道和一个或多个阀门将稀释剂池与被配置为盛样品的容器形成流体连通。该一个或多个阀门和/或泵可与控制系统成电气连通,该控制系统具有一个处理器以便调节从稀释剂池出来的稀释剂流,从而调节样品的浓度。

[0774] 动态反馈有利地实现样品浓度的自动调节,同时最小化(如果不是消除)用户参与。在一些情况下,样品浓度经自动调节(如稀释或扩增),而不需任何用户参与。此最低程度的用户参与可提供成像和总体系统使用中的低变化系数,如本文其他地方所述。

[0775] 在一个示例中,动态反馈被用于通过成像调节液体样品中细胞浓度。对于试管等样品容器中提供的样品,成像被用于测量液体样品中的细胞浓度。所测量的浓度可为大约(或粗略)浓度测量。随后,通过向样品容器中提供稀释剂,动态反馈系统稀释该液体样品。这可最小化(如果不是消除)稀释时对细胞造成的任何干扰(或破坏)。在稀释后,可执行液体样品中细胞浓度的可选测量以测量浓度。在一些情况下,可在稀释后在用于稀释样品的同一样品容器中进行反应。在一些情况下,可在稀释不是最理想的例子中进行反应。

[0776] 在一些情况下,在动态反馈中用光谱仪进行样品浓度的粗略测量,并用成像装置进行样品浓度的更精确测量。成像装置可包括光源(如激光等相干光或非相干光)和相机,比如电荷耦合器(CCD)相机。在一个示例中,在粗略测量后,动态反馈系统通过提供稀释剂粗调样品浓度,随后进行更精确的测量。可通过提供比粗调中所用稀释剂体积小的稀释剂体积(即微调),进一步调节样品浓度。或者,使用成像装置进行样品浓度的粗略测量,并用光谱仪进行样品浓度的更精确测量。粗调和微调

[0777] 本文所述动态反馈系统可被配置为浓缩/扩增(即提高其浓度)样品,比如液体样品中的细胞。在一些情况下,这通过离心或场致分离(如电场分离、磁分离)完成。

[0778] 在一些情况下,使用成像装置完成样品浓缩,而该成像装置的位置经选择得到所需的路径长度和/或焦点。在一些情况下,可调节与成像装置相关的一个或多个光学器件的位置,以提供所需的路径长度和/或焦点。在一些情况下,使用无透镜相机捕捉图像,其可通过计算提供图像分析和各种焦点。

[0779] 可在各种样品体积上进行动态稀释。在一些情况下,如果样品体积超过预定极限,可将该样品分布在多个样品容器(如试管)中,以进行连续或并行处理和/或成像。

[0780] 自学习

[0781] 动态反馈机制可导致系统的自学习。例如,对于动态稀释/浓缩系统,可进行最初反馈测量。根据该反馈测量,样品可不采取行动、可被稀释,或可被浓缩/扩增。随后可进行测量和/或检测。随后的测量和/或检测可以是或可以不是额外的反馈测量。根据随后的测量,可决定所采取的行动(如无行动、稀释、浓缩/扩增)是否正确和/或是否采取了正确程度的行动(如充分的稀释或浓缩/扩增)。例如,最初反馈机制可确定样品浓度高,需要稀释。样品可被稀释特定的数量。可进行随后的测量(如可获取样品的图像)。如果稀释程度未使样品进入所需范围(如稀释过多或过少),该系统可收到指示,即对具有同一或类似最初反馈机制的随后动态稀释/浓缩,可使用不同程度的稀释。如果稀释程度使样品进入所需范围,该系统可收到确认,即对于同一或类似类型的最初反馈测量,该稀释数量应被用于随后的稀释中。

[0782] 可根据最初条件和随后的行动采集数据,这有助于确定在随后的动态反馈情况中,要采取的合适行动。这可让系统随时间自学习特定动态情况下应采取的步骤。该自学习可适用于个体化的情况。例如,该自学习系统可学习,从其抽取样品的特定个人可能需要不同于另一个人的稀释/浓缩程度。该自学习可适用于具有一个或多个特征的一组人。例如,该自学习系统可学习,使用特定类型药物的个人可能需要不同于另一个人的稀释/浓缩程度。该自学习系统还可被一般化。例如,该系统可了解模式,即特定人群或具有特定特征的人可要求或不要求不同的稀释/浓缩程度。该系统可利用过去的数据点、个人记录、其他个人记录、一般健康信息、公共信息、医疗数据和统计、保险信息或其他信息。其中一些信息可在互联网(如网站、文章、期刊、数据库、医疗统计)上公开获得。该系统可选地可搜索网站或数据库寻找对信息的更新。在一些实施例中,自学习可在装置、云或外部装置上实现。随着采集到更多的数据,其可被上载至云或外部装置,且可被该自学习系统访问。

[0783] 图像捕捉和/或操纵装置

[0784] 在一些实施例中,样品准备、处理和/或分析由图像捕捉和/或操纵装置完成,该装置包括电磁辐射(或光)捕捉和/或操纵装置,比如成像装置或光谱仪。在一些情况下,成像

装置可与光谱仪一起使用。光谱仪可被用于测量光在电磁光谱中选定部分上的属性,这些属性可被用于光谱分析,比如材料分析。成像(或图像捕捉)装置可被用于测量样品浓度、组成、温度、浊度、流速和/或粘度。

[0785] 在一个示例中,图像捕捉装置可为数字相机。图像捕捉装置还可包括电荷耦合器件(CCD)或光电倍增器及光电管,或光电检测器或其他检测装置,比如背光式以及前光式扫描显微镜。在一些情况下,相机可使用CCD、CMOS,可为无透镜(计算)相机(如Frankencamera)、开源相机,或可使用本领域熟知的任何其他视觉检测技术。在一些情况下,成像装置可包括可为透镜的光学元件。例如,该光学元件是从检测器上的透镜焦平面捕捉光。相机可包括一个或多个光学元件,其可在使用中聚焦光线,或可捕捉以后聚焦的图像。在一些实施例中,成像装置可采用2维成像、3维成像和/或4维成像(包括随时间的变化)。成像装置可捕捉静态图像或动态图像(如视频)。静态图像可在时间的一点或多点被捕捉。成像装置还可捕捉视频和/或动态图像。视频图像可在一个或多个期间中被连续捕捉。

[0786] 在一些情况下,图像捕捉装置是计算相机,其被用于在较短期间(比如立刻)测量多个样品的浓度。在一些实施例中,该计算相机可具有不同于透镜的光学器件。在一个示例中,该计算相机是无透镜相机,其对一系列样品容器(如试管)中的多个样品拍照。随后,某一特定样品容器中的样品浓度可经由以下方式计算:例如以数学方式表现该图像,选择位于或靠近具有该特定样品容器的图像部分的焦点,并从所表现的图像导出样品浓度。对由无透镜相机获取的图像的这种数学操作可提供在该无透镜相机的视野中空间各点的其他信息,其中可包括从散射光推知的空间点。在一些实施例中,可通过复杂算法分析最终的信号。此装备的一个示例是具备光学元件的计算相机,其可在检测器上生成傅立叶变换图像。所得“图像”可经过分析以提取所需信息。该检测器可让人能够从拍照主体获得丰富的信息。例如,从图像获得不同的特征,就可纯粹通过软件获得在不同焦距下的信息,简化成像硬件并提供更多快速、有益的数据采集。

[0787] 电磁辐射捕捉和/或操作设备可被用于本文所述的各种应用中,比如测量样品浓度,包括动态稀释。在一个示例中,光捕捉和/或操作设备包括与CCD相机等光传感器耦合的相干光(如激光)等光源,用于捕捉光源对准样品时可从样品发出的散射光。这可被用于测量样品的浓度。光传感器可被配置为捕捉(或感应)不同光波长,比如红、绿和蓝,或其它颜色组合,其中的一些示例如红色、桔色、黄色、绿色、蓝色、紫蓝色和紫色的组合。在一些情况下,除了光的可见波段外,光传感器还被配置为感应具有与红外或近红外相等或更长波长的光,或具有与紫外相等或更短波长的光。

[0788] 光捕捉和/或操作设备可被用于在特定时间点或不同时间点采集信息,这些信息可被用于制作具有多个静止图像和/或与图像相关的声音(或其它数据,比如文本数据)的视频。

[0789] 包括计算(或无透镜)相机在内的光捕捉和/或操作设备可被用于捕捉二维图像或三维(或伪三维)图像和/或视频。

[0790] 在一些实施例中,图像捕捉和/或操作设备扰动对象并测量因该扰动而产生的响应。该扰动可通过光(如X射线、紫外光)、声音、电磁场、静电场或其组合完成。例如,通过声音作出的扰动可被用于声成像。声成像可运用相似的原则诊断用于医学的超声。声成像可与普通显微镜起同样的作用,但可使用声波。超声源可生成能穿过样品并因样品弹性中不

均匀性而被反射/散射的波。被反射的波可被传感器“成像”。此方法的一种变体可包括“光-声成像”，其中穿过样品的声波可导致样品的局部压缩和伸长。这种压缩/伸长可造成样品材料折射率的变化，而激光束对样品的测量/成像可检测到这种变化。

[0791] 在一些情况下，成像装置可被用于测量细胞体积。在一个示例中，光源与CCD相机的组合被用于捕捉细胞的静止图像。计算机系统数字化该静止图像，并穿过细胞，比如穿过细胞中心画一根线。该计算机系统随后测量该线与细胞边界线(或细胞壁或膜)的交叉点之间的距离，以提供对细胞直径的估计，这可被用于估计细胞的体积。

[0792] 成像装置可使用线扫描显微镜对样品使用相干激光细线或点进行照明，这样光源的功率可被集中在一个小区域，从而获得高功率密度。检测器的几何形状可与该线或点匹配。可沿该线/点对整个样品扫描，使得其不同部分可被成像。各条扫描线随后可被连结以形成整幅图像(例如，像文件扫描仪那样的类似方式)。作为分析/成像方法，这种方法具有优点，其一个或多个原因如下：(1) 照明的高功率密度，(2) 相对点扫描，线扫描可获得较高的速度(尽管两者都比全幅或传统成像要慢)，(3) 对于样品的分析测量，比如荧光、吸收率、冷光等，具有高精度和/或准确度，(4) 与光谱或高光谱成像的组合，使得可对各像素获得样品的整个光谱，(5) 对分辨率进行动态调整(即在不改变任何元件的情况下，能对样品在所需要的低或高横向分辨率进行扫描)，或(6) 可提供高景深，能够对组织样品进行成像。

[0793] 在一些实施例中，成像装置被配置为检测从电离(荧光或冷光)事件发出的光，比如通过闪烁。在一个示例中，闪烁器被覆有或嵌入包括样品容器的一种材料。当样品与闪烁器耦合(或以其他方式相互作用)时，该闪烁器发出被成像装置检测器检测的光(比如荧光)。这可被用于测量特定样品的放射性衰变(如 $\alpha$ 和/或 $\beta$ 衰变)。

[0794] 在一些情况下，成像装置是用于测量离子等带电粒子等场效应晶体管。或者，该成像装置可以是用于测量热变化的热检测器，其可被用于例如构造热图。

[0795] 在一些情况下，样品容器包括一个或多个孔固定样品。该样品容器可与对固定在该一个或多个孔中的样品成像的成像装置耦合。可布置在例如孔底部的具有表面结合剂(如抗体)的微球或表面结合剂可促进样品固定。孔的直径可在纳米或微米或更大的数量级上。

[0796] 在一些实施例中，染料等图像增强物质可促进样品检测和/或分析。染料可与样品结合，提供可被成像装置的检测器检测的光学、电或光电子信号。在一个示例中，染料与细胞和荧光结合，其可被检测器记录。通过测量荧光，可测量细胞的空间分布和/或浓度。图像增强物质可帮助实现提高图像采集(或捕捉)过程中的信噪比。染料可在表面受体和/或抗体的帮助下与细胞结合。

[0797] 在一些情况下，染料的使用可生成背景荧光，其会扭曲图像—荧光样品会难以与荧光背景区分开。在这种情况下，可通过把液体中的样品与荧光染料接触，增强图像采集。未结合的染料可在离心分离机(或磁或电分离)的帮助下被去除。离心分离机可被集成在配有成像装置的定点服务装置中。随后可再悬浮样品于液体中，并接着在成像装置的帮助下对样品成像。

[0798] 在一些情况下，可使用动态反馈增强图像采集，动态反馈可在图像增强物质之外另行添加或替代图像增强物质。在一个示例中，图像采集前的稀释和/或扩增可帮助优化样品浓度。

[0799] 离心分离机有助于样品分离。作为选择,可通过磁或电场完成样品分离。例如,磁性颗粒可与细胞结合,其可在磁场存在的情况下被用于吸引细胞至磁性吸引力的来源。

[0800] 本文所述系统和方法可被运用于各种类型的样品,比如可从组织(如皮肤、血液)获取的细胞、唾液或尿液。在一个示例中,动态反馈和/或成像可被运用在组织样品或从该组织样品获取的细胞样品上。

[0801] 示例

[0802] 示例1:通过环介导等温扩增(LAMP)完成的核酸扩增

[0803] 进行下列实验以评估3色图像分析方法对荧光或吸收读取LAMP分析的能力。

[0804] Lamp反应条件

[0805] LAMP反应在500uL PCR管(VWR,West Chester,PA)中进行的总体积为25μL。反应混合物包括0.8μM引物1和引物2、0.2μM引物3和引物4、dNTP(Invitrogen,Carlsbad,CA)各400 μM、1M甜菜碱(Sigma,St.Louis,MO)、1X Thermopol缓冲(New England Biolabs,Ipswich,MA)、2mM MgSO<sub>4</sub>(Rockland Immunochemicals,Gilbertsville,PA)、8U Bst DNA聚合酶长片段(New England Biolabs,Ipswich,MA)和给定数量的DNA模板(在~10和~10<sup>9</sup>份的范围内变动)。在阴性空白的情况下,加入约10<sup>9</sup>份不相干的DNA。

[0806] 反应条件

[0807] 反应在密封管子中在65℃下培养1小时。随后将反应产物加热至80℃5分钟时间,由此将聚合酶灭活。

[0808] 产物检测和可视化

[0809] SYBR绿色I染剂(Invitrogen,Carlsbad,CA)母液被稀释100倍,5μL与完成的10μL LAMP反应产物混合,并在室温下培养5分钟。随后以下述方式读出反应产物:

[0810] 荧光读数:容纳有混合物的PCR管或移液吸头被302nm UV和荧光( $\lambda_{\text{最大}} \sim 524\text{nm}$ )照射,并由数字相机(Canon EOS T1i,18-55mm,Canon,Lake Success,NY)成像。

[0811] 颜色读数:反应产物被吸入吸头,并使用数字相机成像。

[0812] 结果:

[0813] 图81示出试管中分析产物的荧光图。

[0814] 图89示出用于吸头中反应产物的荧光图。

[0815] 图82、图83、图84、图85、图86和图87示出吸头中反应产物的颜色图像。图88示出用于校准而获取的背景颜色图像。

[0816] 图90示出通过测量“主体”荧光(传统荧光测定法)获得的LAMP剂量依赖响应与通过相机获得的双颜色通道响应之间的比较。很明显,该颜色方法获得的响应与荧光测定法的结果相当。

[0817] 当根据本文所述方法使用所有三个颜色通道分析和校准颜色图像时,经校准颜色信号与荧光信号之间有着明显的紧密关系,如图91所示。

[0818] 示例2:系统最大化样品使用

[0819] 用于最大化样品使用的系统可具有下列特征:

[0820] 1. 高效血液分离成血浆及高效血浆回收

[0821] a. 通过离心在毛细管中完成分离

[0822] 2. 血浆稀释至数个适合于高、低灵敏度分析的预定水平

- [0823] 3. 将各分析要求的各分析反应混合物体积减少到最小程度
- [0824] a. 使用开口小容量试管, 便于分析培养, 同时防止蒸发
- [0825] i. 相对于宽度, 试管较长
- [0826] b. 在该小容量试管中, 通过修改光学路径提高分析信号灵敏度
- [0827] i. 试管为锥形, 或具有宽和窄的宽度
- [0828] c. 如有需要, 在进行光学测量时, 通过移动反应产物 (其未填满试管) 至具有更长路径的选定位置, 从而实现所述分析信号灵敏度的提高
- [0829] i. 试管内部体积远大于分析混合物的体积
- [0830] 4. 使用可变路径长度和3色通道分析两者之一或两者同时以提高分析的有用动态范围

[0831] 示例3: 定点照护分析装置

[0832] 定点照护分析装置可包括单次使用一次性药筒, 处理样品并操作分析的仪器, 及远离该仪器的服务器, 该测量和检测系统包括:

- [0833] • 一次性药筒含有:
- [0834] - 样品采集和量度方法 (比如样品吸头)
- [0835] • 仪器外壳含有:
- [0836] - 光成像传感器 (比如带有光源 (如闪光灯) 的手机相机和CCD图像采集装置)
- [0837] - 将该吸头移至该光成像传感器可获取图像的位置的机构
- [0838] • 无线 (或以其他方式) 上载该图像至远离该仪器的服务器
- [0839] • 图像解译软件, 具有以下功能:
- [0840] - 从该二维图像测量体积
- [0841] - 区分样品类型
- [0842] • 把该样品类型和/或体积数据作为操作算法的一部分, 以便:
- [0843] - 向系统用户提供有关样品完整性的提示
- [0844] - 提供任何需要的提示, 以提供额外或替换样品
- [0845] - 解译该仪器的信号数据以获得分析结果, 其中考虑样品类型和/或样品体积
- [0846] 该系统可选地可在“样品采集装置 (毛细管)”中包括额外的机制以便对用户采集的样品进行处理和/或成像, 其中包括:
- [0847] • 用于把毛细管容纳在确定位置并将该毛细管移至可采集图像的另一确定位置的机制
- [0848] • 用于把大体上全部样品推入在确定位置的该药筒的机制

[0849] 示例4: 对包含血样的毛细管的分析

[0850] 把毛细管的远端与血滴 (一般通过手指针刺获得) 接触, 由此采集样品。只要有足够的血液, 毛细管通常经过毛细作用被填满。在本发明的一个版本中, 用户把毛细管放在药筒上的锁合位置处, 然后把药筒插入仪器中的滑道里, 再按下仪器GUI上的屏幕按钮, 从而启动分析。所有后继分析步骤均为自动的。仪器移动位于其外壳中的药筒, 并关闭药筒被插入的门。在本发明的此版本中, 仪器移动部件抓住毛细管, 并将其移至配有闪光灯和CCD的数字相机前面的位置。通过闪光灯照射, 对毛细管成像, 并把图像无线发送至服务器, 而服务器则解译图像, 获得样品的类型、位置和数量。如果达到预定标准, 服务器命令仪器继续

分析。如果样品不合适,则毛细管被退回药筒,而药筒被退出,服务器使GUI显示合适的提示。随即,用户可(1)加入更多样品或(2)获取新样品并使用新毛细管。当用户通过GUI表明已采取纠正措施,且毛细管/药筒已被再次插入仪器,服务器命令仪器重新开始分析过程。适当样品体积的标准通常是,体积超过分析所要求的最低值。因此,例如在一些分析中可使用10uL的样品,则样品的测量体积>12uL时,一般认为有足够的样品。

[0851] 在本发明的第二个版本中,图像采集被用于测量仪器从原始样品获得的样品体积。该版本可单独实施,或与第一版本一起实施。在分析序列中,样品(1)被用户或者(2)被仪器从毛细管中推入药筒的样品孔中。随后,使用第二个吸头通过毛细作用或者(优选地)气动方法从样品孔中取出准确的体积。在此阶段,通过对吸头成像测量(如上所述)该分样的类型和分样体积。如果样品类型和体积可接受(目标 $\pm$ 5%),则继续分析。如果不可接受,则可放弃分析,同时提示用户采取补救措施。可被区分的样品类型有血液和血浆或血清和其他。通过观察血液(不透明)和吸头(透明)之间远大于血浆和血清之间的对比度,该成像系统作出此区分。如果未达到目标水平的样品体积仍然足够分析提供满意的结果(在上述示例中,如果目标体积是10uL,则大于5uL的体积为可接受)。计算分析物浓度的分析算法随即使用校正函数:浓度(真)=浓度(假设达到目标体积时观察到的浓度)\*目标体积/测量体积。

[0852] 可很容易地检测到血液,且通过创建吸头像素图,统计黑像素数并随即与已知目标体积的像素数比较,可测量其体积。尽管样品类型血清和血浆(及其他水性非血样)是透明的,该成像系统仍然能检测到样品是否存在,这是因为样品弯液面折射发生了变化,以及吸头材料和样品之间折射系数存在不同。或者,可在毛细管中涂上干染料层,它会被样品溶解,由此将染料加入样品。

[0853] 测量样品体积的其他方法包括确定各弯液面的顶部和底部位置,并运用简单的几何技术(如本文所述)。可通过上述方法识别并测量样品液体柱中的气泡,而且从样品所占总体积中扣除合适的体积。

[0854] 上述方法测量样品毛细管中或悬在毛细管末端(如本文所述)的样品。当样品被测量且被系统接受后,通过仪器中的移液/气动方法把样品退出。当这发生后,可对吸头再次成像,并测量所有残余样品。分析中实际使用的体积为总体积和残余体积之差。

[0855] POC分析系统中另一具体问题,尤其当其被未经技术训练的用户使用时,是存在于样品毛细管外的样品。

[0856] 可使用本发明对此成像和测量,且提示用户去除过量血液。

[0857] 分析装置中的样品采集和递送有效性取决于所采用的液体操作技术。自动装置可使用(1)气动抽吸和推出(如同使用一次性吸头的众多实验室单、多通道移液装置;气动方法可使用正压或负压(真空)),(2)正排量(如注射器)、喷墨式技术等。样品和试剂等其他液体可(3)通过毛细作用被吸出池外或(4)芯吸入多孔介质。液体(样品和/或试剂)可在与其他液体接触或不接触的情况下被退出。例如,如果样品需被稀释,可把样品吸头浸入稀释剂或置换入空气,以便滴入干孔或包含稀释剂的孔中。可使用本发明核实和/或测量所有上述系统和方法的性能。

[0858] 在其他实施例中,可由位于仪器外并配有外部相机的用户对该毛细管成像。体积测量可按毛细管尺寸进行。该设于外部的相机可被用于用户/病人识别,这样结果可被更可

靠地归于正确的病人。此方法还可被用于核实使用的是合适药物(对药片容器或药片成像,或者仪器中的条形码阅读器可被用于此目的)。

[0859] 本发明还可被用于测量被吸入分析吸头中的试剂位置和体积。在一些情况下,可向试剂中加入染料,以便更方便地对它们成像(提高对比度)。

[0860] 在血浆从血液分离的分析中,本发明可被用于核实红细胞去除的有效性,及血浆的可用体积。对移动含样品吸头的替代选择是移动相机

[0861] 该系统可具有下列优点:

[0862] 1. 样品的定量测量

[0863] 2. 识别样品类型的能力

[0864] 3. 对样品体积生成客观、定量的记录

[0865] 4. 当样品体积不正确时,使分析能给出结果

[0866] 5. 提高分析系统的可靠性

[0867] 示例5:吸头

[0868] 图18示出用于抽吸样品和试剂的吸头(所示尺寸单位是毫米)。

[0869] 示例6:圆柱形毛细管的几何测量

[0870] 图19示出含有样品的圆柱形毛细管尺寸。

[0871]  $R$  = 半径

[0872]  $L_1$  = 从圆柱体底端至低样品弯液面的距离

[0873]  $L_2$  = 从底端至样品低高弯液面的距离

[0874] 吸入体积 =  $\pi * (R^2) * (L_2 - L_1)$

[0875] 示例7:圆锥形毛细管的几何测量

[0876] 图20和图21示出圆锥体毛细管的尺寸。

[0877]  $R_b$  = 锥体底的半径

[0878]  $L$  = 长度

[0879]  $L_1$  = 从(投影)锥体顶至低样品弯液面的距离

[0880]  $L_2$  = 从(投影)锥体顶至低高弯液面的距离

[0881] 吸入体积 =  $\pi * (R_b/L)^2 * [(L_1)^3 - (L_2)^3] / 3$

[0882]  $\tan \theta = R_b/L$

[0883] 示例8:液体弯液面的影响

[0884] 众所周知,毛细管中的液体一般具有弯曲液面。取决于接触角度,该弯液面可相对于液体向内或向外弯曲。当没有施加净外部压力时,如果毛细管表面是亲水性的(接触角度  $< \pi/2$ ),弯液面向内;如果表面是疏水性的(接触角度  $> \pi/2$ ),弯液面向外。当对液体柱施加净外部压力时(毛细管竖直放置或由仪器施加气压),低弯液面可延伸低于毛细管的低端。对于小直径毛细管,相对于较小的重力,沿弯液面的表面张力很强。在竖直放置毛细管中,沿弯液面的表面张力压力为  $2\pi * R * \gamma * \cos \theta$ ,其中  $\gamma$  为表面张力,而  $\theta$  为接触角度。重力沿弯液面形成的压力为  $\rho g \Delta L / (\pi * R^2)$ ,其中  $\rho$  为液体密度,  $\Delta L$  为沿弯液面的距离,而  $g$  为重力常数。相应地,弯液面表面是球形。被弯液面占据的部分中的液体体积可按以下方法计算,并被用于获得对体积更精确的估计。

[0885] 从样品毛细管底部开始定义的距离



[0886] L1=至低弯液面底部的距离

[0887] L2=至低弯液面顶部的距离

[0888] L3=至高弯液面底部的距离

[0889] L4=至高弯液面顶部的距离

[0890] 球形帽的体积

[0891]  $\pi h (3a^2 + h^2) / 6$

[0892] 图22示出球形帽的尺寸。

[0893] 根据弯液面的数量和位置,会出现数种不同的情况。请注意,以下公式涉及内向和  
外向弯液面。

[0894] 情况1:高弯液面是弯曲的,而低液面是水平的(如图23所示)

[0895] 替代: $a=R, h=L_4-L_3$

[0896]  $L_3$ 和 $L_4$ 间的体积= $\pi * (L_4-L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4-L_3)^2) / 6$

[0897] 总体积= $\pi * ((R^2) * L_3 + (L_4-L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4-L_3)^2) / 6)$

[0898] 情况2:两个弯液面均位于毛细管内且是弯曲的(如图24所示)

[0899] 总体积= $\pi * ((R^2) * L_3 - (L_2-L_1) * (3 * (R)^2 + (L_2-L_1)^2) / 6 + (L_4-L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4-L_3)^2) / 6)$

[0900] 情况3:有两个弯液面。低弯液面是弯曲的且低于毛细管低端(如图25所示)

[0901] 总体积= $\pi * ((R^2) * L_3 + (L_1) * (3 * (R)^2 + (L_1)^2) / 6 + (L_4-L_3) * (3 * (R)^2 + (L_4-L_3)^2) / 6)$

[0902] 示例9:气泡

[0903] 液体样品或试剂中的气泡造成所测量液体体积不同程度的减少。在小毛细管中,  
当气泡小于毛细管横截面时,气泡是球形的。当它们较大时,它们占据圆柱形空间(在圆柱  
形毛细管中),并具有半球形末端。

[0904] 情况1:气泡大小不足以横跨毛细管的整个宽度(如图26所示)

[0905] 减去气泡体积= $(4/3) * \pi * r^3$

[0906] 情况2:气泡封闭毛细管的整个宽度(如图27所示)

[0907] 减去气泡体积= $4\pi * R^3 + \pi * R^2 * L$

[0908] 示例10:毛细管吸头外的血液

[0909] 情况1:悬挂在竖直毛细管外的血液或试剂会在分析中造成重大问题,因为它代表  
一种无法控制的情况。如图28所示,成像可很容易地识别这种情况。

[0910] 情况2:血液在毛细管外,但不是悬挂

[0911] 在毛细管外的残余血液也是有问题的,因为它是对试剂的潜在污染源,并具有额  
外的体积。同样,成像可识别这种情况。

[0912] 示例11:当样品被分配后,残留在毛细管内的血液

[0913] 可通过估计残余体积,并将其从总样品体积中扣除,即可解决这一问题。图29示出  
带有残余血液的毛细管的示例。

[0914] 残余体积= $\pi * R^2 * L$

[0915] 示例12:评估血样中的红细胞分离

[0916] 很多分析中,需要从样品中去除红细胞,以便获得血浆。当这被完成时,需要(尤其  
是对POC装置)了解该分离是否有效,并确定是否有足够的血浆用于分析。

[0917] 图30至图39示出适用于本发明POC装置的红细胞去除的一个优选实施例。在将接

受血样的孔中,提供具有红细胞抗体与红细胞自由抗体混合的可磁化微粒的干燥制剂,如图30所示。当血样被加入孔中(如图31所示)并与磁性试剂混合(如图32、图33和图34所示),红细胞与该磁性微粒凝集,当把该含血样孔置于靠近强磁铁的位置时,能去除红细胞(如图35所示)。通过适当地把该孔相对于磁铁移动,即可把红细胞从血浆中分离(如图36所示),血浆随后可被推入接受孔中以用于分析(如图37、图38和图39所示)。很明显,成像分析可确定分离执行的有效程度如何,并可估计可用于分析的血浆体积。

[0918] 示例13:毛细管中液体样品的图像

[0919] 图40示出含有低吸收率液体的圆柱形吸头的高对比度图像。

[0920] 图41示出含有高吸收率液体的圆锥形吸头的图像。

[0921] 图42示出含有高吸收率液体的吸头并显示位于吸头内的两个弯液面。

[0922] 图43示出含有样品液体的吸头及横跨吸头直径的大气泡。

[0923] 图44示出含有水的吸头,该水显示在透明吸头或毛细管中有清楚的上弯液面。

[0924] 分析图41以获得液体柱的长度(对应于5uL)和上弯液面的分辨率(确定弯液面位置,置信度>90%)。弯液面位置精确度对应于<1%的液体柱长度。

[0925]

尺寸	像素宽度
长度	276
弯液面分辨率	2
精确度	0.7%

[0926] 示例14:样品体积不足对分析结果的影响

[0927] 该系统被用于测量血液中的蛋白-C。当合适地使用样品转移装置时,被插入系统的样品体积设计为20uL。仪器被设置为使用该样品中的10uL血液。系统计算的分析物浓度如图45所示,其中样品体积被故意减少到低于目标水平。结果大体上保持恒定,直到样品体积低于所要求的体积。

[0928] 示例15:样品转移装置

[0929] 图46示出样品转移装置示例。该装置包括(a)(玻璃或塑料制)毛细管,其可选地被覆有抗凝剂或适合于分析前样品处理的其它试剂,(b)包容毛细管的外壳,该毛细管配有(c)能在外壳中滑动的柱塞(活塞),其具有在外壳内的一个槽中滑动的突起特征,(d)外壳内的一个槽,其与该活塞特征配合,并限制活塞的轴向运动,这样当样品被置换后,其运动即停止,和(e)通常处于开状态的外壳排气口,当活塞被启动(朝装置远端移动)时,它即被关闭以便置换毛细管中的任何液体。

[0930] 图47示出样品转移装置,其毛细管中含有样品。“添加”位置被标注出。

[0931] 图48示出用活塞推出样品后的样品转移装置。

[0932] 图49示出样品被不完全推出后的样品转移装置。

[0933] 示例16:通过图像分析进行的体积测量

[0934] 通过移液装置,已知体积的液体样品被吸入样品吸头中。使用商业平板式扫描仪(De11)采集吸头图像,并测量(a)从吸头远端至弯液面和(b)从吸头远端至下图中标记的特征之间的距离。吸头定位和其相对于扫描仪压盘的位置未加控制,因为图像是通过测量距离(a)与距离(b)的比率作为样品体积的量度而加以分析的。使用商业成像软件(Jasc)测量吸头、弯液面和特征的位置。在位置被记录前,使用该软件把图像水平放置,该图像可按照

软件提供的比例被直接读取。图50示出示范图像。

[0935] 距离L1是吸头位置。

[0936] 距离L2是弯液面位置。

[0937] 距离L3是图50中所示箭头的位置。

[0938]	体积	按任意单位计的距离					比率	计算体积
	uL	L1	L2	L3	$\Delta L2-1$	$\Delta L3-1$		uL
	10.0	120	374	590	254.00	470	0.540426	9.7
	12.5	112	400	584	288.00	472	0.610169	12.9
	15.0	156	470	636	314.00	480	0.654167	15.2
	17.5	171	505	654	334.00	483	0.691511	17.3
	20.0	114	469	596	355.00	482	0.736515	20.0
	25.0	214	600	694	386.00	480	0.804167	24.5
	30.0	165	585	640	420.00	475	0.884211	30.3

[0939] 如图51所示,体积与距离比率简单相关,并可被计算。体积估计值平均位于实际体积的不到2%范围内。

[0940] 示例17:在吸头中被离心的血液图像

[0941] 通过测量压实红细胞柱与总液体柱(吸头至弯液面)的长度比,可根据数字图像确定红细胞比容。这可通过特征识别软件把吸头定位至已知方向,然后对特征之间的像素进行计数,从而很容易地完成。对于上述吸头,与数百个像素对应的距离可实现精确测量。

[0942] 图10示出空的戴帽样品吸头。

[0943] 图11示出容纳有血液样品的戴帽样品吸头。

[0944] 图12示出容纳有离心后含约23%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0945] 图13示出容纳有离心后含约31%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0946] 图14示出容纳有离心后含约40%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0947] 图15示出容纳有离心后含约52%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0948] 图16示出容纳有离心后含68%红细胞比容血液的样品的戴帽样品吸头。

[0949] 图17比较对离心样品采用数字成像系统测量的红细胞比容(“红细胞比容,%报告值”)和用标准技术测量的红细胞比容(“红细胞比容,%目标值”)。红细胞比容测量的标准技术示例可包括在玻璃毛细管中通过标准实验室离心分离机,并测量压实红细胞柱长度及样品所占毛细管的总长,从而完成的微量红细胞测量。

[0950] 示例18:包括血液分离部件的系统

[0951] 设计用于血液分离的系统可包括以下特征:

[0952] 1.吸头形状设计。

[0953] a.高宽比为约20:1(长:直径),为样品、压实细胞和血浆体积的测量提供方便的长度。

[0954] b.成型吸头可用乙烯盖实现密实密封,并在需要时,很容易地移除该帽。

[0955] c.吸头主要部分具有略微斜度的锥形,而吸头上部为更宽的锥形,这可理想地插入血浆回收构件。请注意,“反径向”的设计(远离旋转轴线的吸头端较窄)是独特的。

[0956] d.更宽的吸头上部锥形被配置为可被容纳在自动移液和x-y-z方向移动的台上。这有助于形成液体密封的连接及在需要时进行方便拆除。

[0957] 2.使用非常精确和准确的x-y-z方向台移动血浆回收吸头。

[0958] 3.使用自动成像技术控制离心和血浆回收操作。血浆回收吸头的移动在压实细胞-血浆界面不到1毫米的范围内。

[0959] 示例19:使用液体体积图像测量以提高分析校准

[0960] 自动移液装置通常准确并精确到(比如)5-50uL范围的约5%或更好。在很多分析中,体积准确度和精确度都必须非常好(比如<2%)才能获得分析物测量所要求的精确度和准确度。对(1)体积小于5uL的液体(当要求最大化使用小体积样品时非常需要)和(2)具有“问题”物理特性的液体(比如粘性溶液、含有洗涤剂的溶液等)进行量度和递送时,经常出现较差的精确度和准确度,由此危害到分析结果的准确度。对这些问题的一个创新解决方案是,通过对液体进行图像分析,测量液体体积(样品、稀释剂、试剂、校准物和对照样),然后校正分析校准函数以考虑所需体积的偏差(最高达[比如]20%)。我们已经证明,在具有非常精确尺寸的移液吸头中,小至5uL的体积可以非常好的准确度和精确度(<2%)被测量。下面,我们记录(1)体积测量准确度和精确度和(2)通过分析所用溶液体积(样品、试剂等)与分析响应之间的已知关系校正分析校准。

[0961] (1)通过图像分析进行的体积测量准确度:

[0962] 在下表中,已知体积的溴酚蓝溶液被吸入锥形吸头中。

[0963] 溶液被置于吸头的中间部分,并由扫描仪成像。通过标准方法确定吸头定位和位置。通过算法及测量的液体柱长度调整吸头定位。使用吸头的已知内部尺寸对液体柱进行计算。对四个吸头中的四部分进行四次重复成像。因此,下面提供的误差反应了图像可再现性及吸头尺寸的准确度和精确度。

[0964]	目标体积	测量体积	总误差
	uL	uL	%
	5	5.01	1.39
	20	19.98	1.80

[0965] 请注意,体积测量并不依赖于对吸头中液体的精确定位。图像分析提供有关吸头中液体的位置信息。了解吸头尺寸后,总能根据液体所占据的吸头部分(不论处于什么位置),计算体积。

[0966] (2)通过并入液体体积测量,对分析校准进行的校正

[0967] 这通过以下所示的模拟实现。考虑其中样品与两种试剂(被称为1和2)组合的分析。样品、试剂1和试剂2的目标体积是10uL。根据把测量信号与分析物浓度相关联的标准曲线,计算分析结果。作为分析校准过程的一部分,在实验中,样品和试剂所用体积除了10uL外,还被改成8和12uL,而分析结果根据适合于10uL体积的校准进行计算。在图105、图106和图107中,结果相对于实际体积绘制。对于样品体积,分析结果大体上与所用体积成直接比例关系(如图105所示)。对于试剂,可看到有点非直线的响应(如图106和图107所示)。这些响应是基于本领域中熟知的“典型”分析,且体积改变的大小具有代表性。

[0968] 我们随后模拟了评估,其中除了使用不适当体积的影响外,我们在分析结果上加了一些随机误差(约5%以便反映“真实世界的情况”)。我们包括了样品、试剂1和试剂2体积被设为8、10和12uL的各种组合的结果。当绘制这一运算的结果而不为体积误差进行校正时,如图108所示,如所预期的那样,在所报告结果中出现重大误差,这是因为忽视了这样的

事实,即所用的实际体积不同于用于分析校准的体积。

[0969] 当我们使用对体积的已知分析响应考虑偏离目标值的体积偏差,并绘制我们获得的校正分析物值后,结果获得极大改善,如图109所示。这是通过对数据进行多次回归分析实现的。

[0970] 使用及不使用体积校正的统计比较结果概述列于下表中,并反应了通过使用体积校正,所有度量都取得的重大改善。SEE指估计的标准误差。

[0971]	体积校正	回归坡度	相关系数	分析物CV	SEE/均值
			$R^2$	%	%
	No correction	0.994	0.914	13.3	16.5
	Correction	0.999	0.994	3.6	7.4

[0972] 示例20:使用显微镜和图像分析进行红血球凝聚抑制分析读数

[0973] 在磷酸盐缓冲盐水(100uL)中,含有0.3%w/v经戊二醛稳定的火鸡红细胞和0.5mg/mL牛血清白蛋白,按照说明,2个红血球凝聚单位的灭活流感病毒和15ug羊多克隆抗B型流感抗体在锥形底的PCR管中,在室温下培养15分钟。该管底部的分析产物被转移到用白光照射的透明滑片上,并使用数字相机在4倍放大的情况下成像。如图131所示,很容易通过与未凝聚对照样(图131,样品1)比较,观察到红细胞与病毒红血球凝聚素反应(图131,样品3)造成的凝聚。当也存在有过量病毒抗体时,凝聚被完全抑制。凝聚反应的两种影响很明显:(1)由于凝聚体比对照样更快的沉淀,在凝聚样品中有着更多的红细胞,(2)平均而言,红细胞与其他红细胞形成更多的群。当图像识别软件识别、定位和计数红细胞和凝聚体后,可对凝聚反应进行量化。

[0974] 图131,样品1示出未凝聚对照样(无病毒,无抗体)。图131,样品2示出未凝聚样品(病毒和抗体)。图131,样品3示出凝聚(病毒,无抗体)。

[0975] 示例21:样品准备、上清液质量检查和LDL沉淀物治疗估计

[0976] 血浆在硫酸葡聚糖(25mg/dL)和硫酸镁(100mM)混合物中被稀释(1:10),随后被培养1分钟以沉淀LDL-胆固醇。反应产物被吸入离心分离机的离心管中,然后盖好盖子,在3000rpm下旋转3分钟。在离心前对原反应混合物成像(显示白色沉淀物),离心后成像(显示透明上清液)并对LDL-胆固醇沉淀物(在移开盖子后)成像。例如,图132、134示出对反应产物所成图像的示例。

[0977] LDL沉淀反应产物的图像分析如下。像素颜色水平作为其垂直位置的函数绘图。测量这些值的方差,且对三色的值求和。因为所沉淀LDL的微粒强烈地散射光,该沉淀物值(1154)比透明上清液的(672)要高得多。通过比较上清液值和未暴露于沉淀试剂的对照样,可评估离心质量(未图示数据)。图133提供了在离心分离机中旋转之前和在离心分离机中旋转之后,被分析的图像示例。

[0978] 在去除黑色乙烯盖后,对LDL沉淀物成像。在了解吸头几何形状及图像中像素大小的情况下,可非常准确地测量其体积。在这个实验中,估计沉淀物体积为0.155+/-0.015uL。

[0979] 示例22:通过空白样品光学信号的3色图像,改善丙氨酸转氨酶(ALT)分析性能

[0980] 可通过其中酶将丙氨酸转化为丙酮酸盐,随后通过氧气和丙酮酸氧化酶用丙酮酸盐制造过氧化氢的分析来测量血清中的ALT。然后,此过氧化物被辣根过氧化物酶、氨基安替比林和N-乙基-N-(3-磺丙基)苯胺用于制造有色产物。该有色产物在560nm吸收最高。

[0981] 发现有些血清样品在此波长具有很高的吸收率,如图135所示,相应地干涉分析。尤其当使用较高样品浓度(如分析中的最终稀释为1:10)时,临床样品的ALT3色图像分析结果较差。

[0982] 图135示出数个血清样品的光谱,这些样品在缓冲液中按1:10稀释;OD相对于波长(nm)绘图。图135中显示巨大的OD变化。

[0983] 在传统光谱学中,不在样品中加入分析试剂,对样品进行空白读数,然后从分析生成的信号中扣除该空白样,由此解决这一问题。在本发明的3色图像分析中,发现可使用类似方法。可对稀释过的样品成像,然后提取3色值。随后,可改变分析校准算法以包括该未反应样品的信号。对此例具体而言,原算法(未包括样品空白信号)为 $ALT浓度 = a + b * R + c * G + d * B + e * R^2$ ,其中a、b、c、d、e是经验常数,而R、G、B分别是红、绿、蓝通道的信号值。经改善的算法为: $ALT浓度 = a + b * R + c * G + d * B + e * R_s + f * R_s^2$ ,其中 $R_s$ 是红色通道中空白样品的信号(请注意,经验常数a、b、c、d、e不同于原算法中的值)。

[0984] ALT活性在0至250U/L范围内的21个血清样品经三次平行测量,其3色图像分析结果与使用临床实验室方法(Teco)获得的结果比较,由此获得下列回归统计数据,表明结果得到极大改善。

[0985]	校准方法	$R^2$	坡度	截距 (U/L)	SEE
	原始	0.922	0.922	4.5	18.9
	改进	0.972	0.972	1.6	10.0

[0986] 示例23:加快并对抗流感抗体红血球凝聚分析进行客观分析

[0987] 按示例20所述制备的反应混合物仅培养1分钟,然后放入三个不同的微通道(如以上血细胞计数示例中所述),并被成像。对每个样品取约5-10个图像,以便获得充足的统计数据。平均而言,各图像由约800-900个细胞组成。通过使用函数选择有代表性的单个细胞,并测量围绕该细胞的径向细胞分布,可客观地评估凝聚过程。

[0988] 处理图像以获得该单个细胞在2维空间中的几何中心位置。这些2维位置被用于计算径向分布函数(RDF),又称为偶关联函数。径向分布函数 $g(r)$ 量化在离开选择细胞某一距离处,发现细胞的概率。数学上, $g(r) = \rho(r) / \rho_0$ 。其中 $\rho(r) 2\pi r dr$ 是在离开特定细胞r距离处发现的细胞数量,而 $\rho_0$ 是在整个图像窗口中的平均细胞密度。该 $g(r)$ 值计算作为该图像及多个图像中所有微粒的平均值,以确保获得具有统计意义的结果。

[0989] 结果

[0990] 第一个 $g(r)$ 峰值量化样品中成对细胞的数量。因此,凝聚样品的该 $g(r)$ 值应比其他两个样品高出特定数量级。 $g$ 值在约20个像素的距离上从0很快地上升到最大值(对应于约12 $\mu m$ ,即大约两倍于红细胞直径),然后下降至约1.0。如下所示,可以把病毒造成的凝聚与无病毒或抗体抑制该病毒造成的凝聚从而没有凝聚的情况区别开来。

[0991]	病毒	抗体	凝集	$g$ 最大
	无	无	否	1.44
	有	无	是	1.67
	有	有	否	1.47

[0992] 示例24:使用适配体准备分析物检测系统

[0993] 两个寡聚DNA适配体被设计用于选择性地捕捉蛋白质(凝血酶和胰岛素)。该寡

聚DNA适配体由具有选自公布数据的序列的结合位点、把结合位点从微球或微阵列表面延伸的插入部分,和把适配体化学固定到表面上的反应基团组成。适配体1(特异于凝血酵素)具有以下序列:5'-Am-(T)<sub>45</sub>GGTTGGTGTGGTTGG-3'。适配体2(特异于胰岛素)具有以下序列:5'-Am-(T)<sub>32</sub>ACAGGGGTGTGGGGACAGGGGTGTGGGG-3'。各序列开始的“Am”代表氨基。

[0994] 这两个适配体被固定在经羧基功能化的聚苯乙烯微球(5um)上。然后清洗微球,去除过量试剂。随后,微球与荧光标记且与适配体结合位点互补的寡聚DNA探针混合。通过荧光发射检测探针与适配体的杂交。根据平均荧光发射,只有互补探针才显示阳性杂交事件。通过比较图139和图140,可看出杂交特异性,图139显示与互补探针杂交后的微球,而图140显示与非互补探针杂交后的微球。当微球沉淀至分析基质上后,在635nm激光激发,CCD相机在650nm(±10nm)过滤其发射,由此进行检测。相似程序也被运用在被覆环氧基硅烷以固定适配体1和2的玻璃表面上。阵列与荧光探针杂交,CCD相机装备和阵列扫描仪(Inopsys)通过荧光发射检测来检测适配体结合位点的特异识别。图141示出阵列上的适配体的结合特异性,更多细节在图142中显示。图143示出示范性阵列扫描。

#### [0995] 示例25:使用适配体检测分析物

[0996] 按示例24所述,制备包括与荧光标记的互补探针杂交的适配体1的阵列。浓度为大约100nM的凝血酵素被引入阵列,并与该适配体1-探针复合体反应。阵列上适配体1发出的荧光发射信号被减弱2.5倍,表明适配体1与凝血酵素的结合置换了探针。

#### [0997] 示例26:结合子

[0998] 两种类型的结合子被生物素化,并被用于在被覆有亲和素的阵列单元固相上生成捕捉表面。使用(1)适配体和(2)微量滴定板上的单链Fv抗体片段(SCFV)获取分析试剂生产和冷光读数分析结果。作为用于基于冷光的分析的结合子的适配体和SCFV适用于本文所述吸头和成像系统和装置。信号生成试剂从碱性磷酸酶改成比如带发色基质的辣根过氧化物酶,或使用带发色基质的碱性磷酸酶,使用相机测量颜色,由此可测定并读出分析物。微量滴定板(或其他形式)中的吸头可以任何药筒(分析单元)形式被读出。

#### [0999] 示例27:使用DNA适配体在微量滴定板上分析维生素D

[1000] 在此示例中,使用单股DNA适配体进行维生素D的分析。被生物素化的DNA适配体被涂布在具有多个孔的微量滴定板被覆有超亲和素的聚苯乙烯表面。在涂布前,通过在约95摄氏度加热快速地变性并复性适配体,然后立刻在冰上冷却。随后,约15微升含NaCl、MgCl<sub>2</sub>、10%乙醇,pH 7.5,并在25mM Tris中的经折叠生物素化维生素D的DNA适配体被加入各孔中,以形成捕捉表面。在涂布后,用约100uL阻断试剂清洗并阻断各孔,以减少非特异性结合。

[1001] 此分析的分析物(维生素D)在Tris、NaCl、MgCl<sub>2</sub>、10%乙醇,pH 7.5中稀释,并与维生素D-碱性磷酸酶共轭溶液在所需分析范围内的不同浓度混合,然后送至分析单元进行10分钟室温培养。随后,用100uL清洗缓冲液清洗三次该分析单元。向各分析孔中加入约40uL碱性磷酸酶的基质,约10分钟后采集化学发光数据(如下表所列)。图144示出化学发光与维生素D浓度(ng/ml)曲线。

[1002]

维生素D(ng/ml)	0	1	100	200
化学发光(RLU)	155674.1	113824.3	49346.13	33824.27
	159471	110794.2	49699.04	35794.18

	162650.3	101655.7	53158.25	36655.66
	159920.8	99266.41	50195.63	35166.41
平均值	159429.1	106385.1	50599.76	35360.13
cv%	1.80	6.60	3.44	3.37
B/BO	100%	67%	32%	22%

[1003] 示例28:微量滴定板上的雌二醇分析

[1004] 在此示例中,使用单链可变区片段(scfv)对甾类激素(雌二醇)进行分析。在此分析中,分析单元的内表面涂布有生物素化scfv,其位于具有多个孔的微量滴定板被覆有超亲和素的聚苯乙烯表面上。向各分析单元中加入约15微升1 $\mu$ g/ml生物素化scfv的Tris缓冲盐水,pH 8,0.03%BSA,0.05%硫柳汞。经清洗后,各分析单元用100 $\mu$ L固定试剂固定,随后在干燥空气中过夜干燥,并保持干燥储存。

[1005] 在Tris缓冲盐水,pH 8,BSA,硫柳汞中稀释此分析的分析物(自由雌二醇),并与雌二醇-碱性磷酸酶共轭溶液在Biostab提供的稳定剂中混合,然后送至被覆有scfv的分析单元中在室温下约10分钟。

[1006] 随后用100 $\mu$ L清洗缓冲液清洗5次该分析孔。在清洗后,向各分析单元中加入40 $\mu$ L碱性磷酸酶的发荧光基质(KPL PhosphaGlo),约10分钟后采集化学发光数据(如下表所列)。图145示出化学发光与雌二醇浓度(pg/ml)曲线。

[1007]	雌二醇(pg/ml)	0	20	200	2000
	化学发光(RLU)	5505.454	1997.885	493.864	389.863
		5505.454	2005.112	496.932	374.317
		5659.613	1739.771	503.25	417.021
	平均值	5557	1914	498	394
	%cv	1.6	7.9	1.0	5.5
	b/bo	100%	34%	9%	7%

[1008] 示例29:白细胞计数和差异分析

[1009] 人类对象外周血中白细胞(WBC)浓度在约1000个/ $\mu$ L至100000个/ $\mu$ L的范围内。但是在一些情况下,成像系统的范围更有局限性,比如从约4000个/ $\mu$ L至7000个/ $\mu$ L。如果细胞浓度低于4000个/ $\mu$ L,系统将无法数到分析可能要求的10000个细胞的目标值。如果样品中的细胞浓度超过7000个/ $\mu$ L,各视野可能过于拥挤,无法进行准确的图像分割和细胞计数。用于WBC成像的示范性方法如下。

[1010] 在一个示例中,所提供的成像系统(如血细胞计数器)被配置用于荧光分光光度技术。该系统使用荧光分光光度技术测量样品中的细胞浓度。样品经用于成像的荧光共轭抗体(如AF647-CD45)和荧光核酸标记物(如DRAQ5)标记。分光光度仪模块上的定量荧光读数提供了低灵敏度(约5000个/ $\mu$ L的LL0Q)但是高动态范围(如5000-100,000个/ $\mu$ L)的WBC浓度测量。分光光度仪上的浓度测量可实现计算最佳稀释率,这样细胞悬浮液的最终浓度在4000-7000个/ $\mu$ L之间。

[1011] 图146示出WBC浓度分光光度测量中的高荧光动态范围。带有荧光标记抗CD45和其他抗体标签的WBC被波长为约640nm的红光激发,而且其定量的荧光发射光谱被采集。集成后的荧光被绘制在y轴上。



## [1012] 示例30:等温扩增检测A型链球菌

[1013] 可通过浊度检测特定基因组样品的等温扩增。在此示例中,从A型链球菌 (StrepA) 细胞 (My biosource提供的母液浓度=2x10<sup>8</sup>org/ml) 中提取的基因组样品经等温扩增,且通过浊度测量反应进展。约5uL母液细菌细胞和45uL RT PCR级水 (母液的10X稀释) 在约95摄氏度下热处理约8至10分钟 (细胞破裂并释放DNA)。该基因组样品经稀释,并以约25uL的样品体积被引入含有扩增试剂 (如DNA聚合酶、引物、缓冲液) 的PCR管中。该PCR管在约61摄氏度下培养约60分钟,同时通过浊度记录反应进展。结果如下,图147示出浊度作为时间的函数的图象:

	浓度 (份/uL)	T(分钟)	标准偏差(分钟)
[1014]	800	24.0	1.6
	80	28.3	2.9

[1015]	0	n/a	n/a
--------	---	-----	-----

[1016] 在800份/uL和80份/uL进行三次不同的实验。实验A中使用了具有合成基因组DNA模板 (Genescript提供) 的StrepA。实验B中,稀释StrepA 10倍,随后在95摄氏度下加热灭活约8至10分钟,然后对经加热灭活、10倍稀释的母液StrepA进行一系列稀释。实验C中使用了具有可变浓度的母液StrepA (经灭活的细菌细胞),随后在95摄氏度下加热灭活约10分钟。各实验的拐点如图148所示。对各800份/uL和80份/uL,三个图的归类为,实验A在左,实验B在中间,而实验C在右。下表中提供了平均拐点。

[1017]		实验 A		实验 B		实验 C	
		平均值	STDEV	平均值	STDEV	平均值	STDEV
	800 cp/uL	23.1	0.6	24	1.6	21.1	0.4
	80 cp/uL	27	1.4	28.3	2.9	27.2	1.8

## [1018] 示例31:磁性微球的使用

[1019] 在此示例中,磁性微球被用于通过ELISA分析蛋白和小分子。图110示出酶联免疫吸附测定法的一种示范性方法。该分析包括两种蛋白质,蛋白质1和蛋白质2。蛋白质1有约150倍的样品稀释 (吸头程序=30倍稀释),约0.007uL的样品体积,约1uL的稀释样品体积,约3uL的反应体积,和约10分钟的反应时间 (样品培养和基质培养)。蛋白质1的结果列在下表中。蛋白质1的测试2结果如图149所示。

浓度 (ng/mL)	测试 1	测试 2	测试 3	校准 1	校准 2	校准 3	回收 1	回收 2	回收 3	% CV
40	59316	46862	57396	40	40	40	99	99	99	0.3
20	25120	25225	25099	21	20	20	104	102	102	1.2
10	10551	11360	11463	9	10	10	92	96	97	2.6
5	5940	5607	5825	5	5	5	106	102	102	2.2
2.5	2476	2588	2497	2.5	2.5	2.5	99	99	100	0.3
0	190	166	166							

[1021] 蛋白质2有约667倍的样品稀释,约0.0015uL的样品体积,约1uL的稀释样品体积,约3uL的反应体积,和约10分钟的反应时间 (样品培养和基质培养)。蛋白质2的结果列在下

表中。蛋白质2的测试1结果如图150所示。

[1022]	浓度 (ng/ml)	测试 1	测试 2	校准 1	校准 2	回收 1	回收 2	% CV
	200000	322161	381202	203030	172490	102	86	12
	100000	232455	310876	107910	117056	108	117	6
	50000	133290	192460	43286	52415	87	105	13
	25000	89282	101643	24919	21908	100	88	9
	12500	49856	59574	12576	12041	101	96	3
	4000	15926	18350	4117	4059	103	101	1
	1000	4547	4722	1140	1124	114	112	1
	200	1238	1229	163	172	82	86	4
	20	504	458	22	21	109	106	2
	0	302	292					

[1023] 从上文描述中应理解,尽管具体实施已被图示和描述,但仍可对其作出各种修改。说明书中提供的具体示例也不旨在限制本发明。尽管通过参考以上描述说明本发明,本文中优选实施例的描述和附图不得以限制性方式加以解释。

[1024] 还应理解,本发明的所有方面不受本文中依赖于各种条件和变量的具体描述、配置或相对比例的限制。本发明实施例的形式和细节的各种变化对本领域中技术人员是显而易见的。因此,任何此类修改、变化及等价物均应落入本发明的保护范围内。

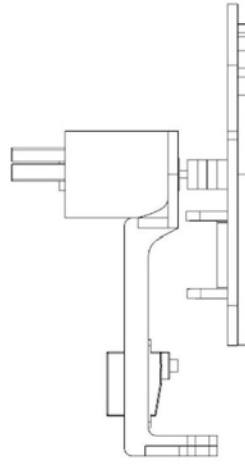


图1

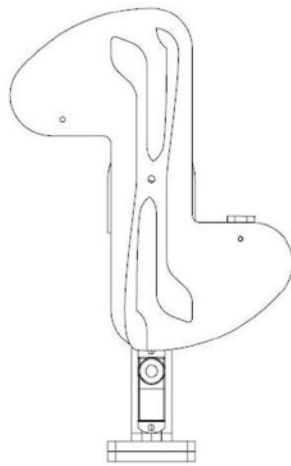


图2

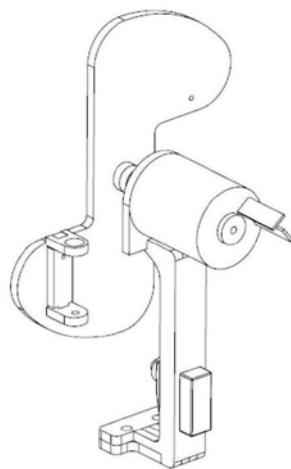


图3

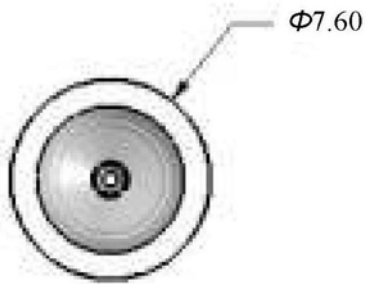


图4



图5



剖面 E-E

图6

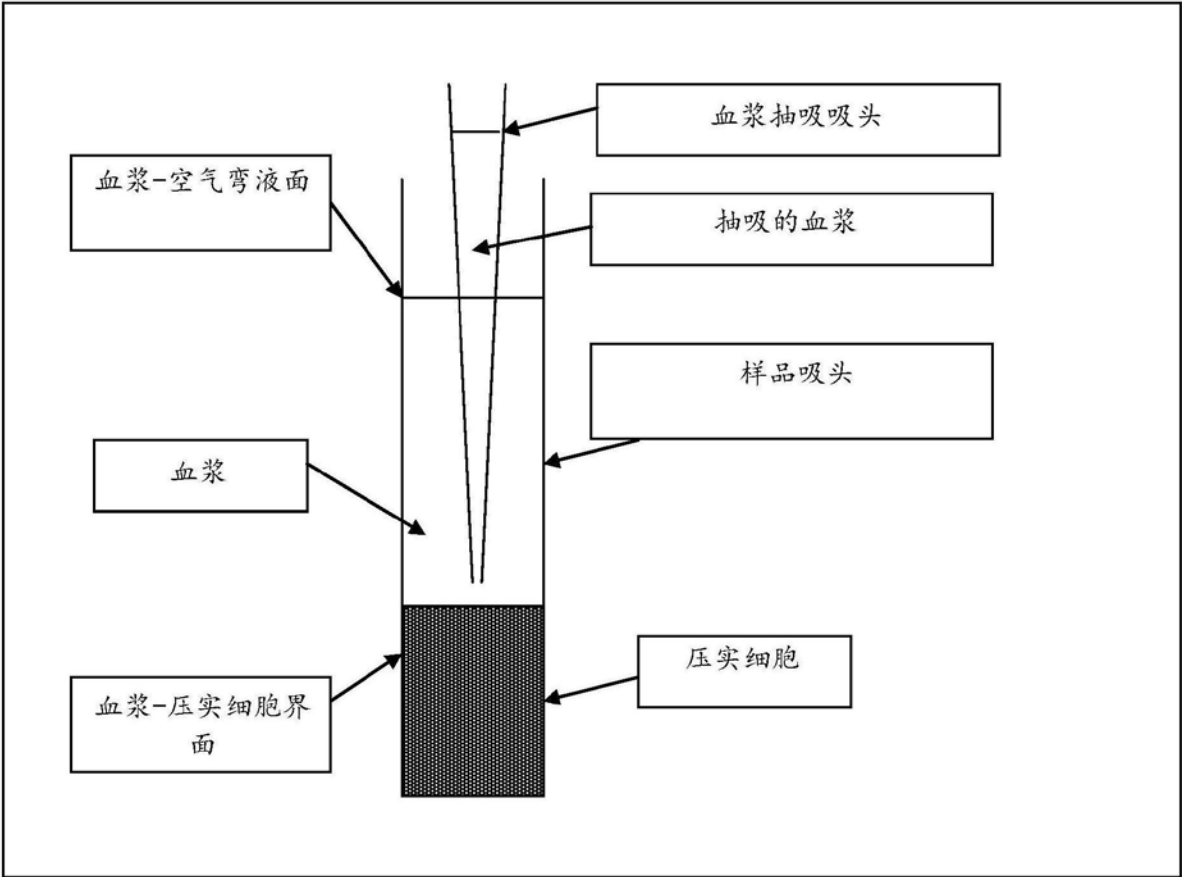


图7

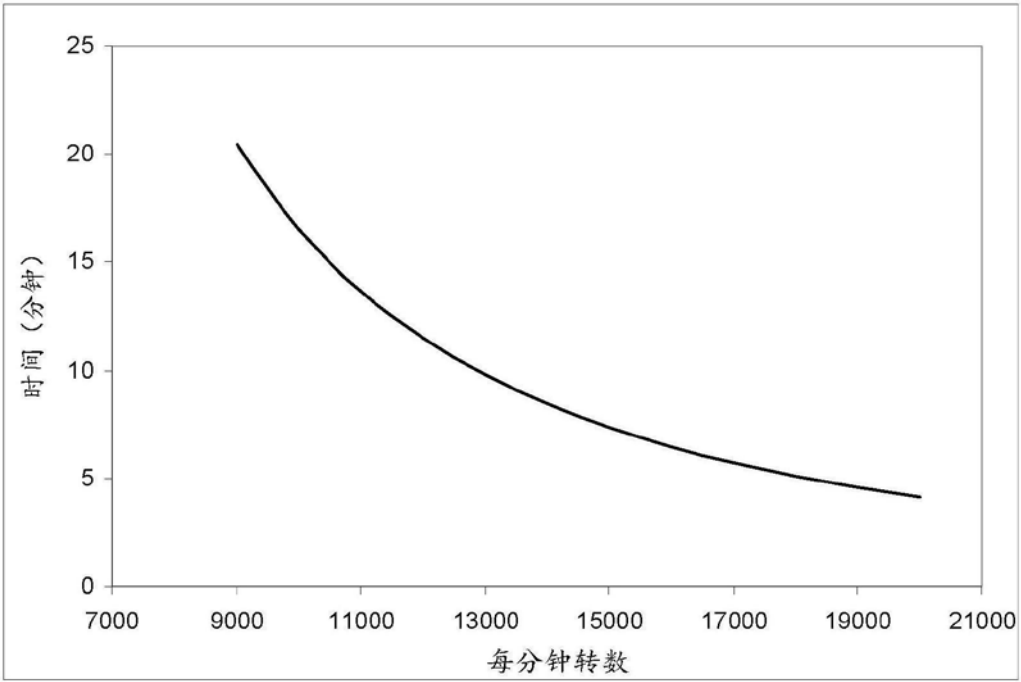


图8

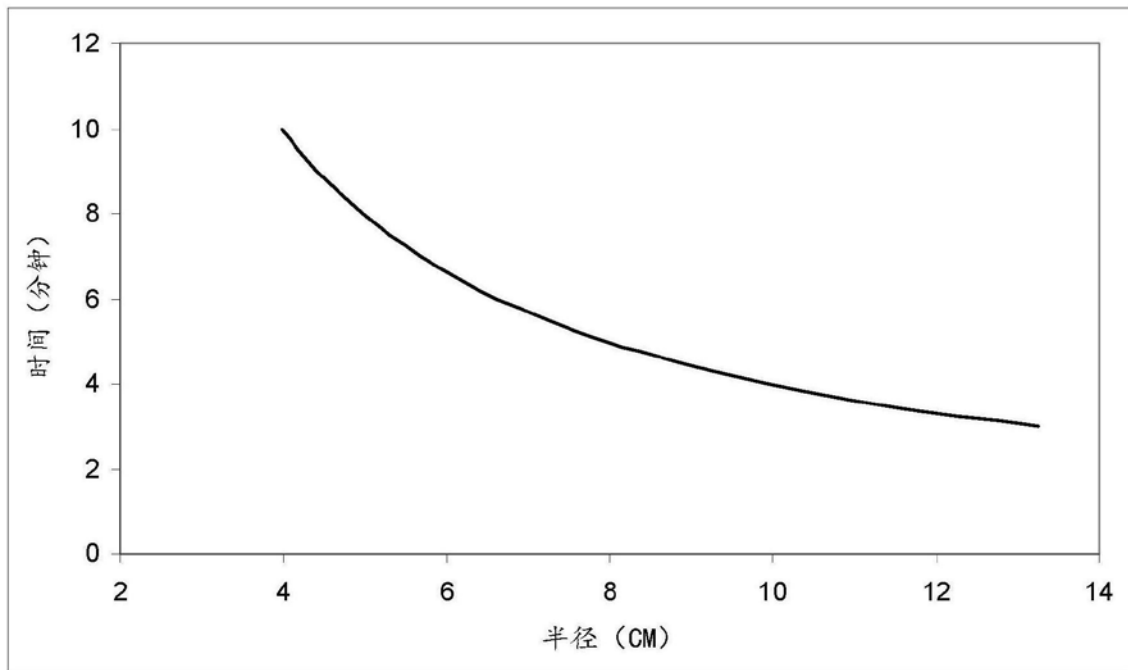


图9

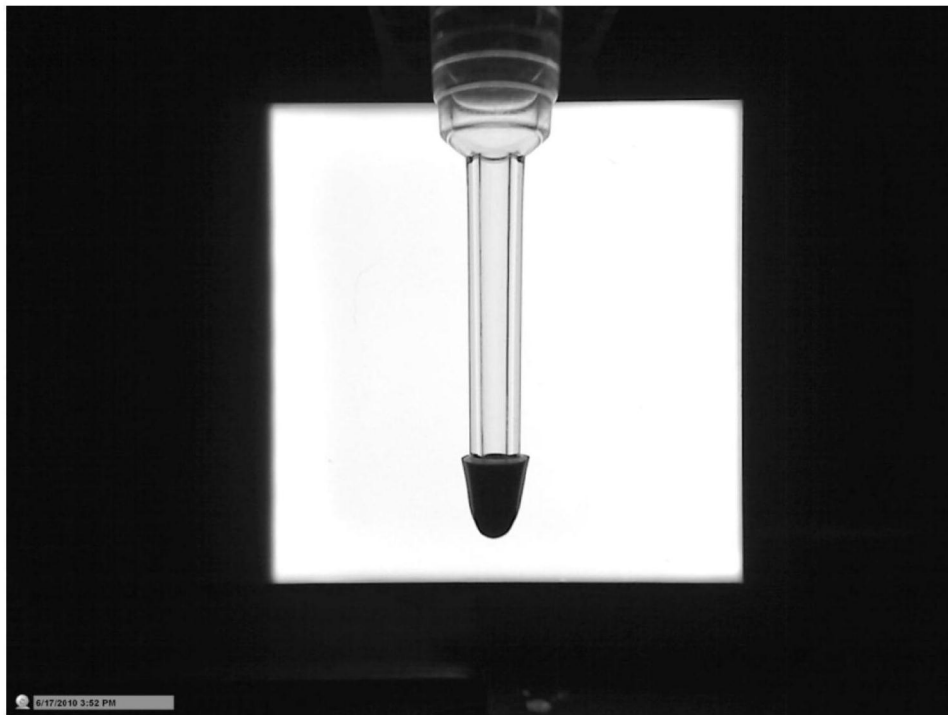


图10

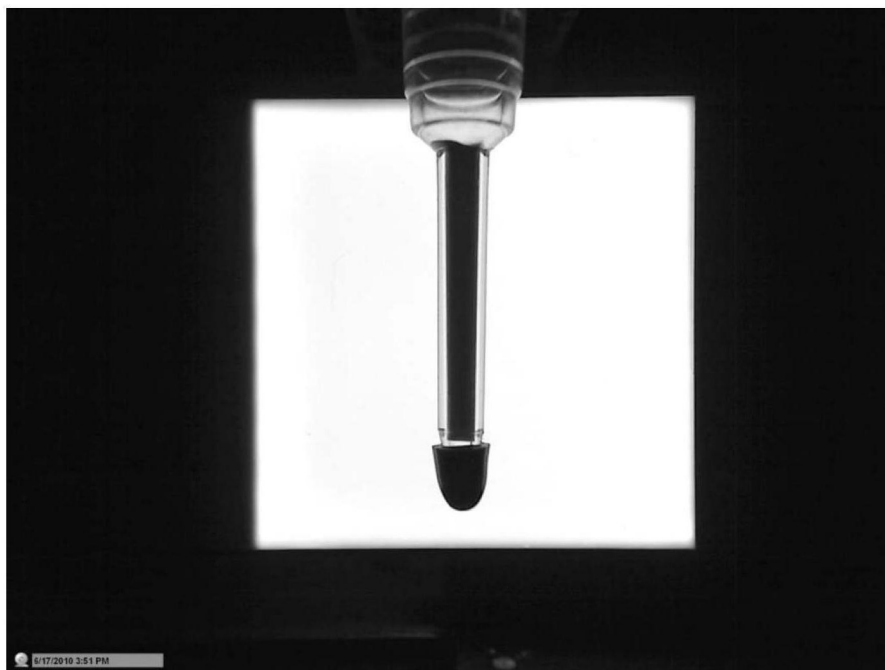


图11

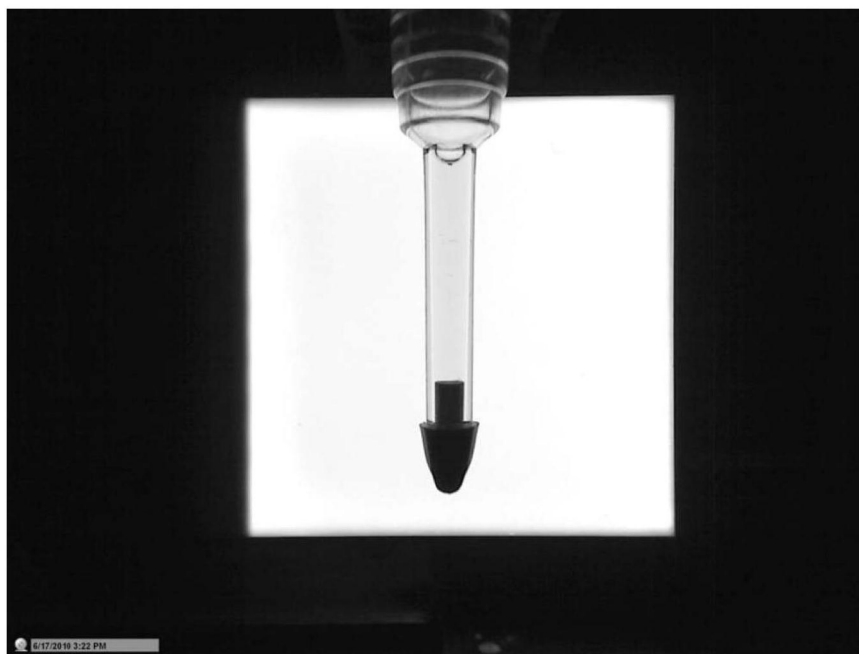


图12

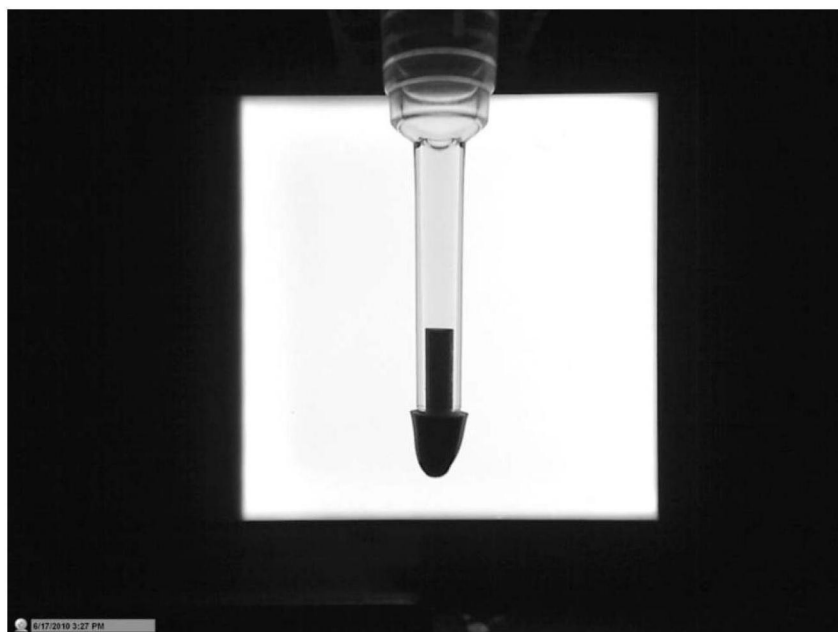


图13

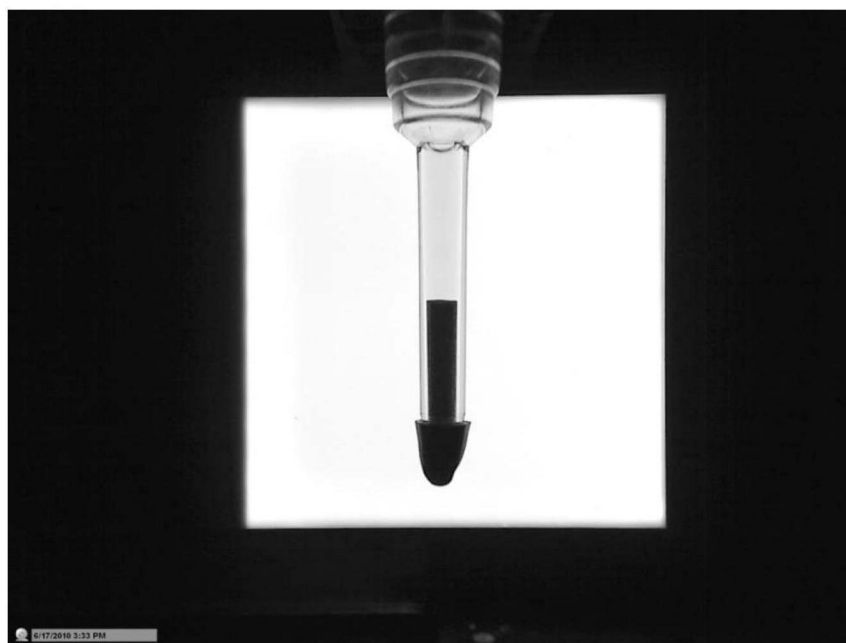


图14



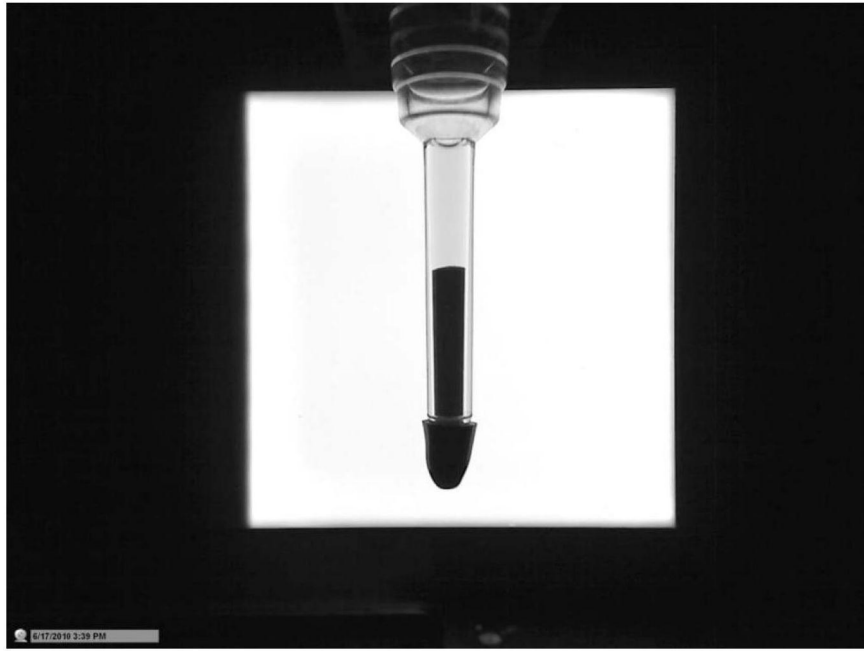


图15

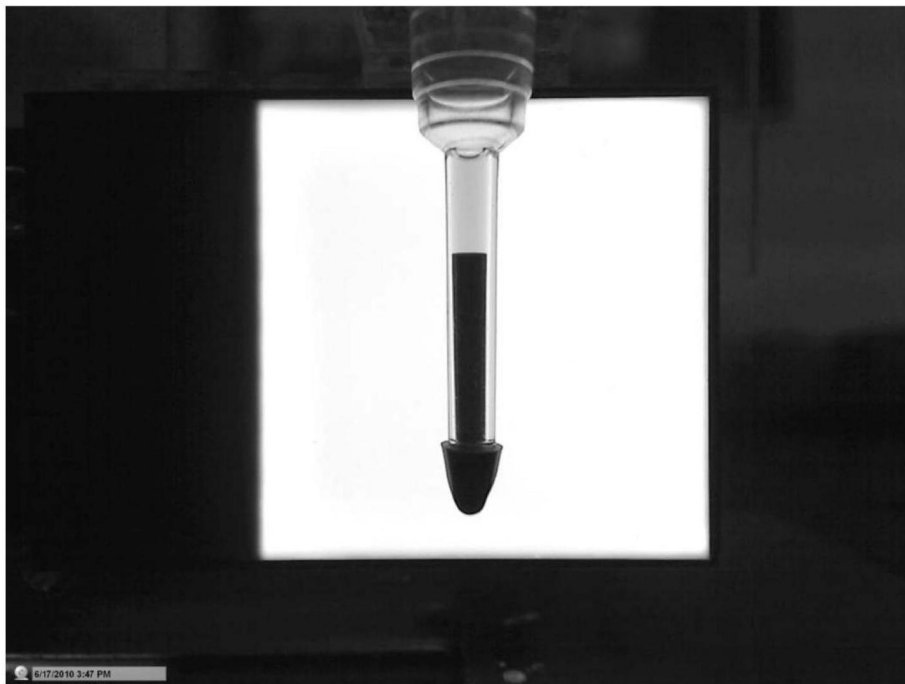


图16

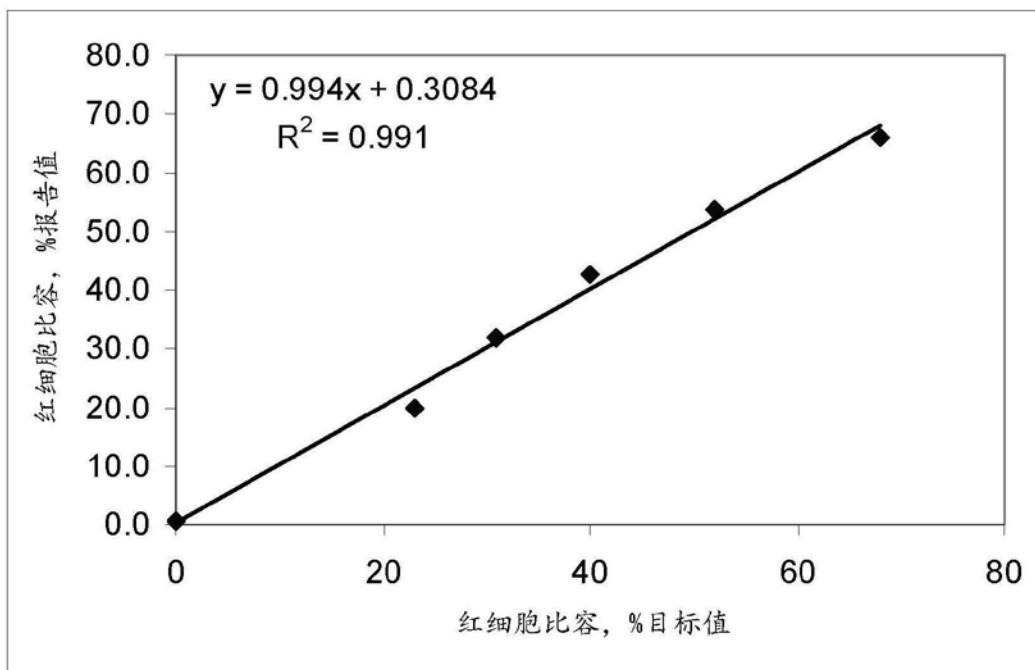


图17

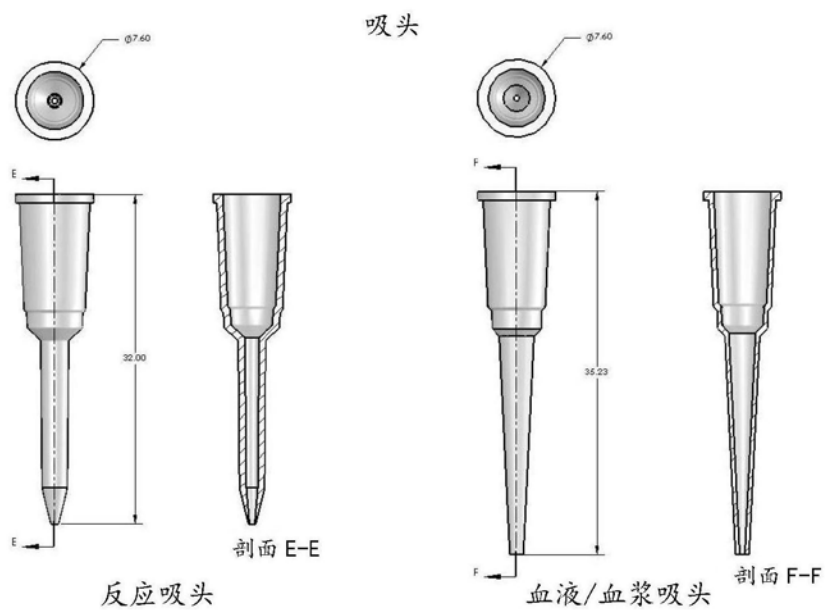


图18

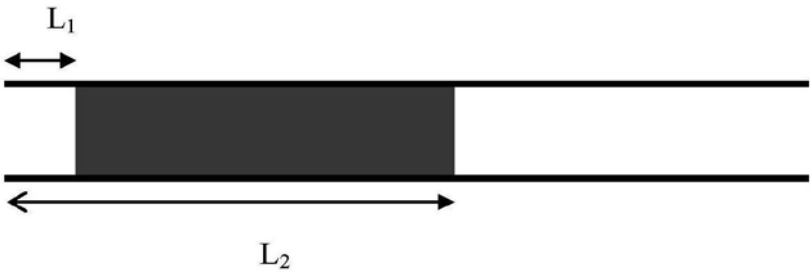


图19

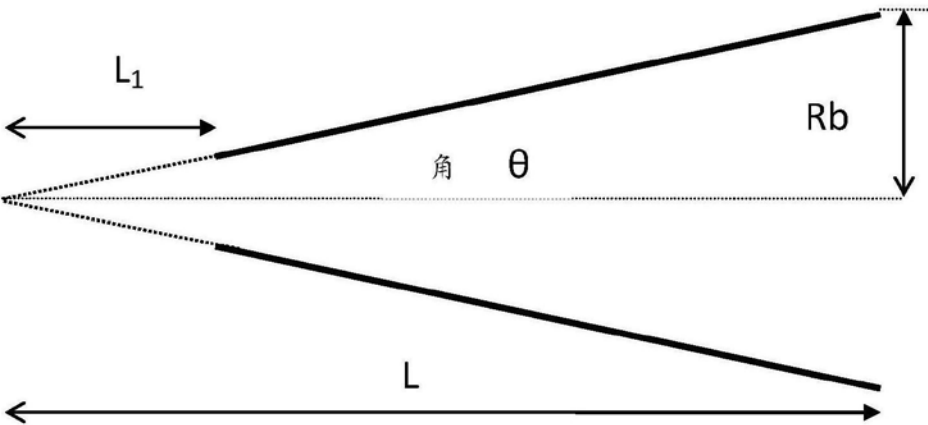


图20

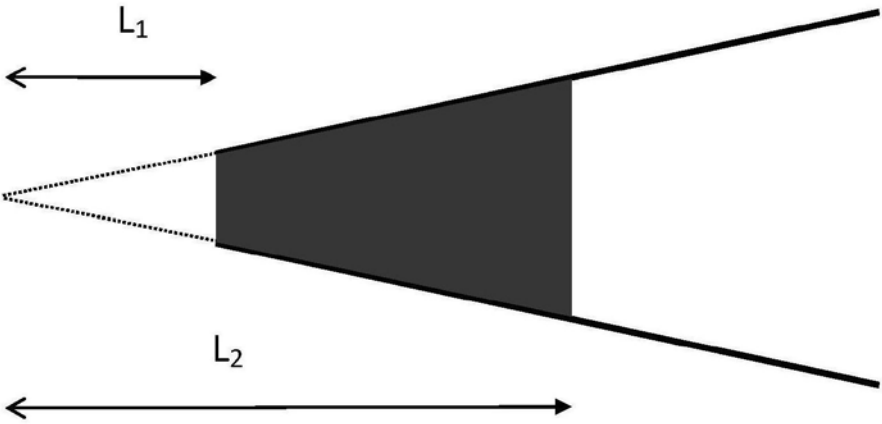


图21

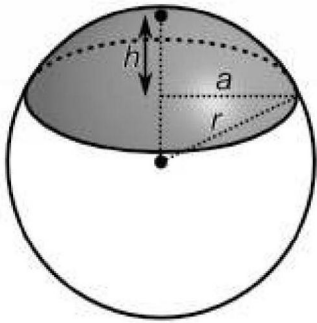


图22

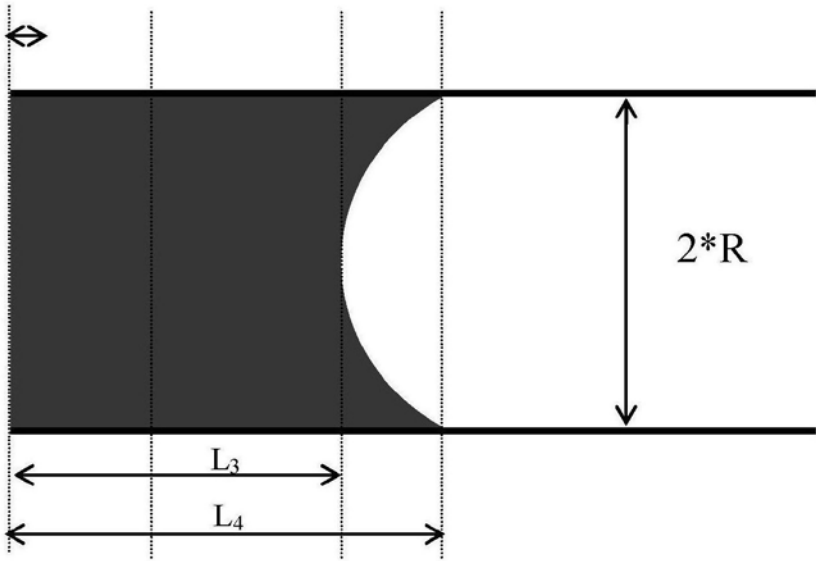


图23

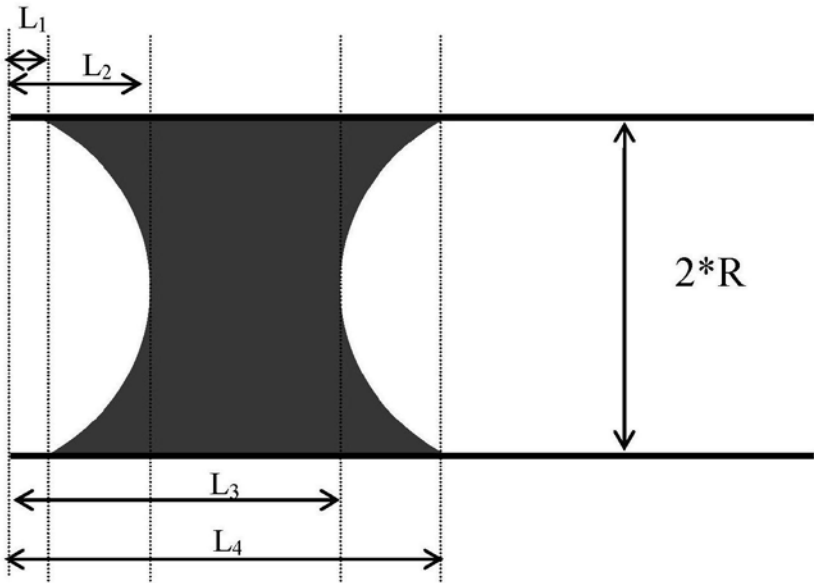


图24

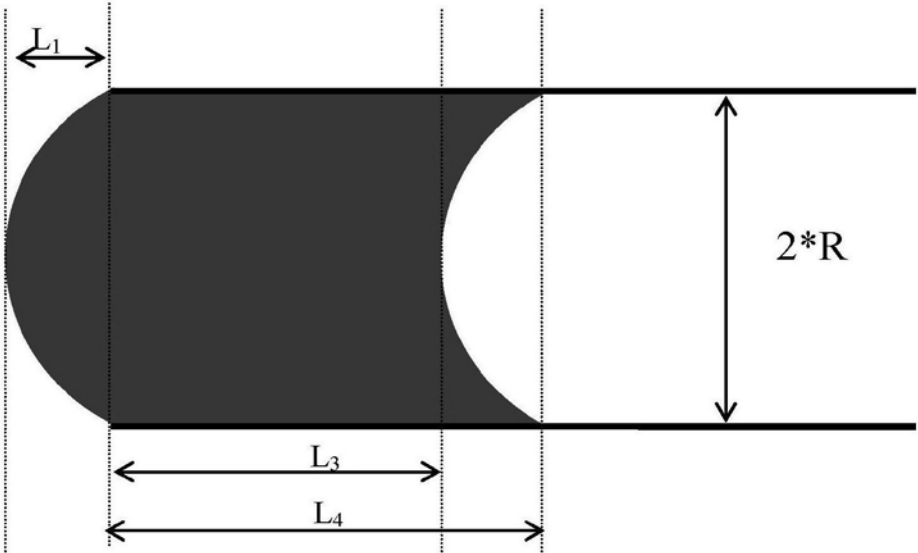


图25

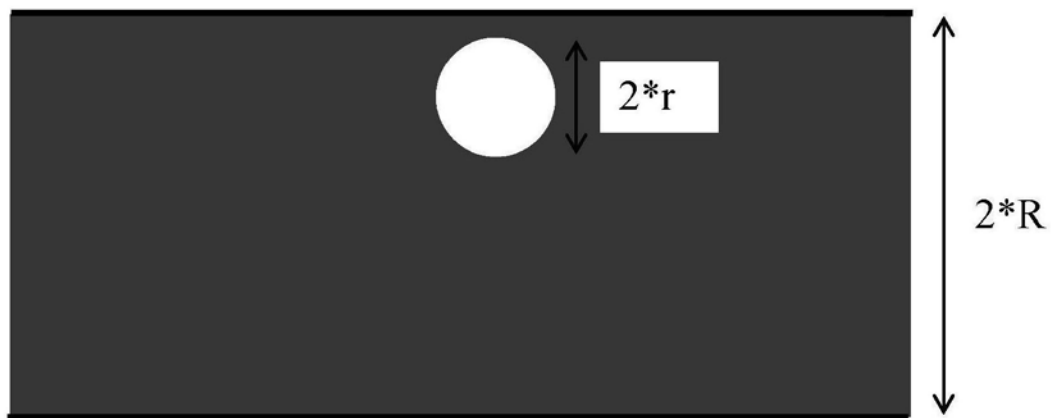


图26

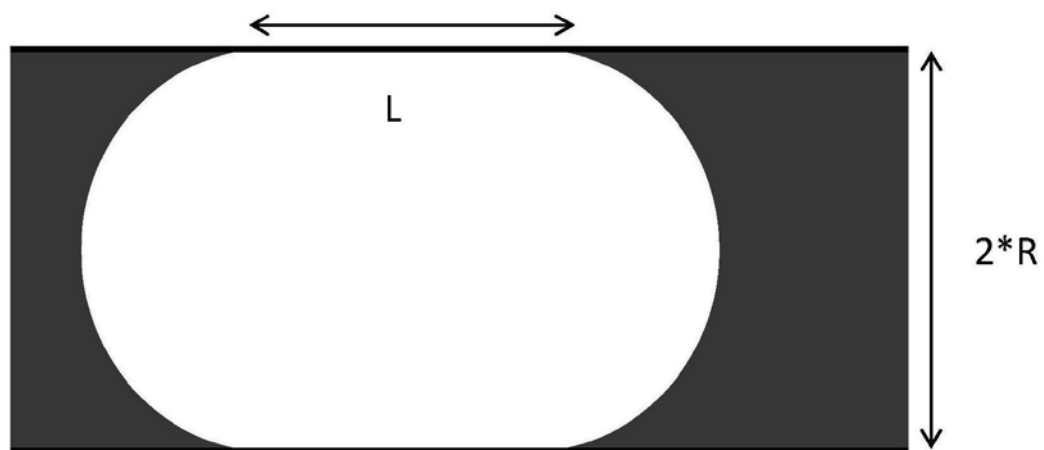


图27



图28

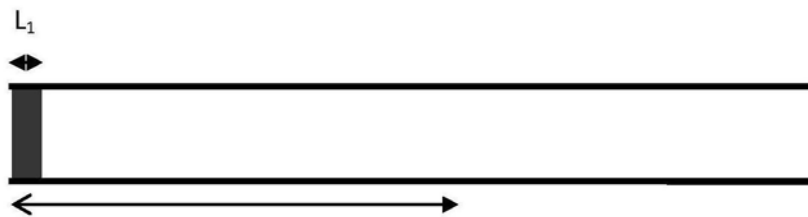


图29

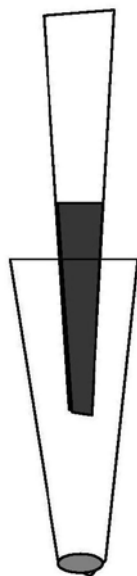


图30

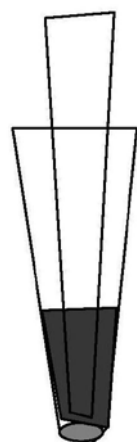


图31

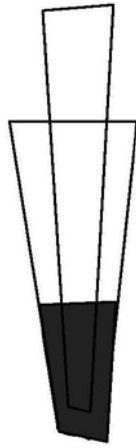


图32

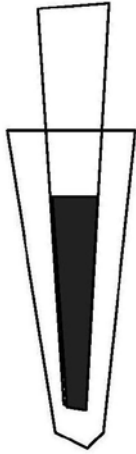


图33



图34



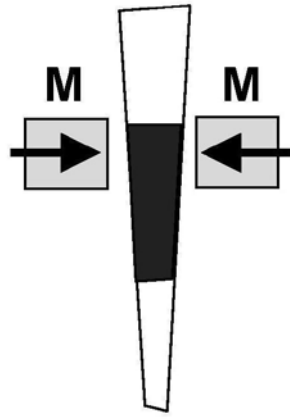


图35

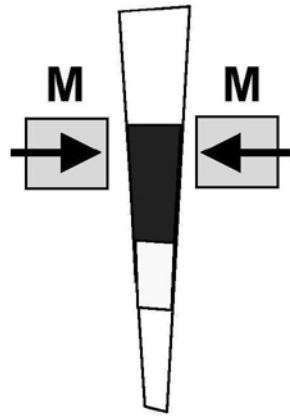


图36

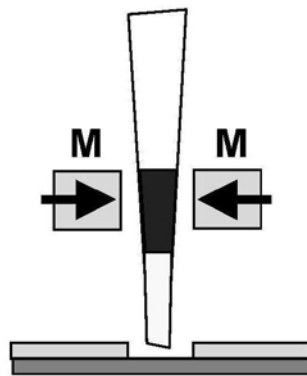


图37

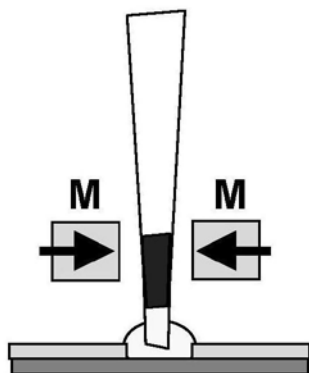


图38

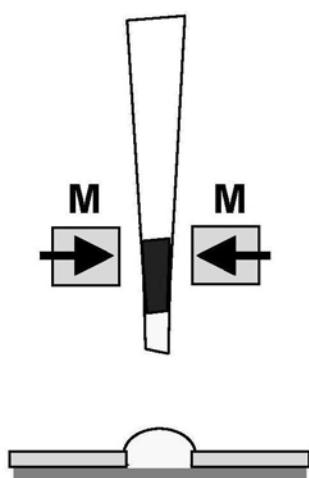


图39



图40

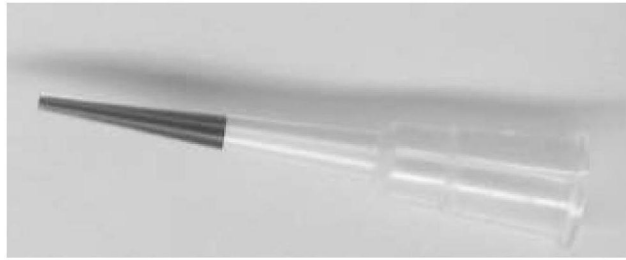


图41



图42

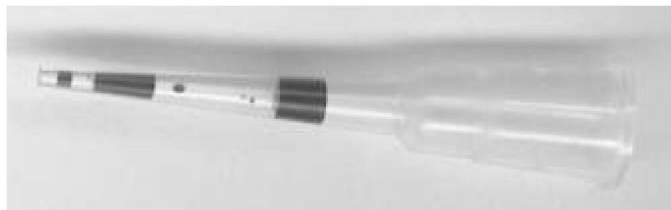


图43



图44

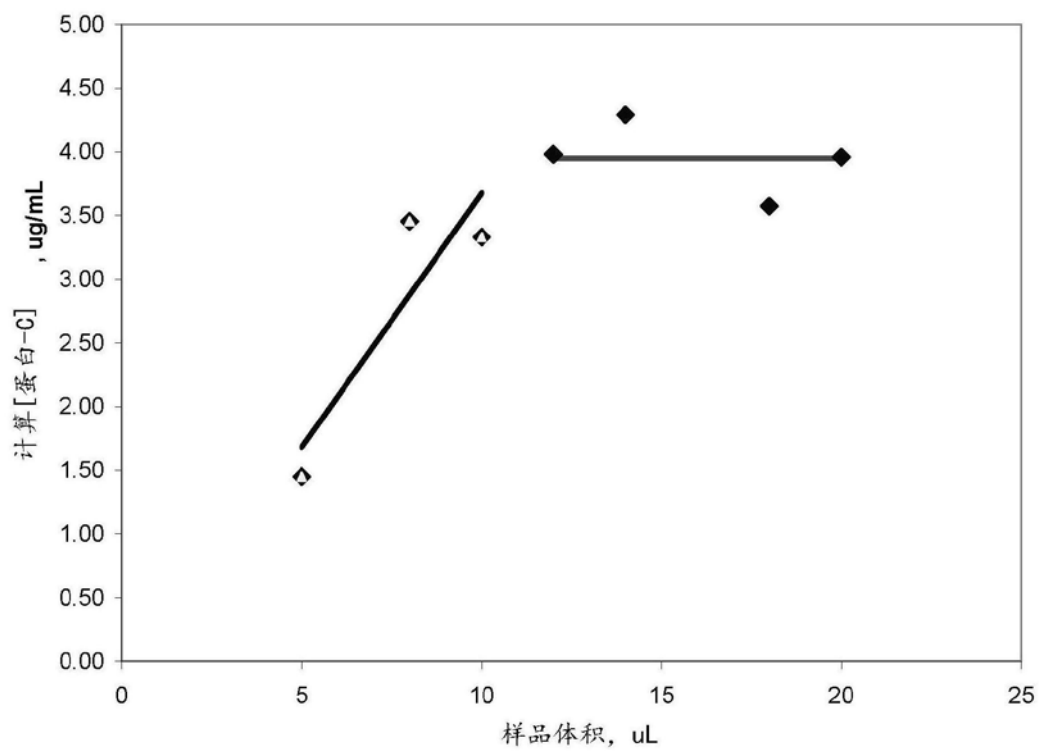


图45



图46

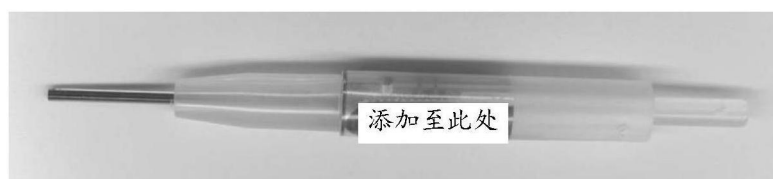


图47

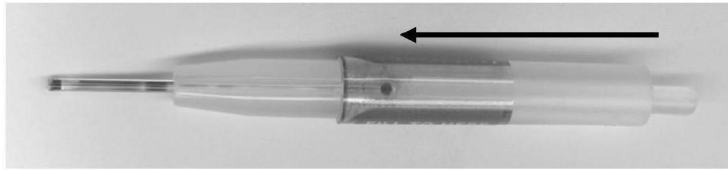


图48

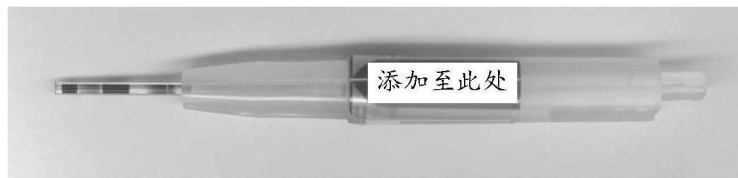


图49

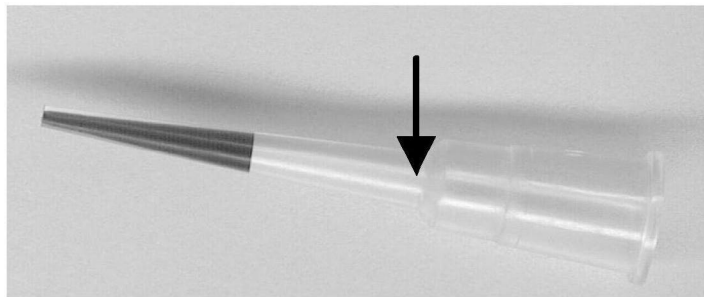


图50

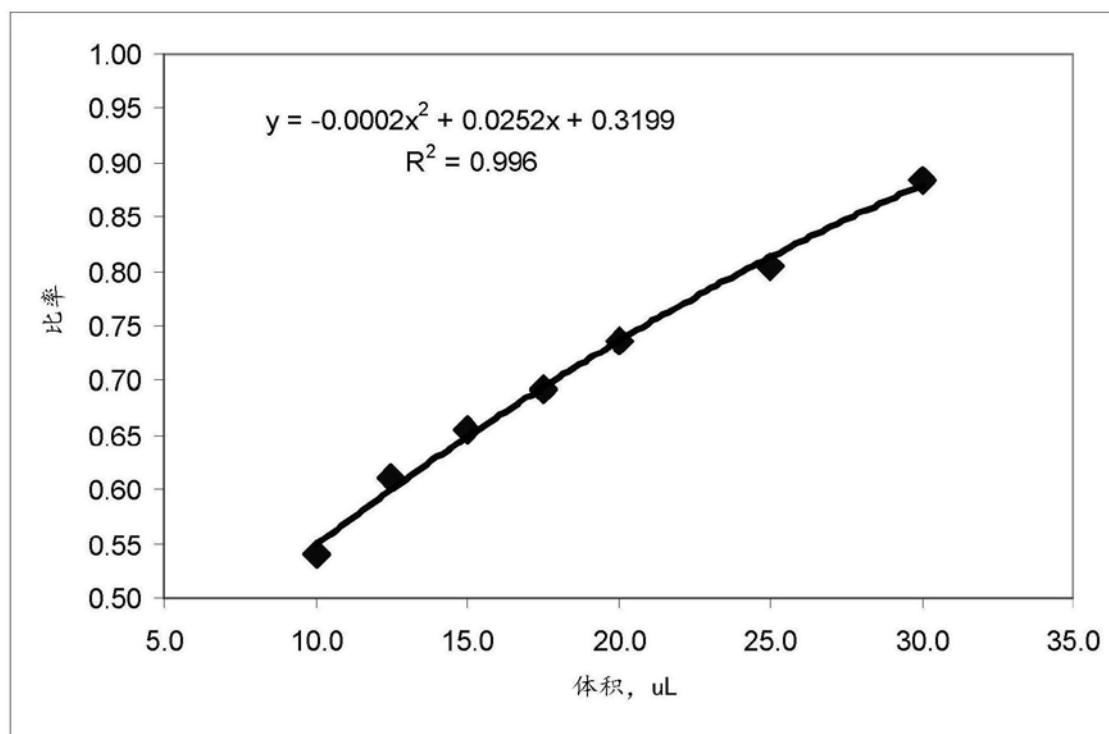


图51

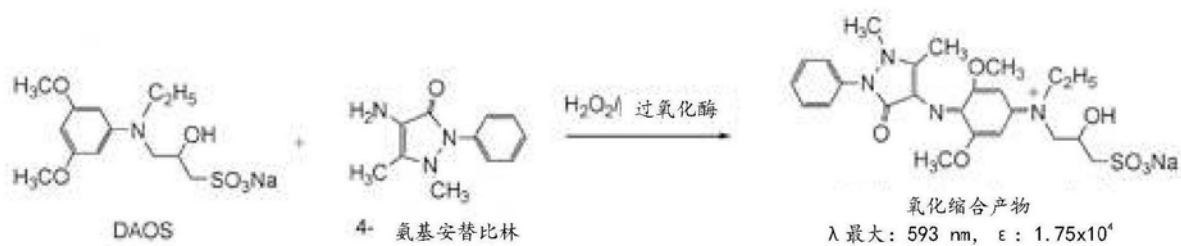


图52

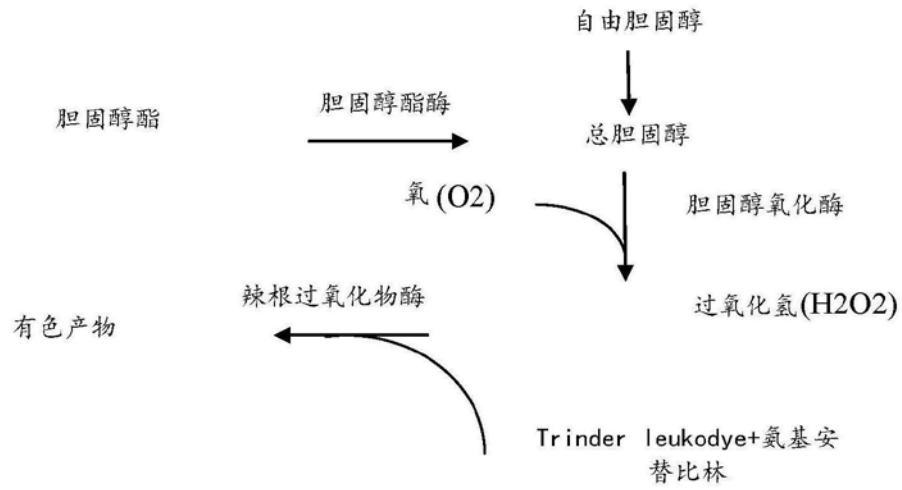


图53



图54

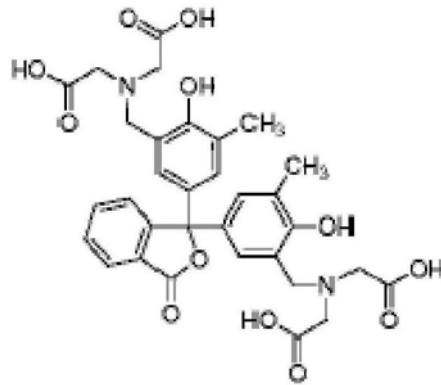


图55



图56



图57

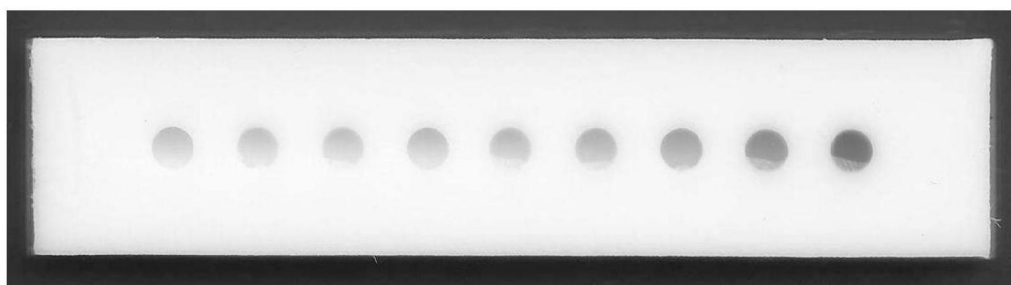


图58

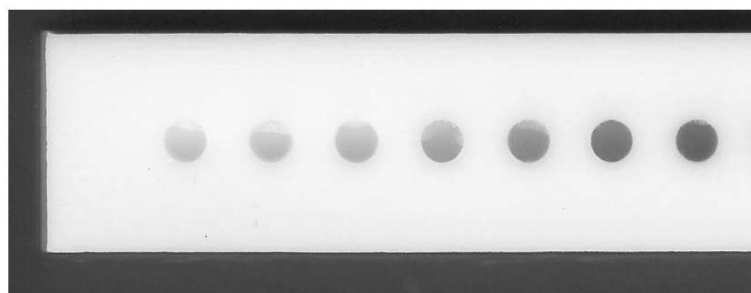


图59



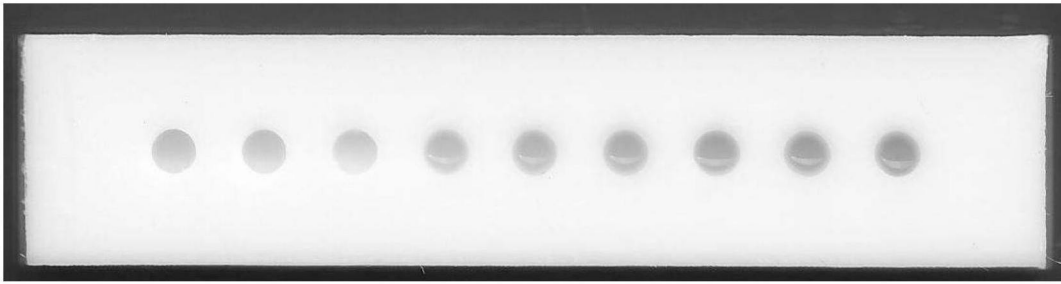


图60

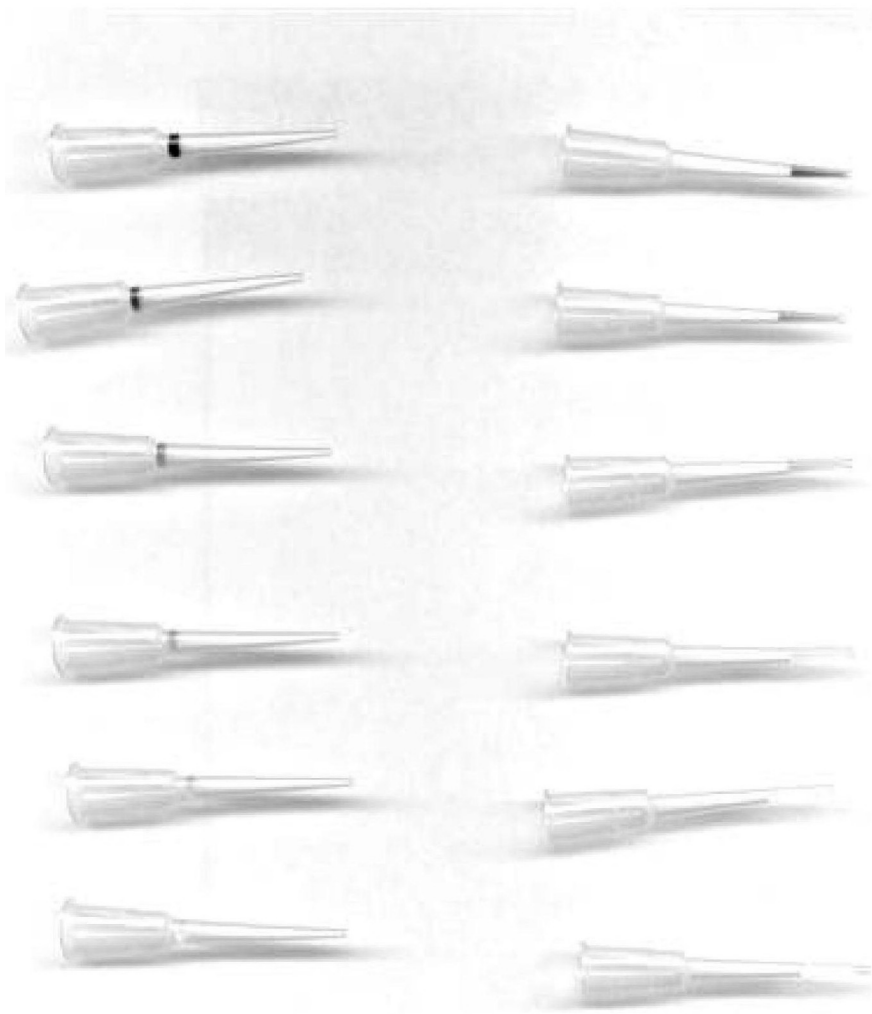


图61

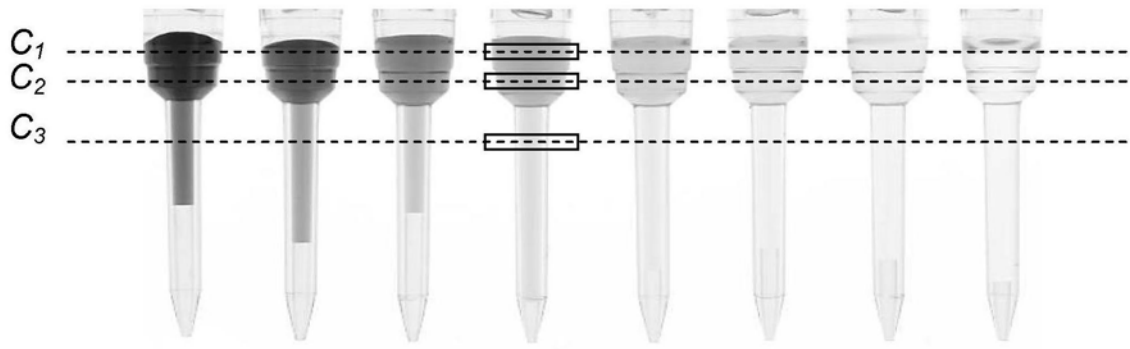


图62

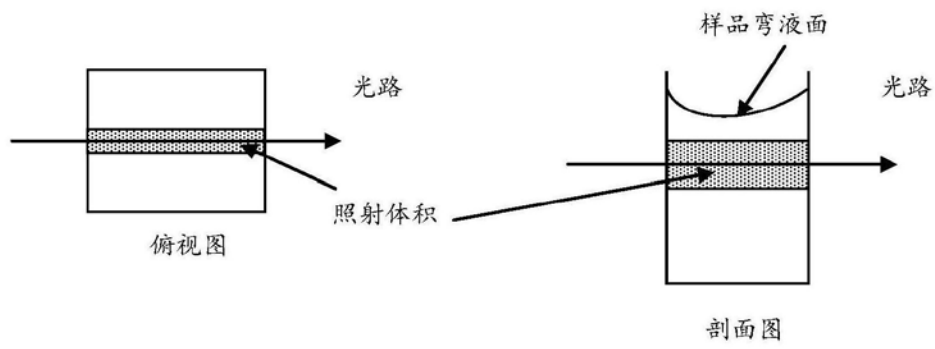


图63

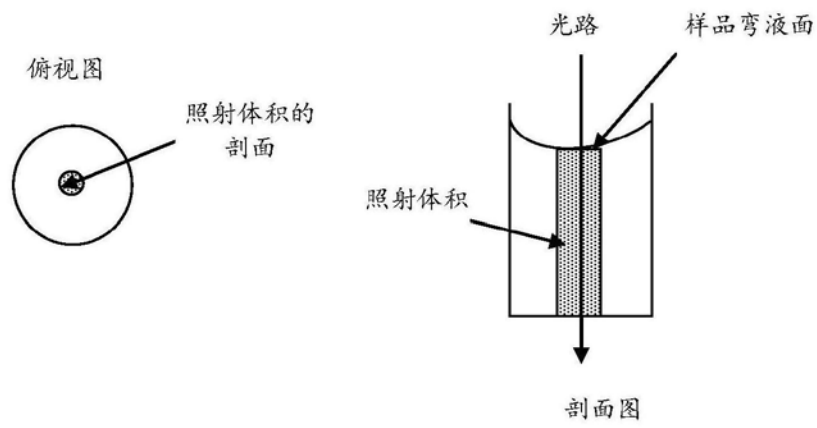


图64

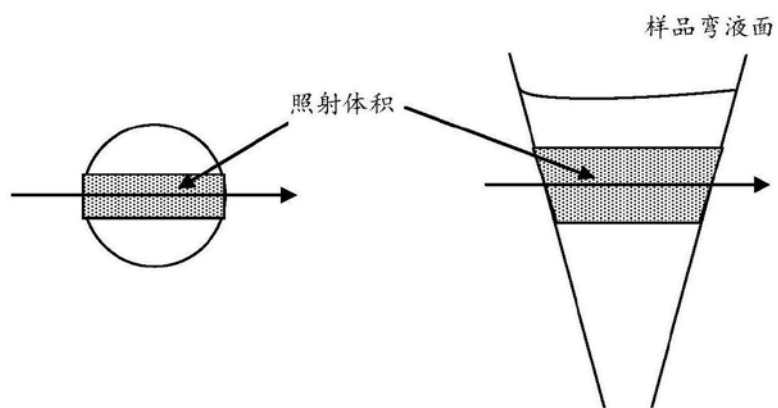


图65

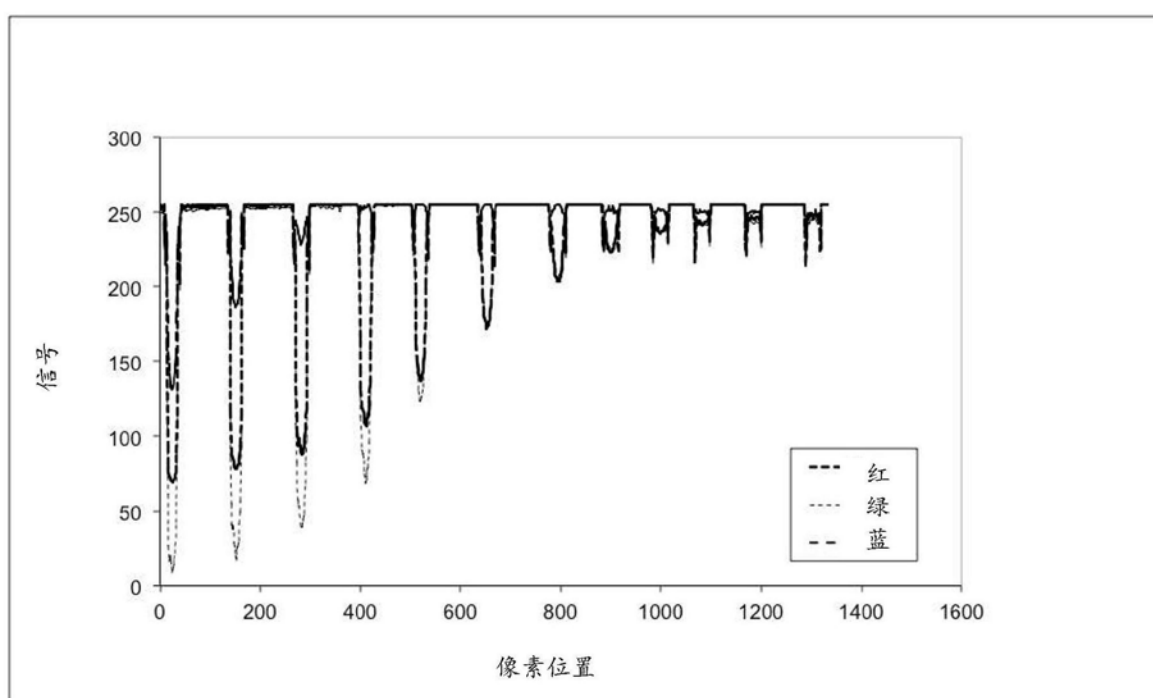


图66

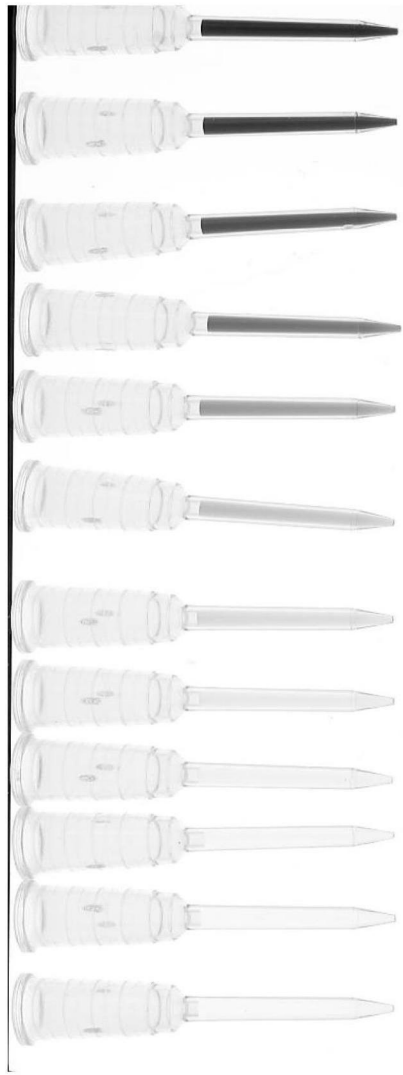


图67

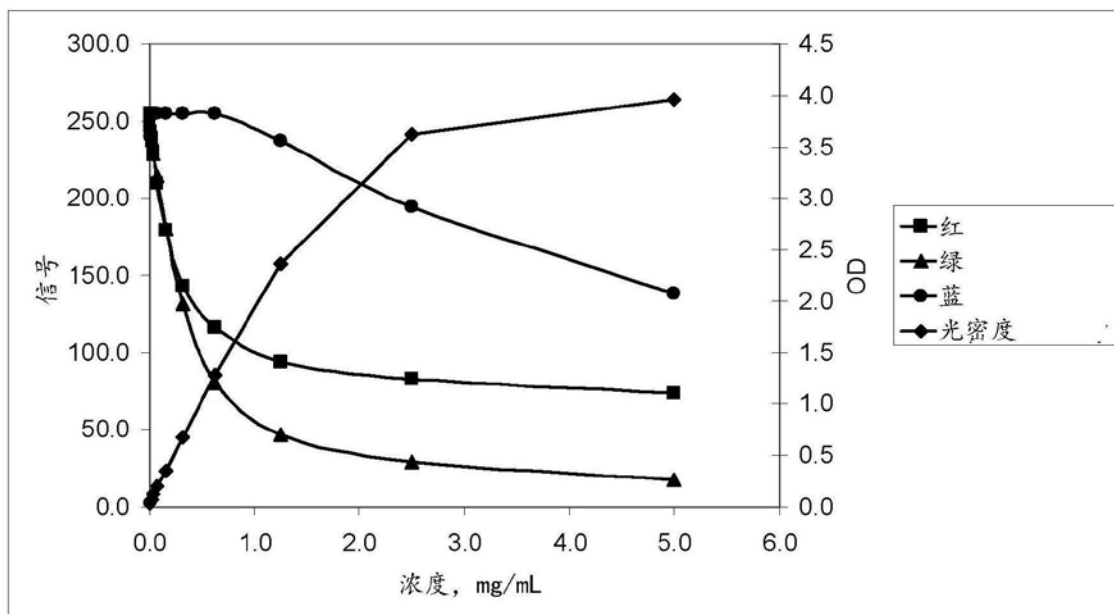


图68

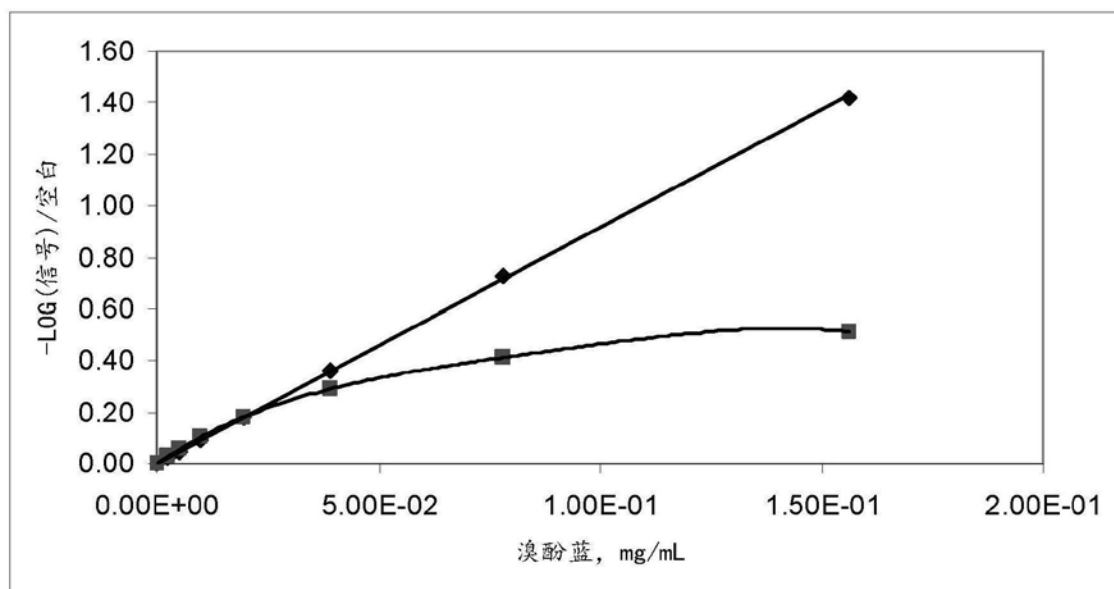


图69

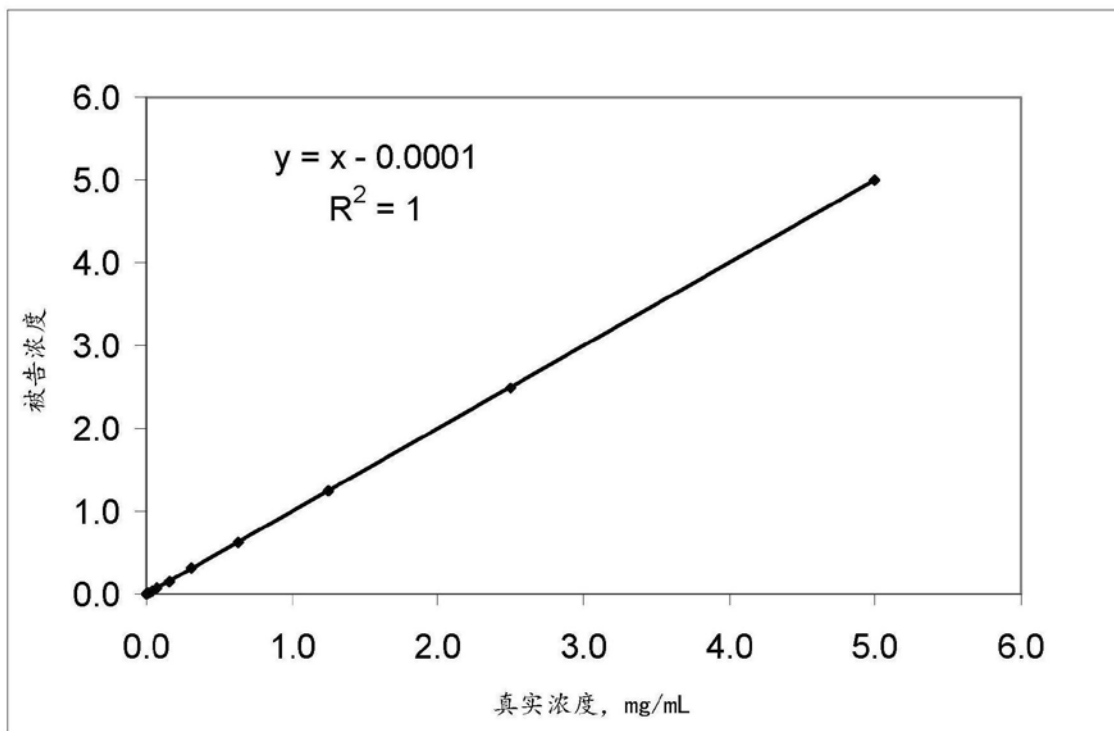


图70

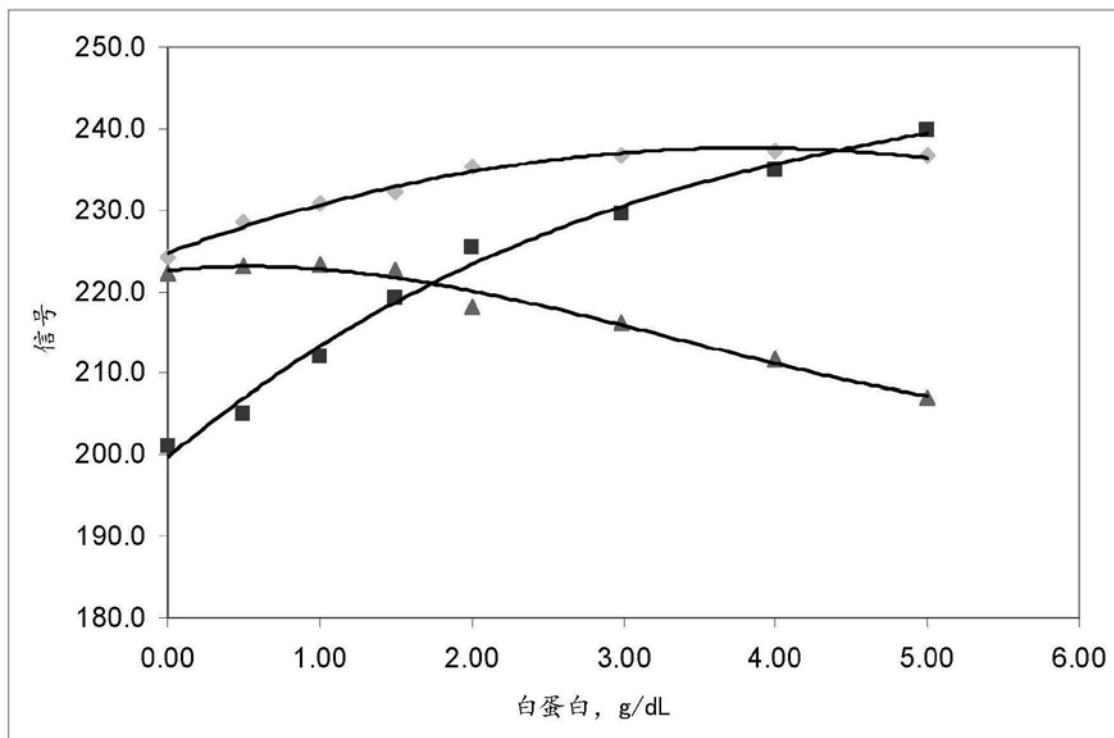


图71

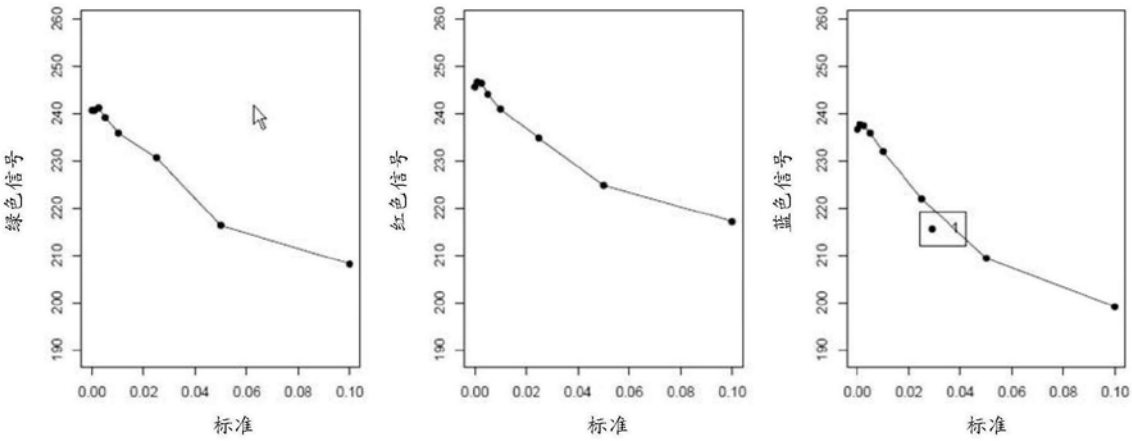


图72

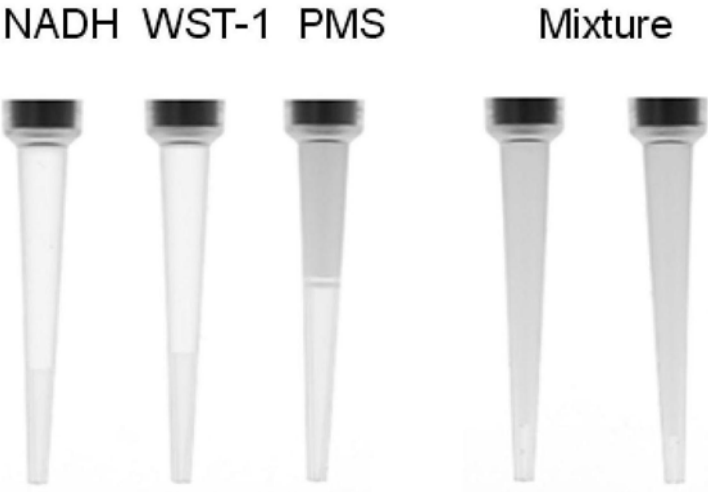


图73



图74

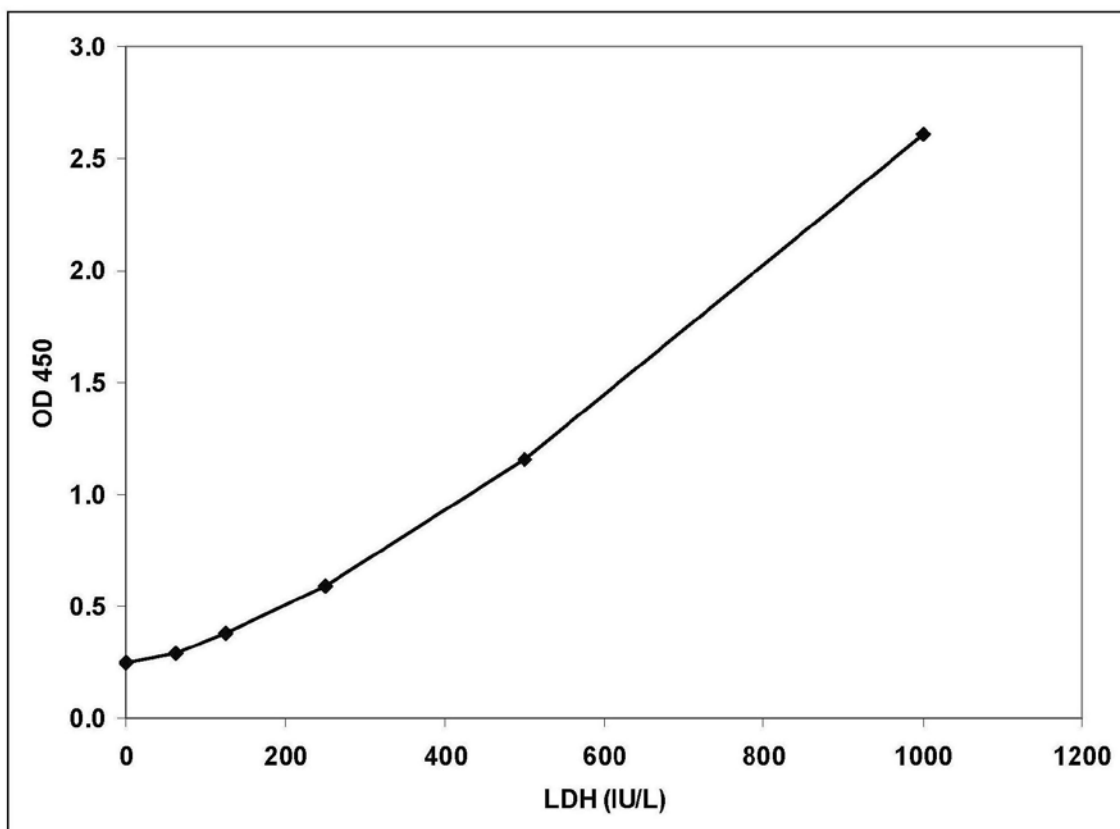


图75

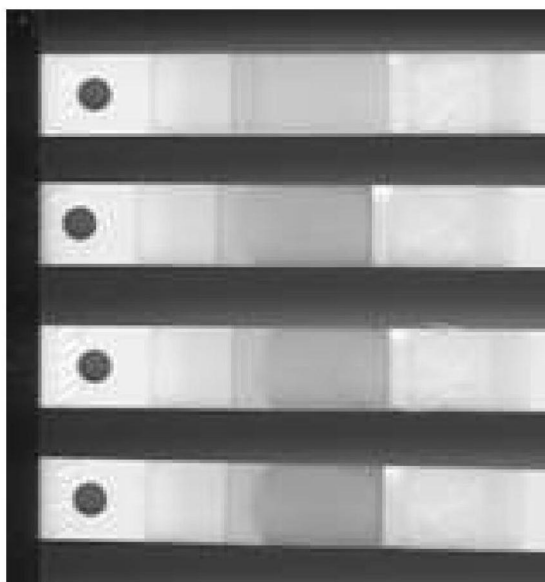


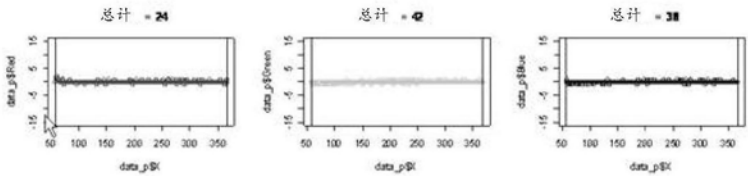
图76



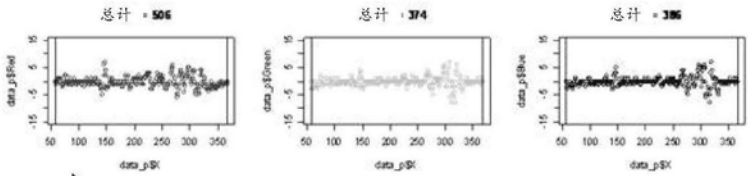


图77

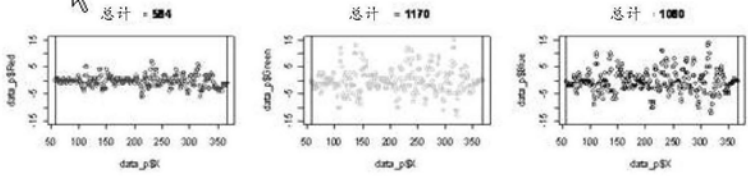
A: 阴性



B: 阳性



D: 阳性



对照样：好

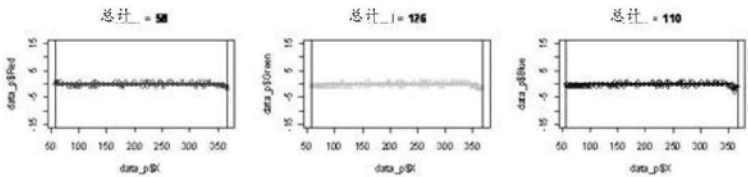


图78

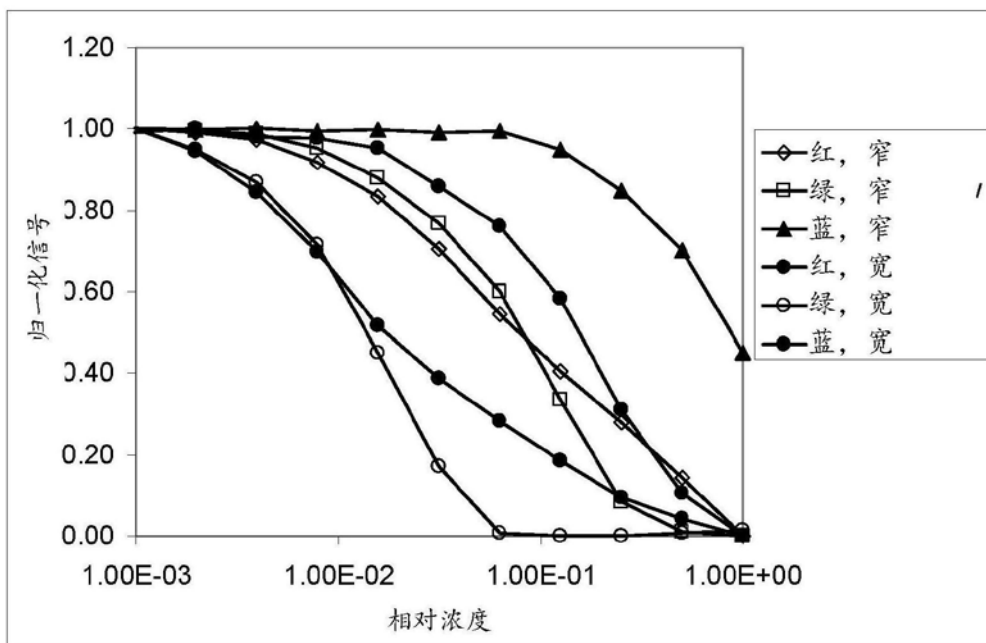


图79

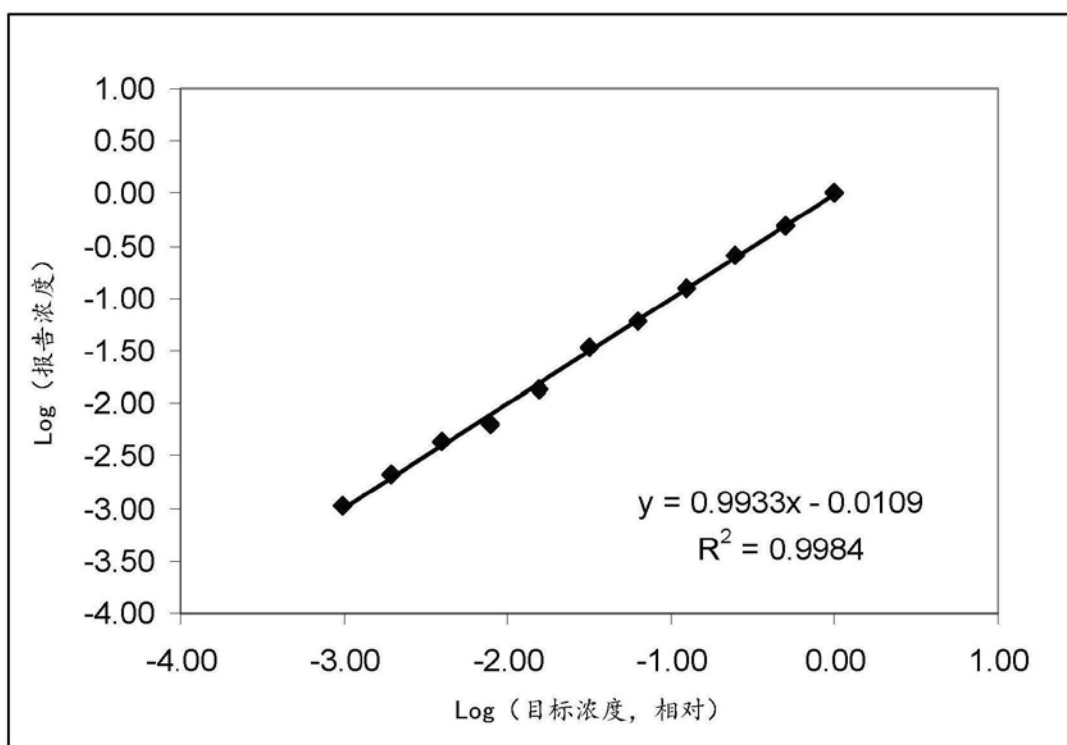


图80

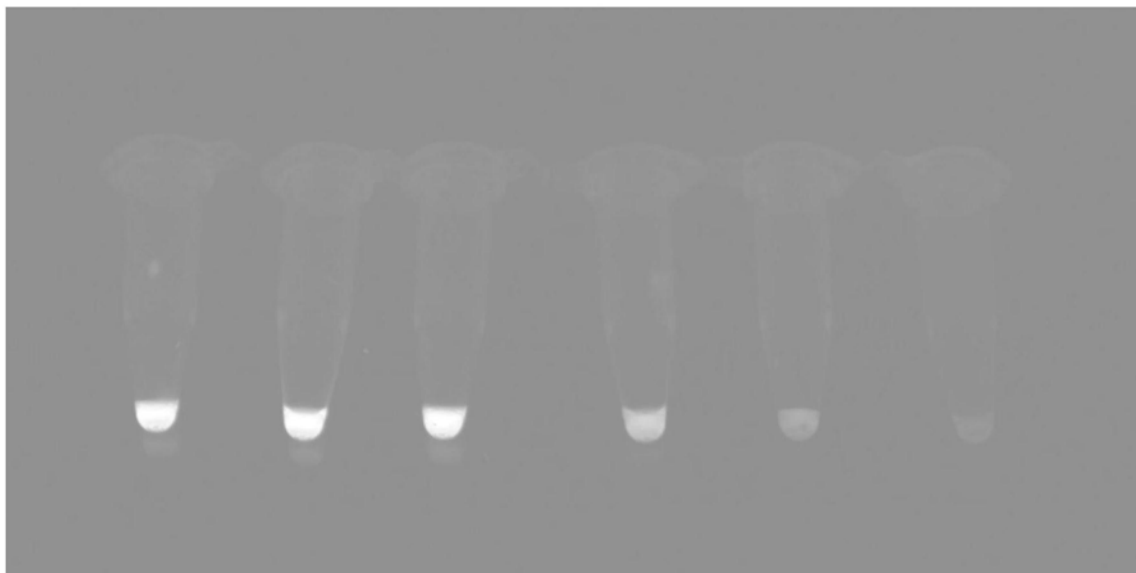


图81

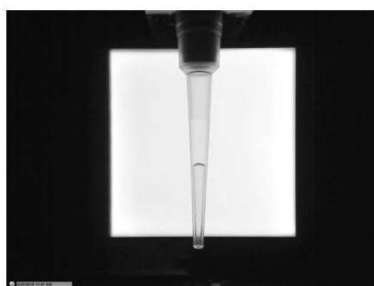


图82

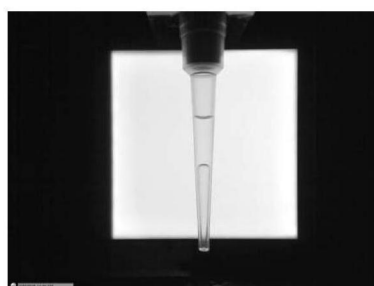


图83

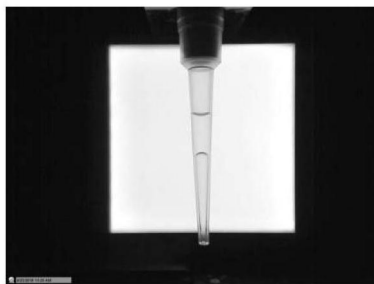


图84

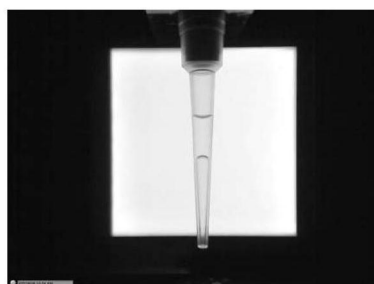


图85

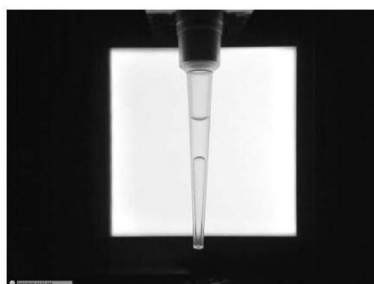


图86



图87

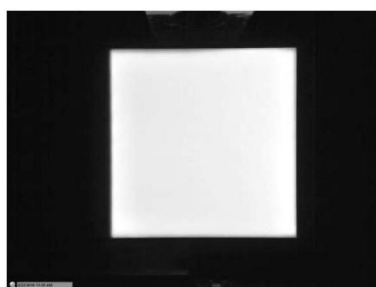


图88

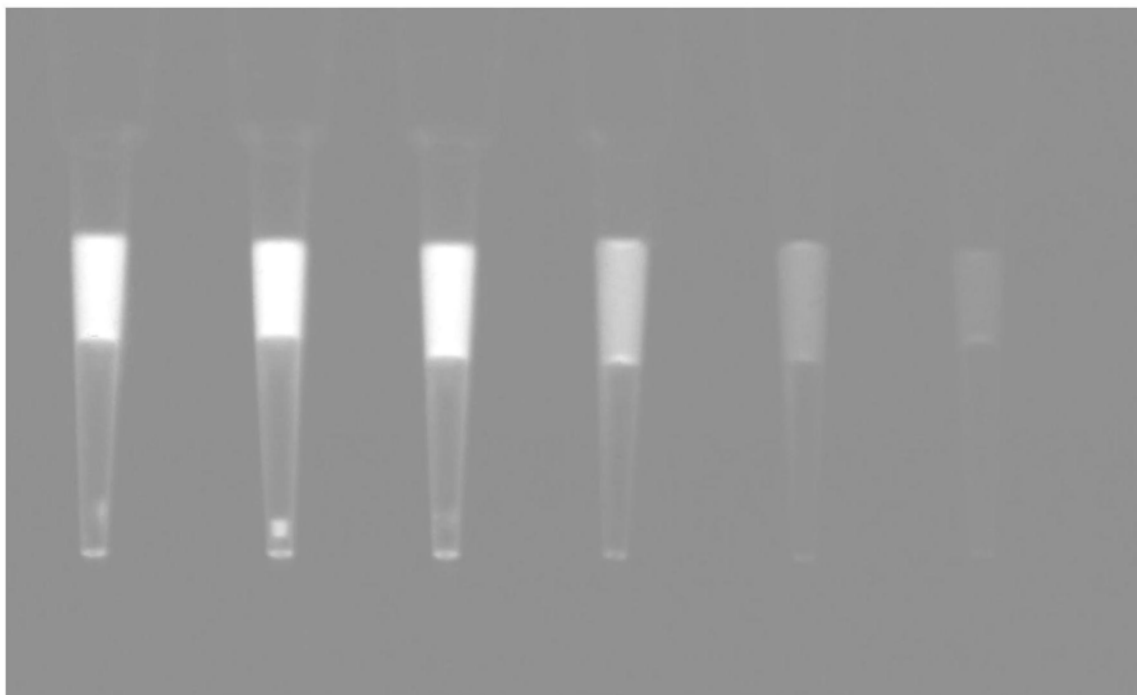


图89

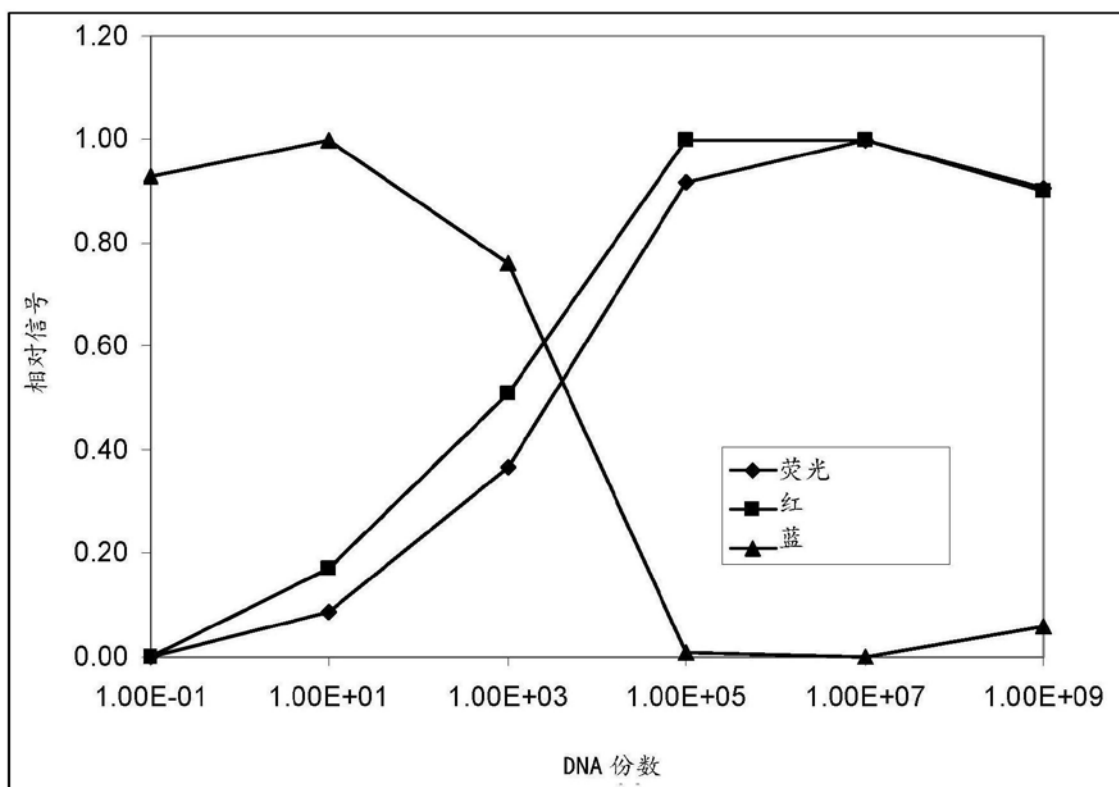


图90

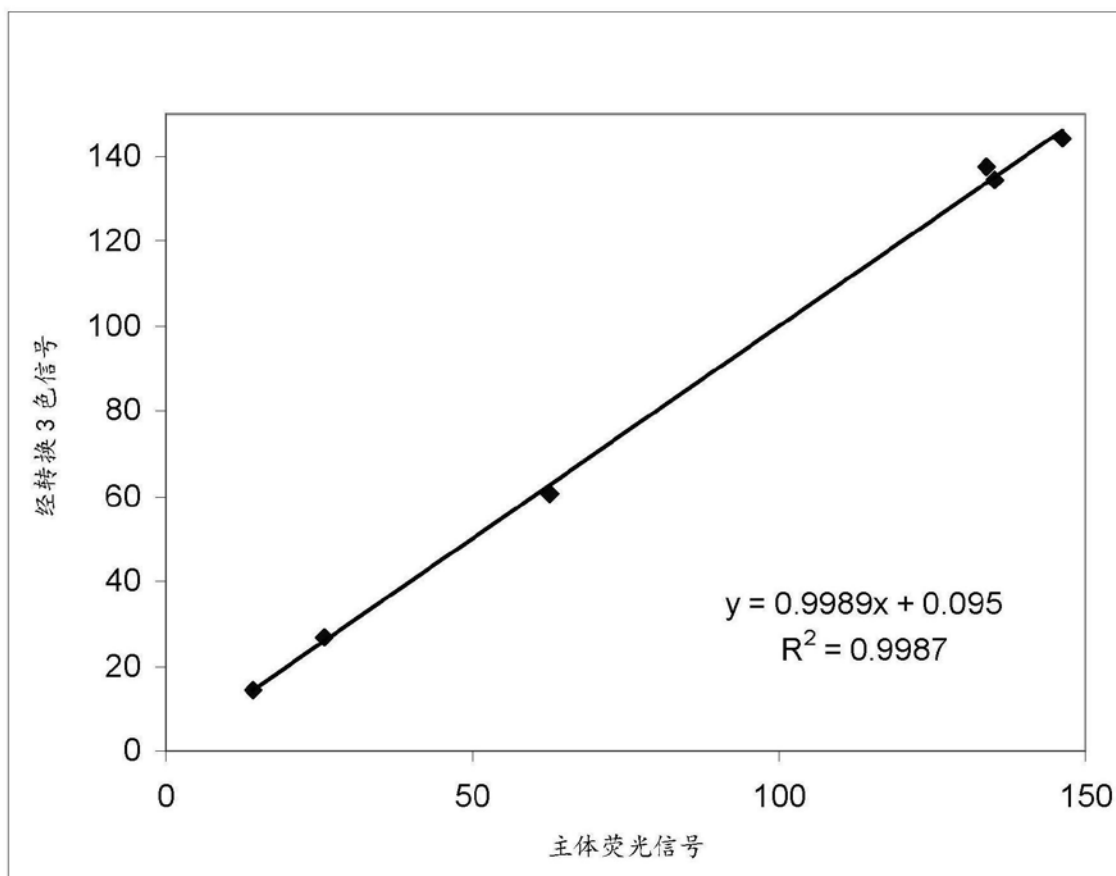


图91

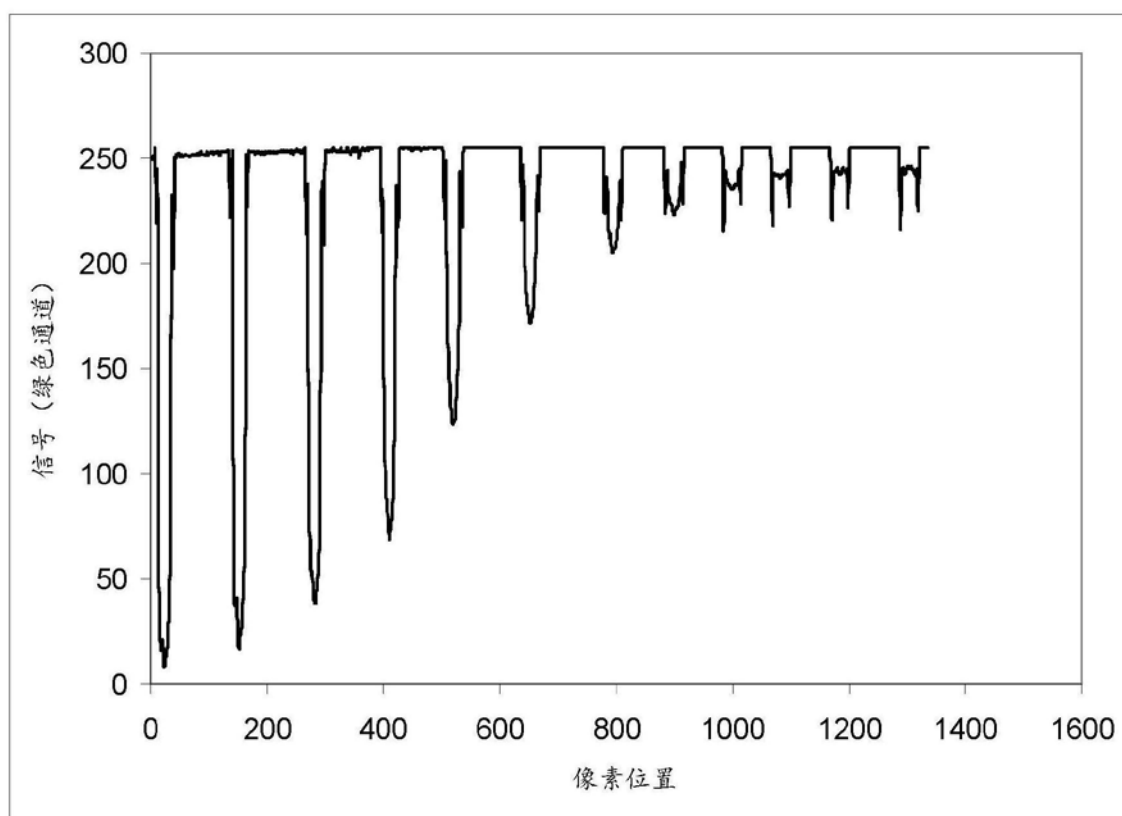


图92



图93





图94

区#										
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
空气	分析1	空气	清洗	空气	分析2	空气	清洗	空气	分析3	空气

图95



图96

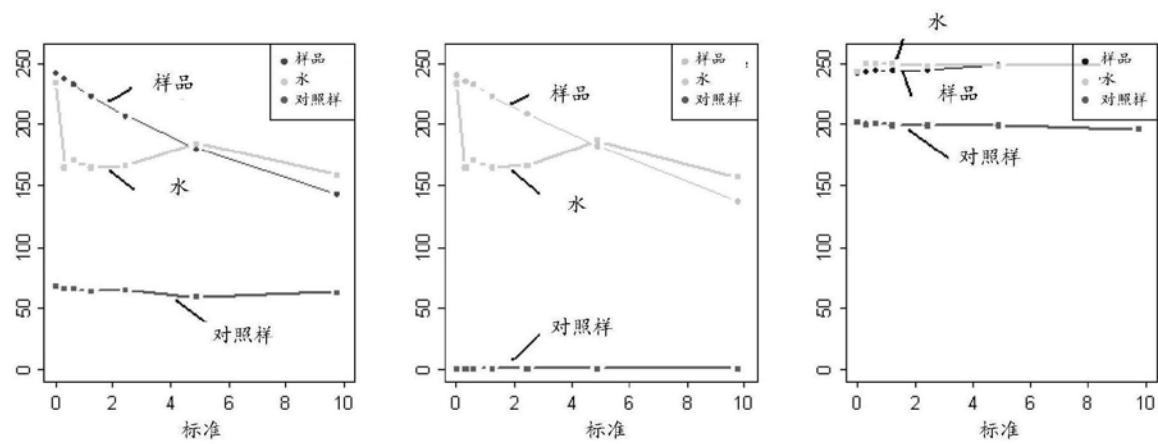


图97



图98



图99

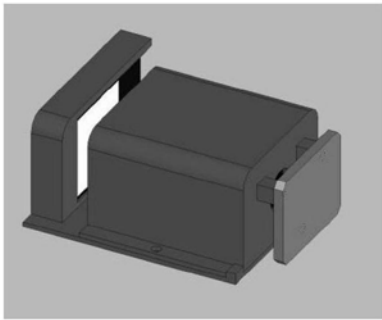


图100

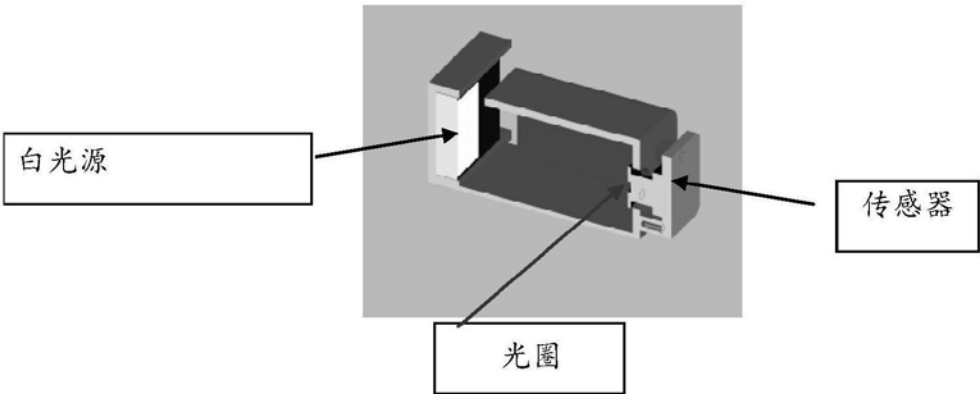


图101

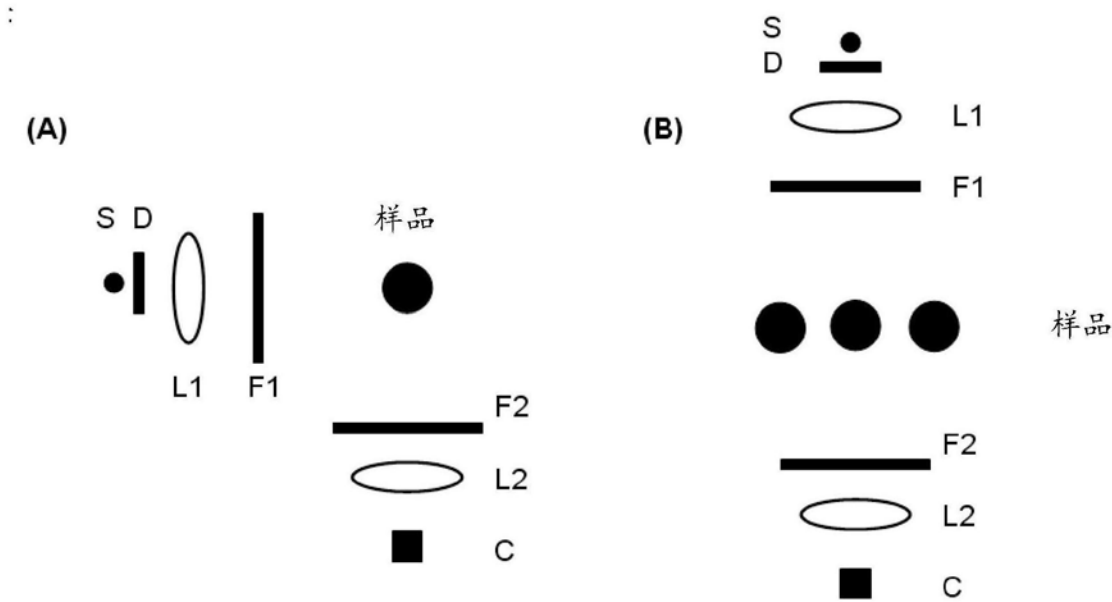


图102

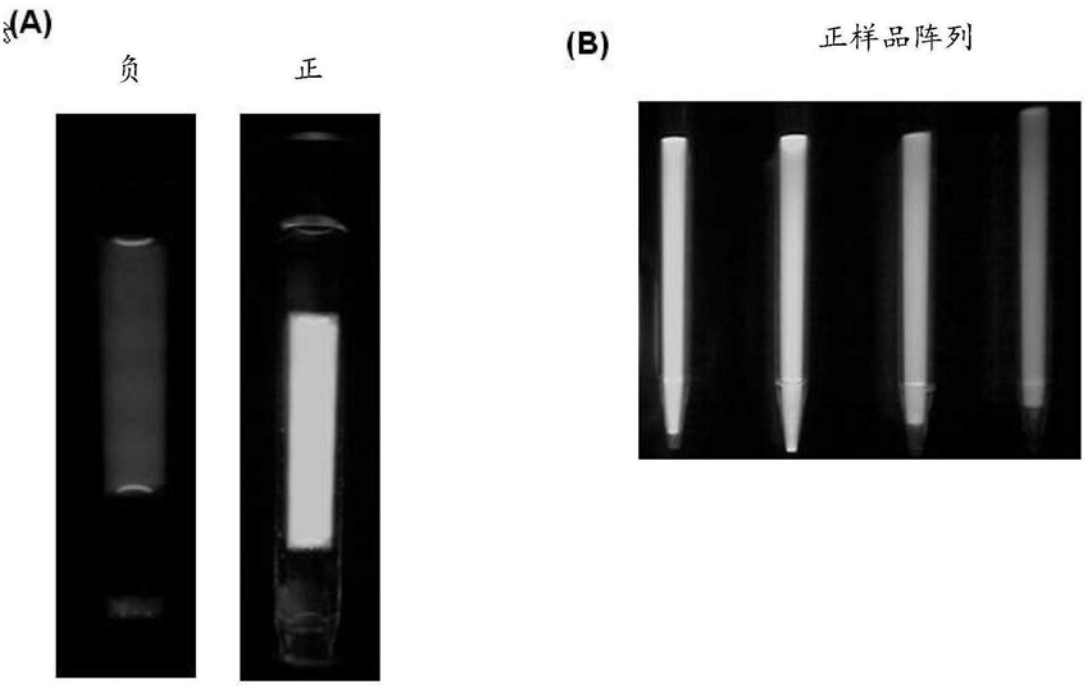


图103

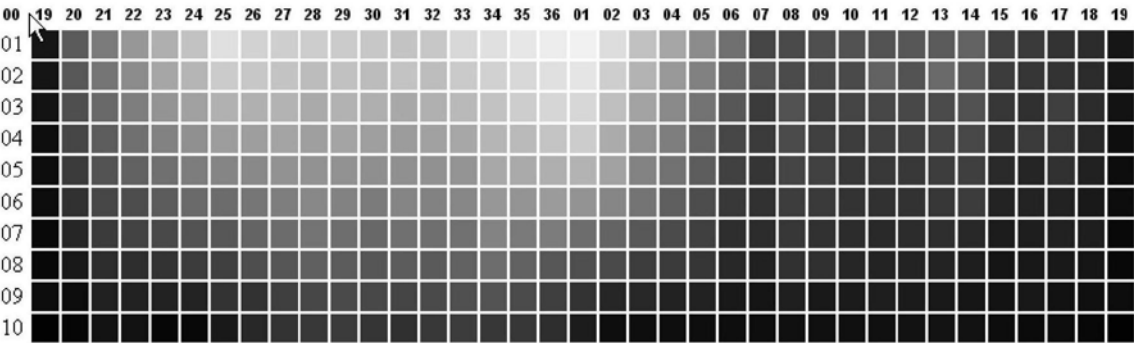


图104

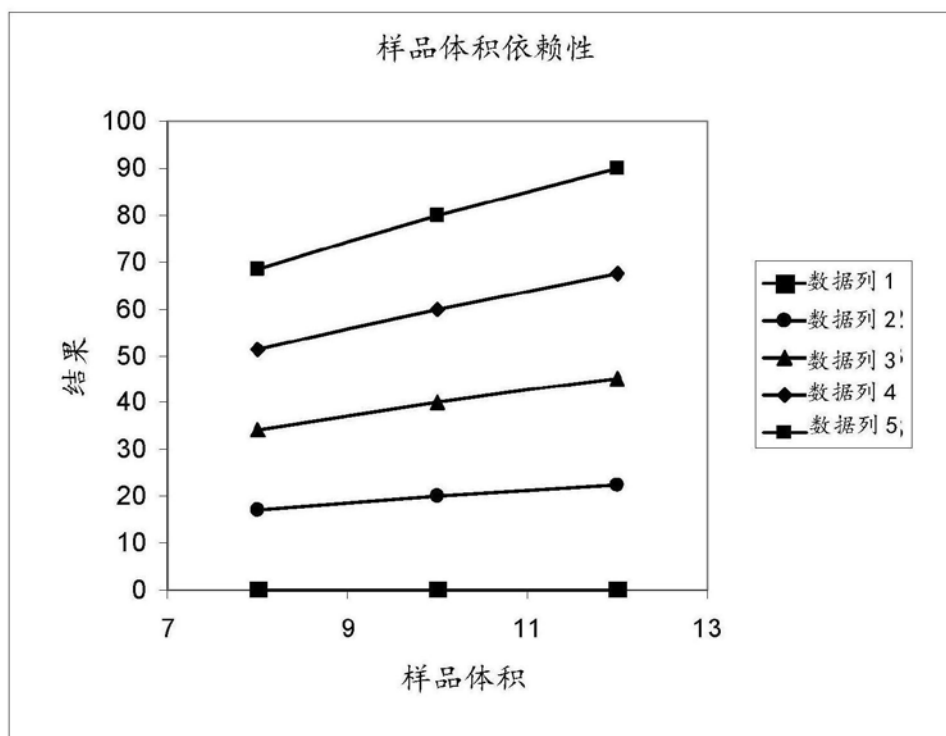


图105

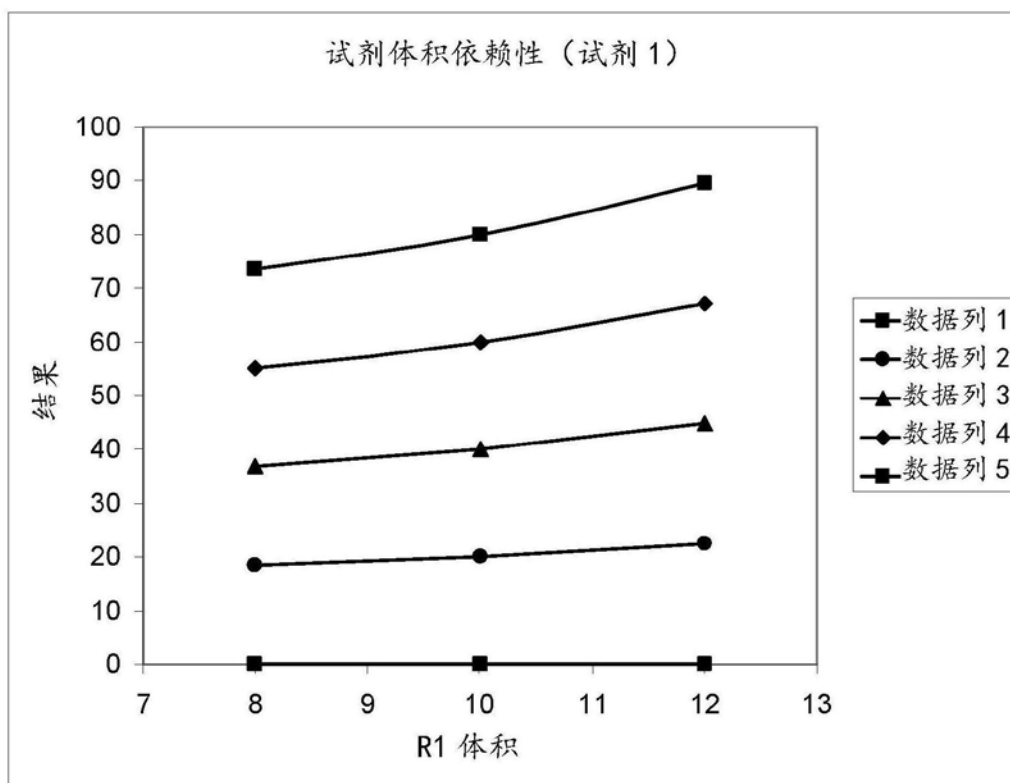


图106

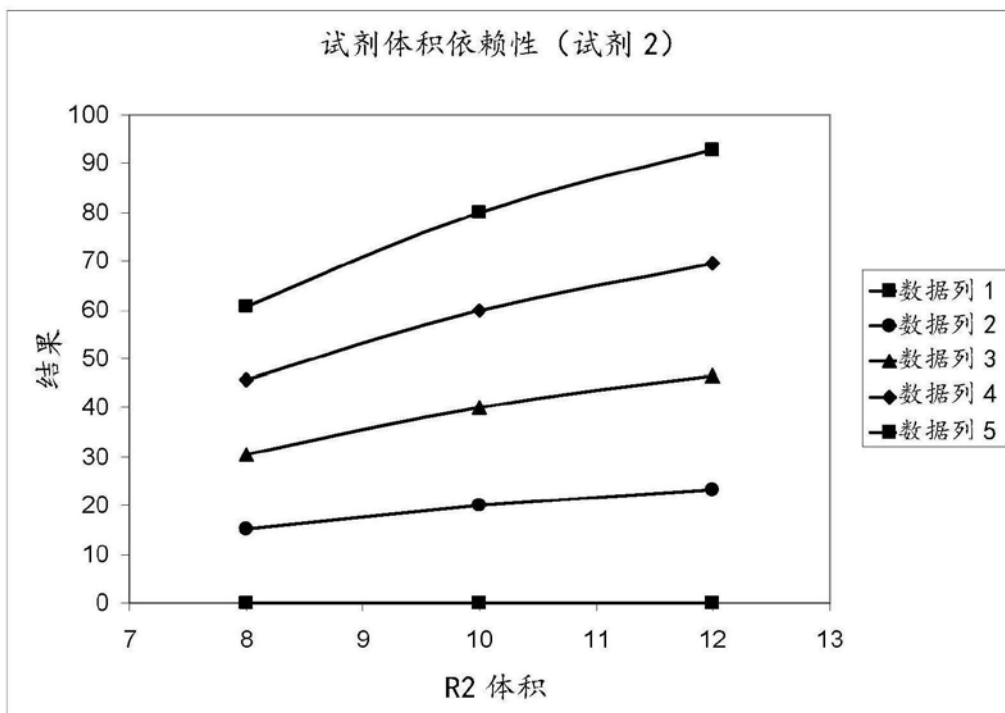


图107

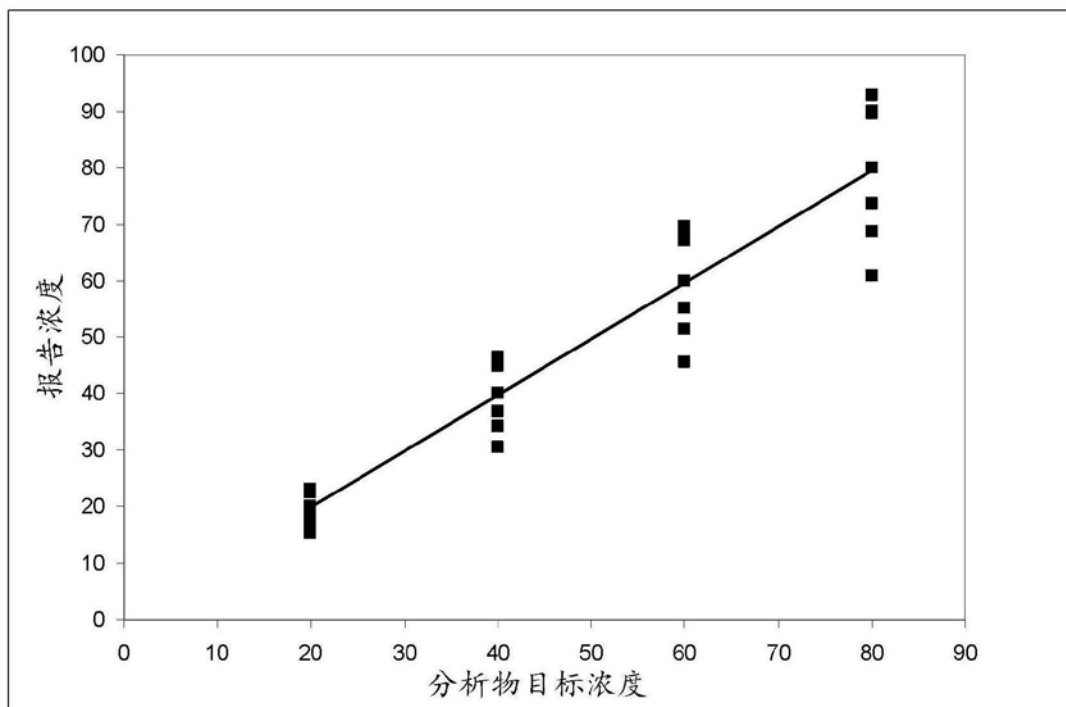


图108

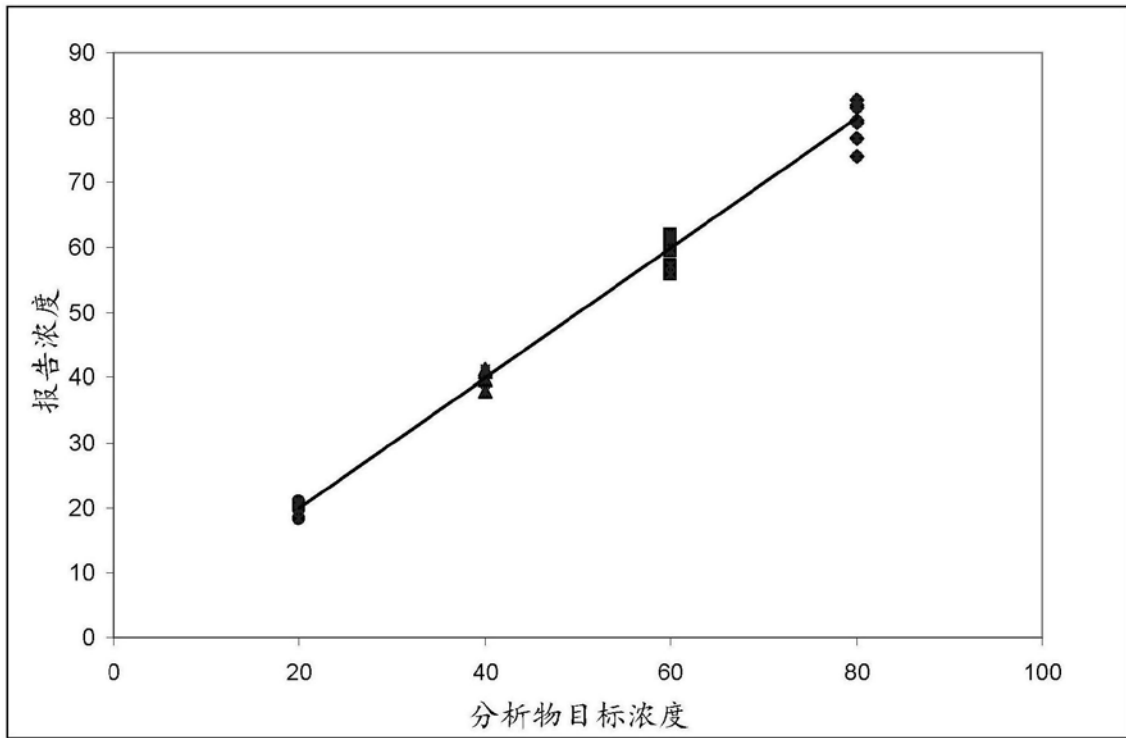


图109

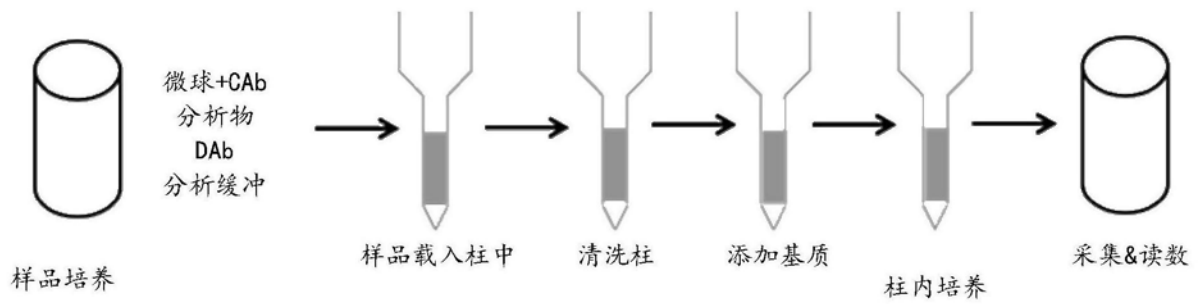


图110

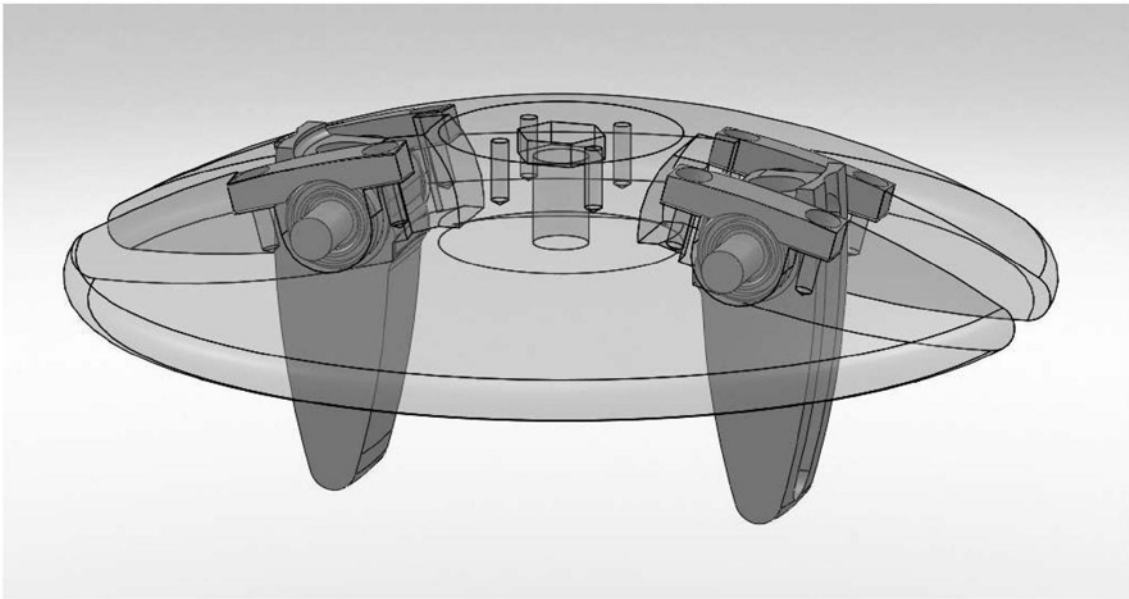


图111

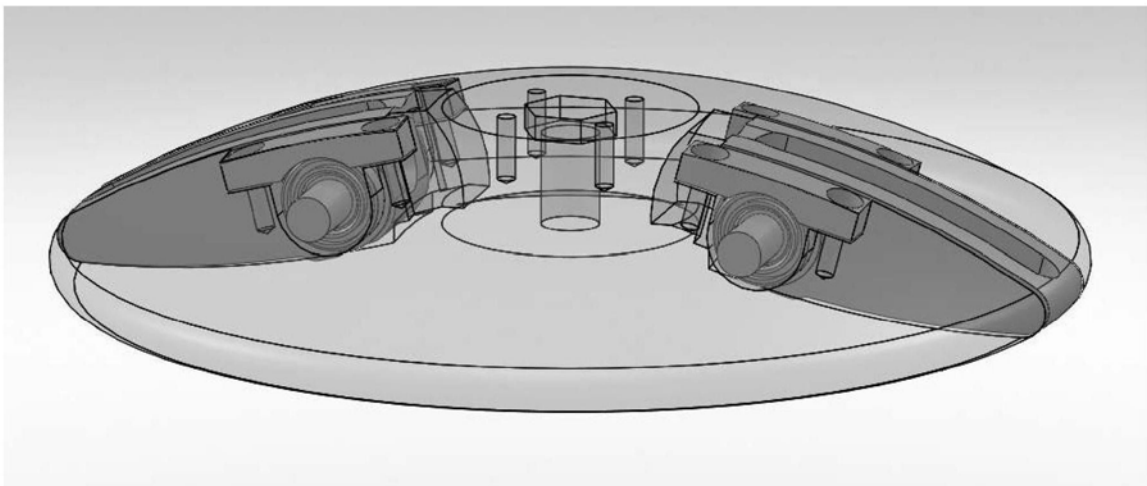


图112



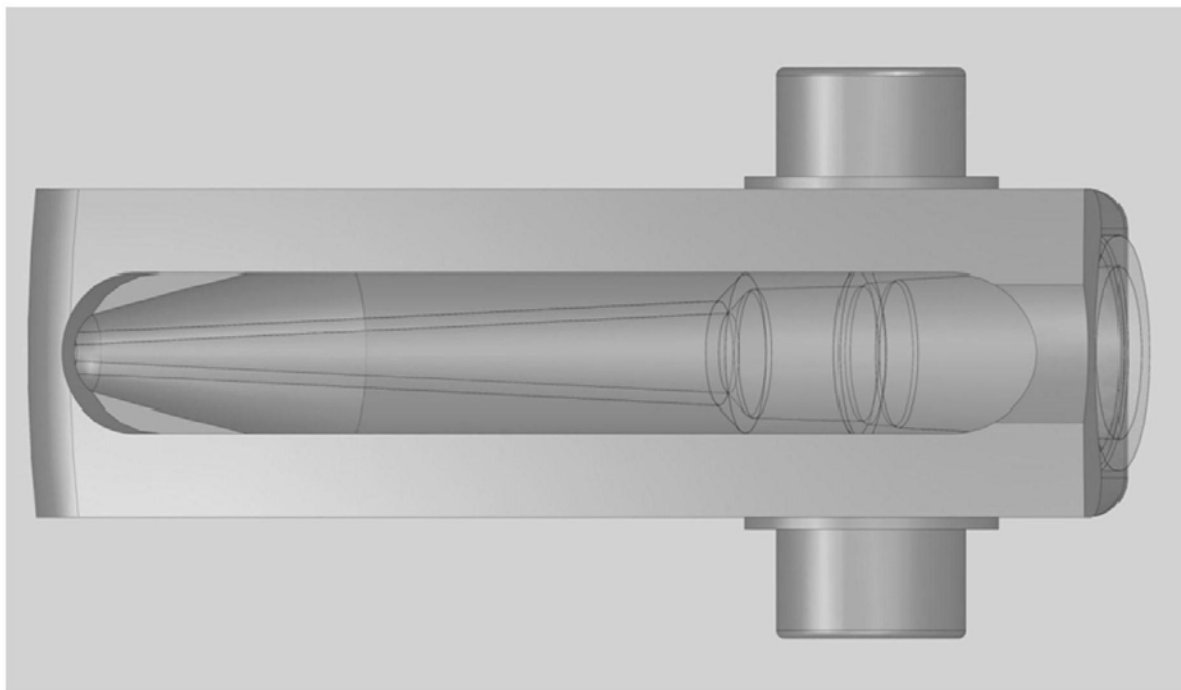


图113

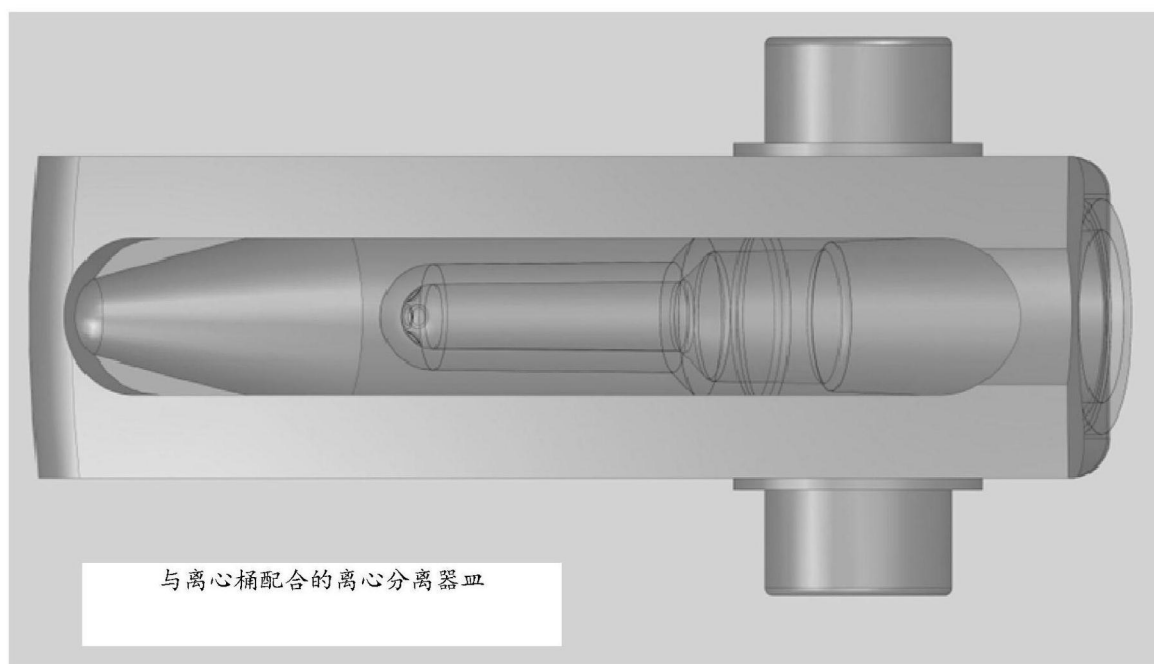


图114

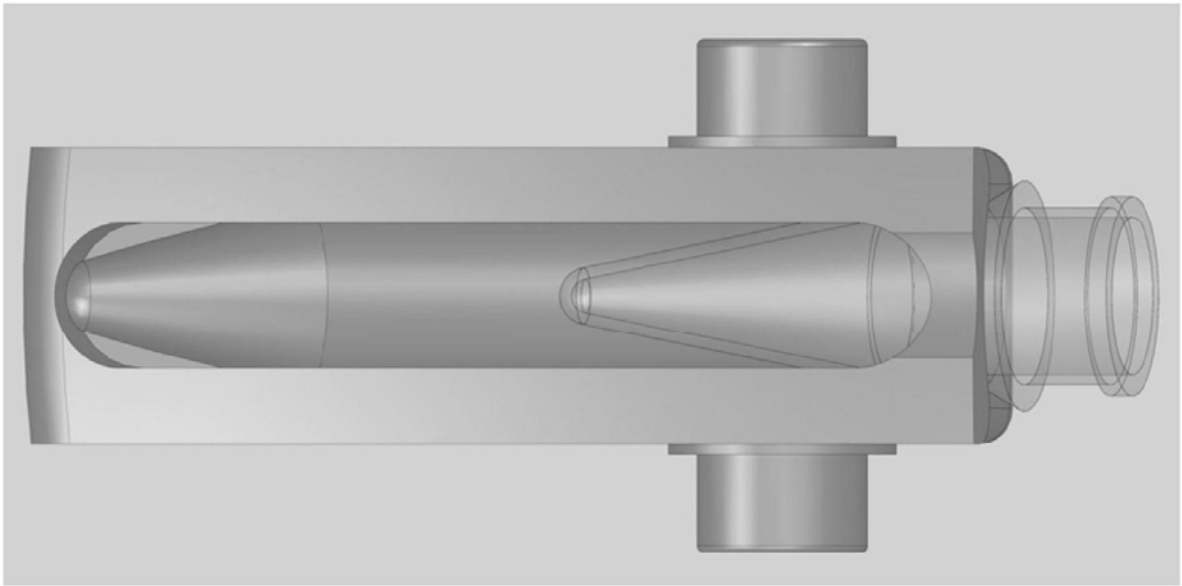


图115

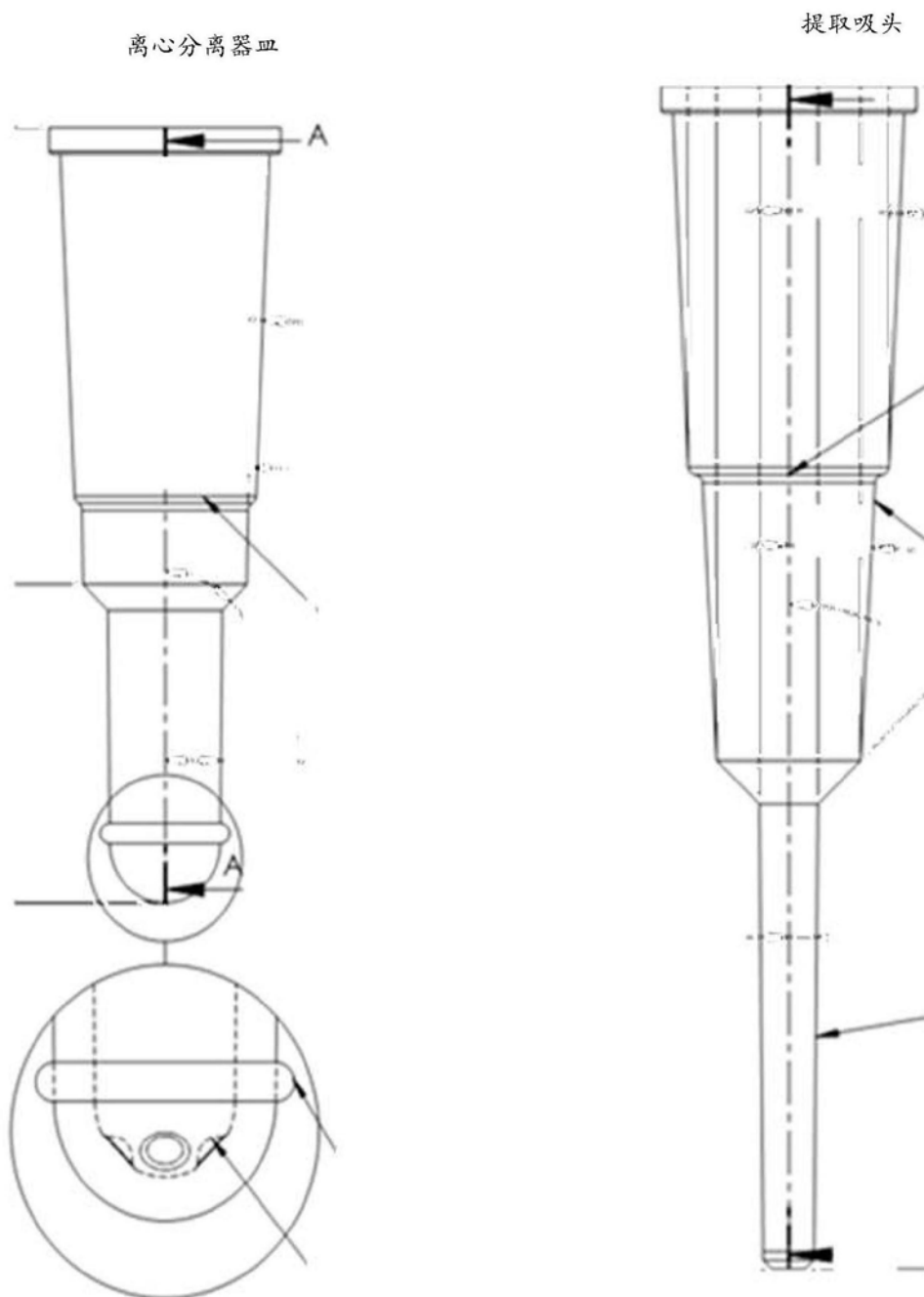


图116

离心分离器皿、提取吸头和喷嘴配合

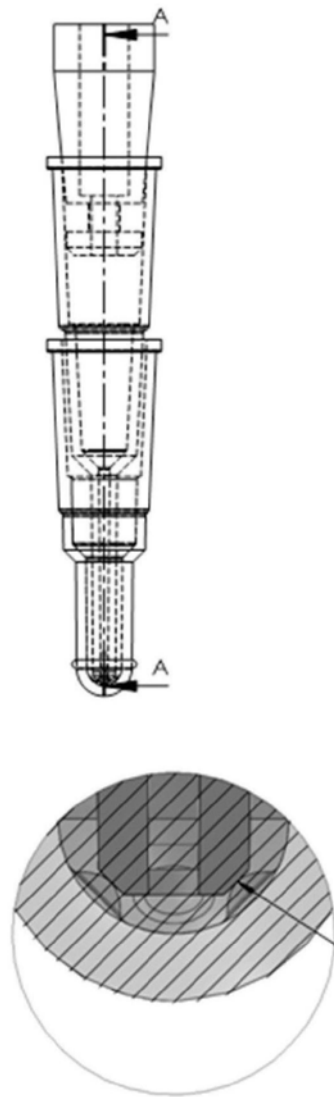


图117

## 离心分离器皿、提取吸头和喷嘴配合

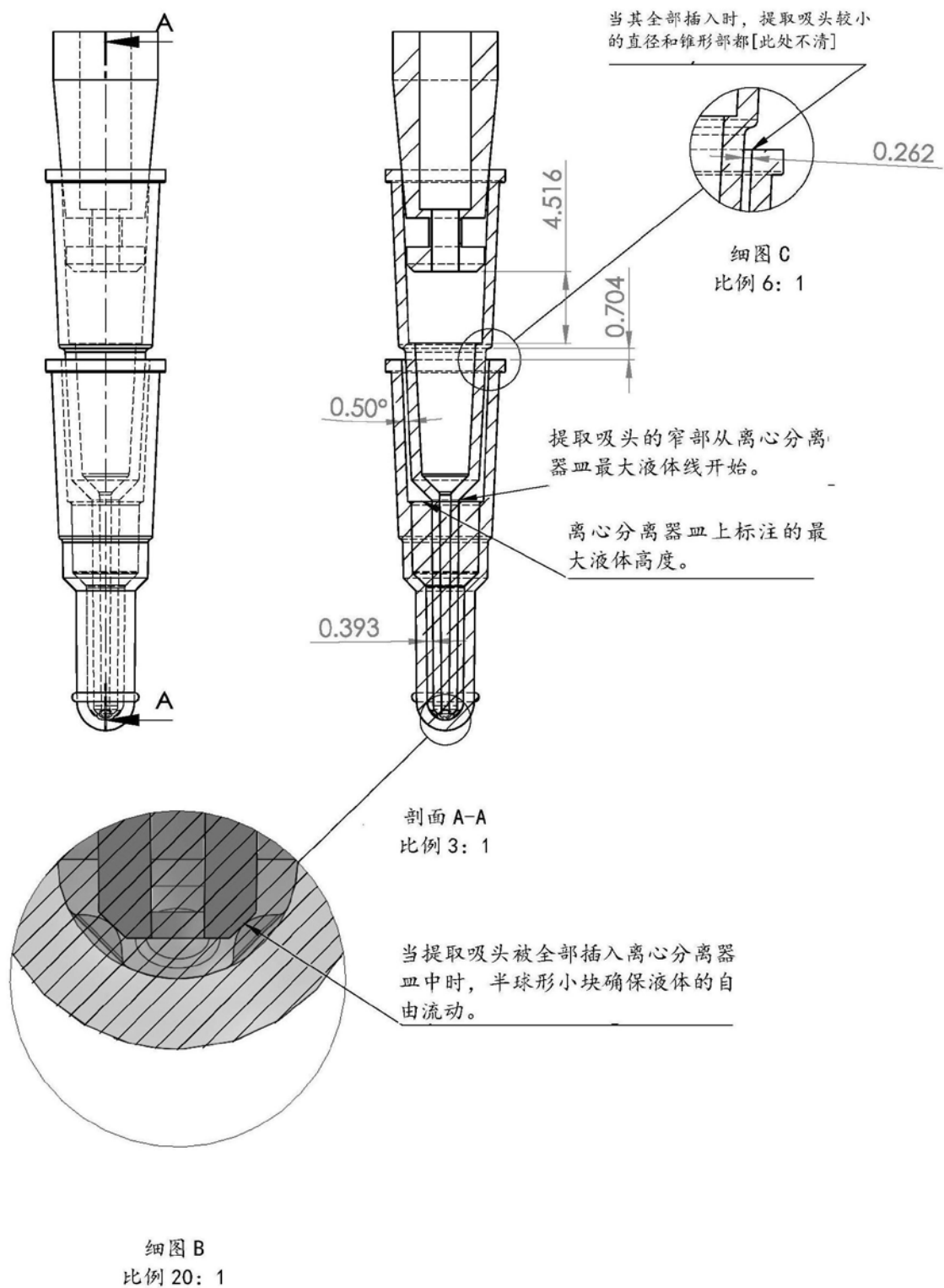


图118

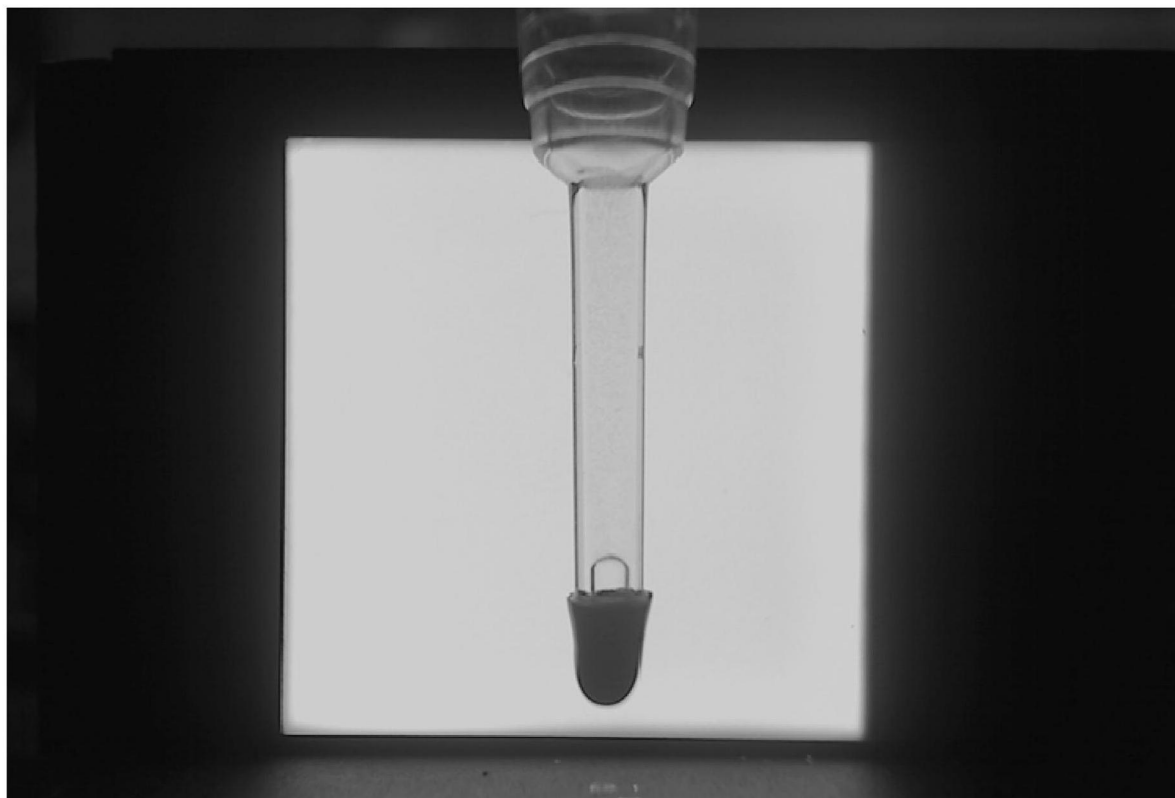


图119

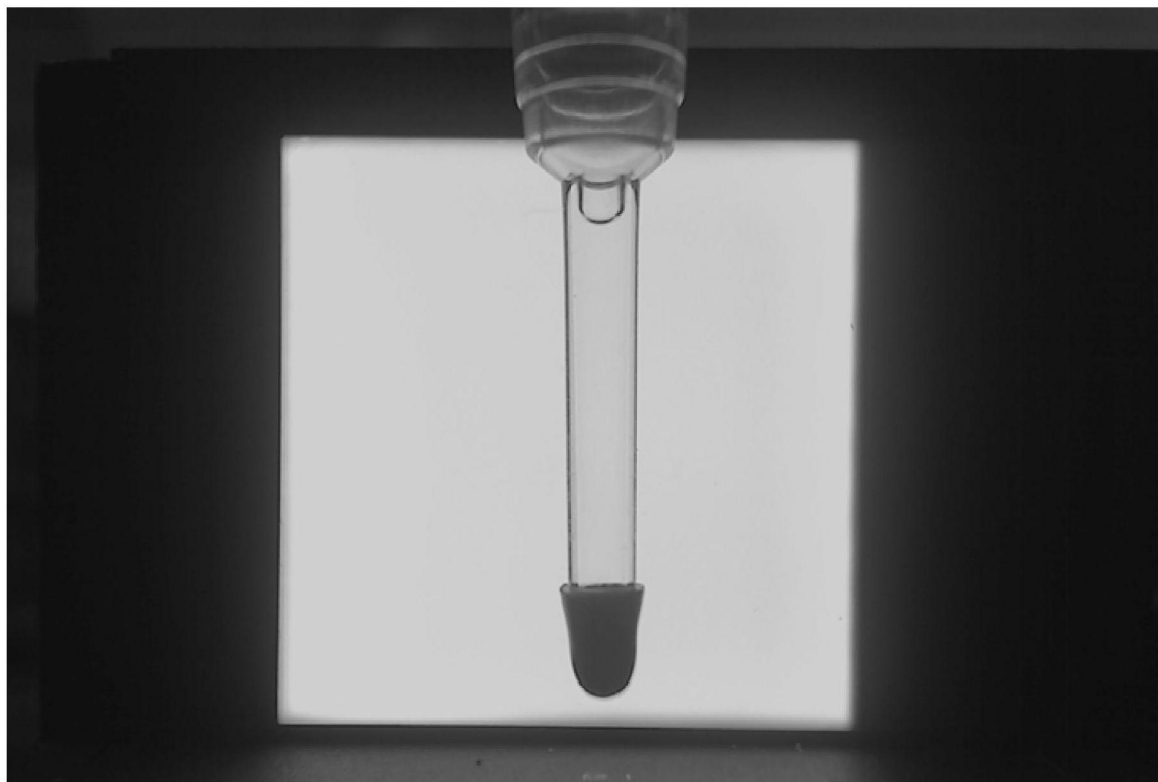


图120

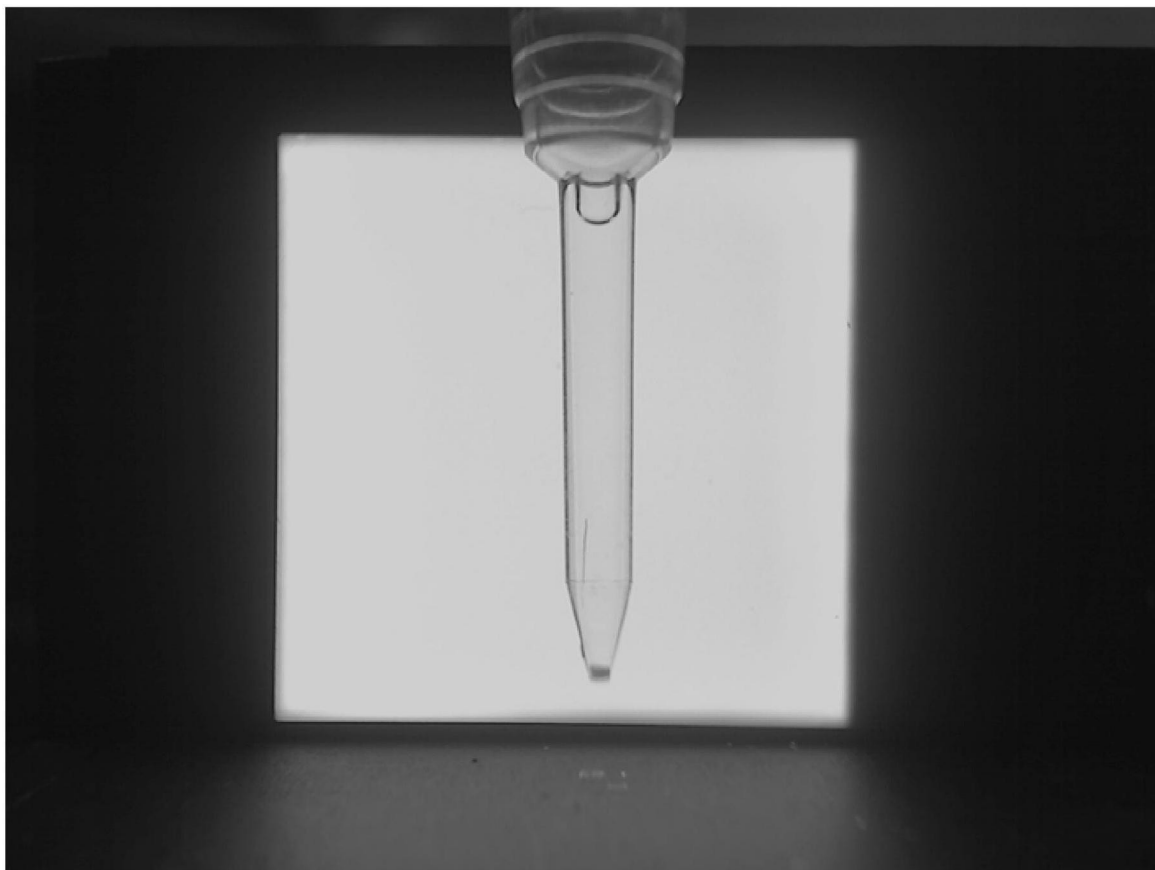
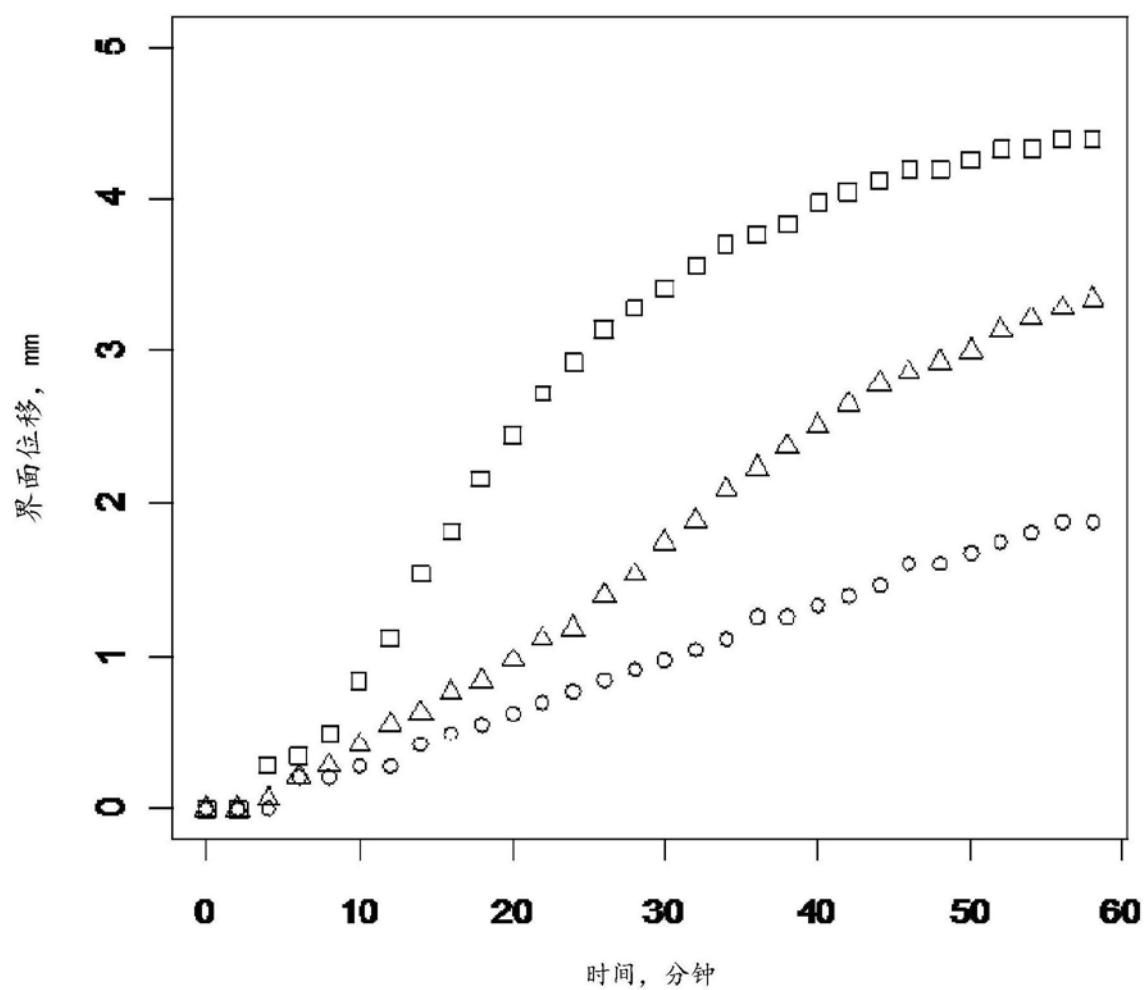


图121





图标:

符号	条件	ESR (mm/小时最大)
方框	桥本甲状腺炎	8.3
圆圈	全身性红斑狼疮	1.8
三角	类风湿关节炎	3.3

图122

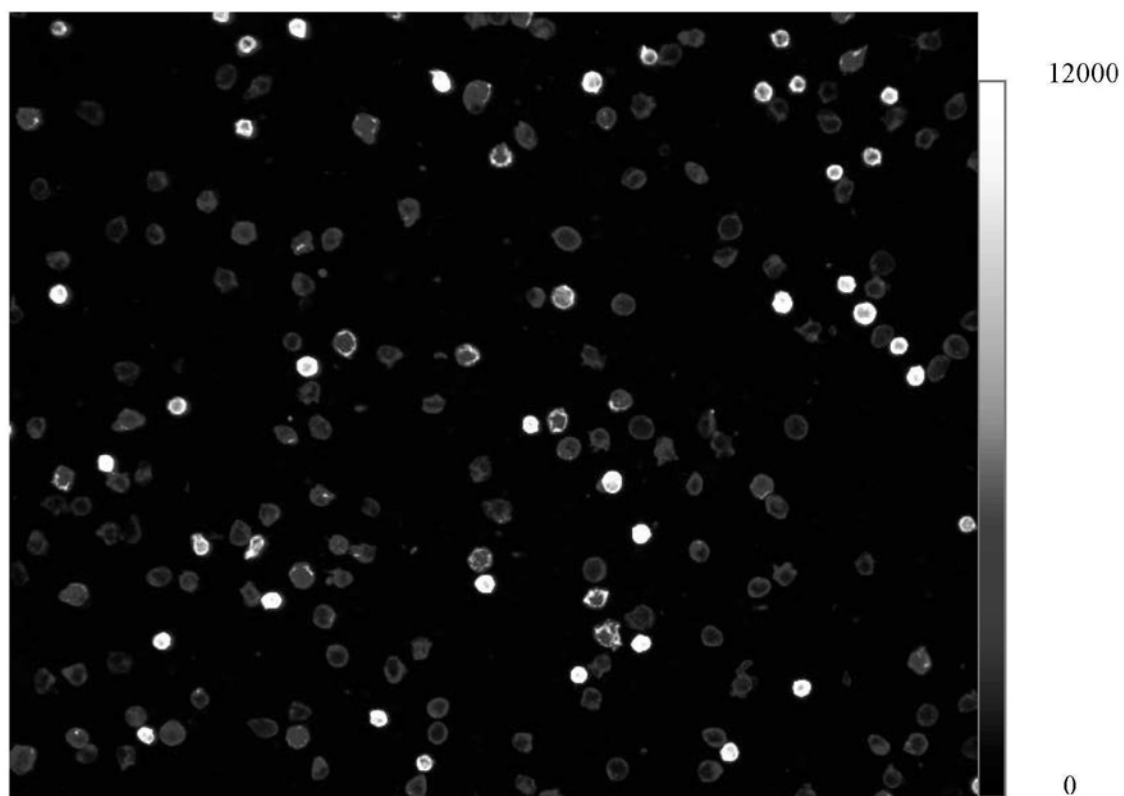


图123

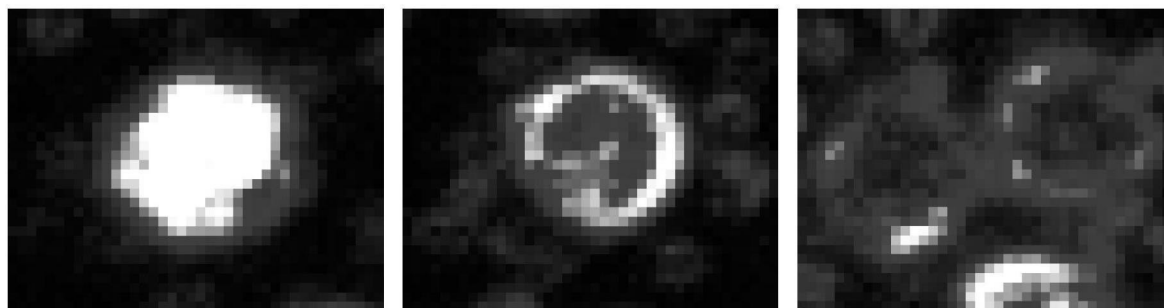


图124

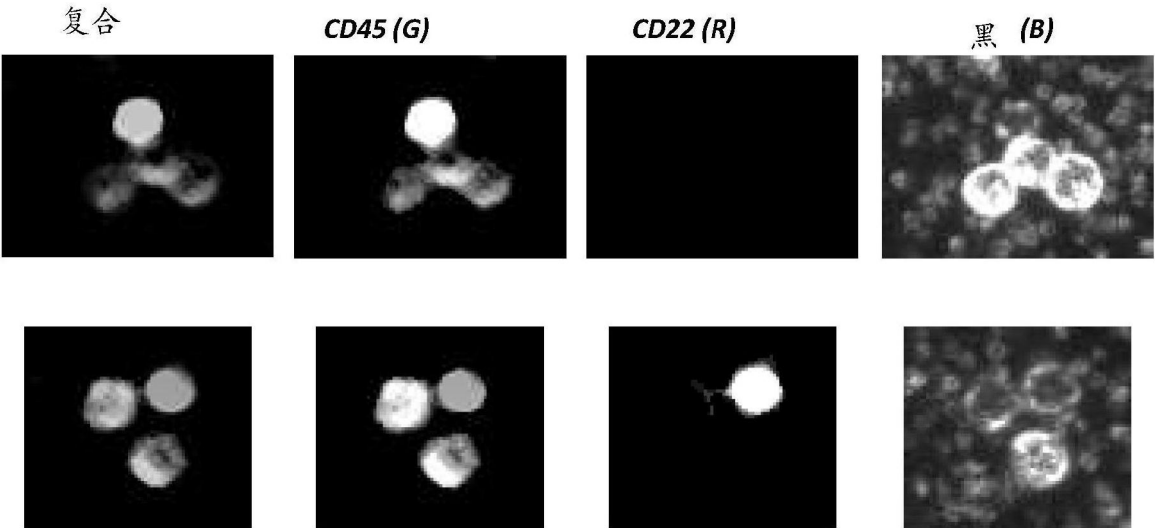


图125

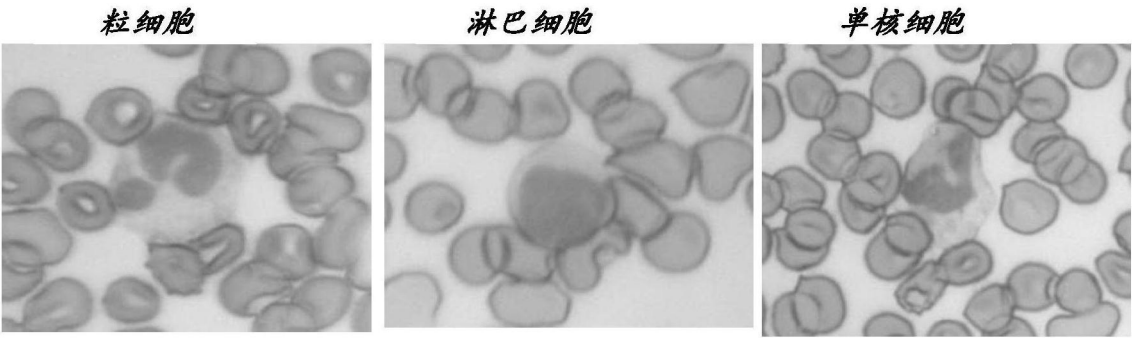


图126

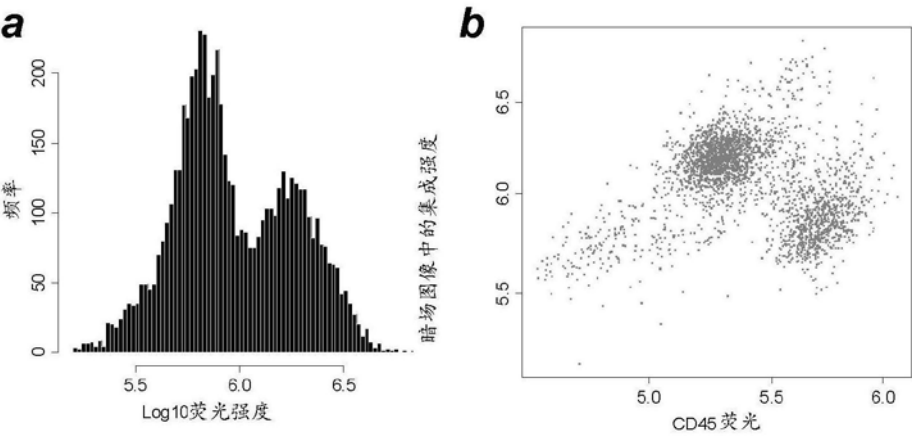


图127

像素强度分布

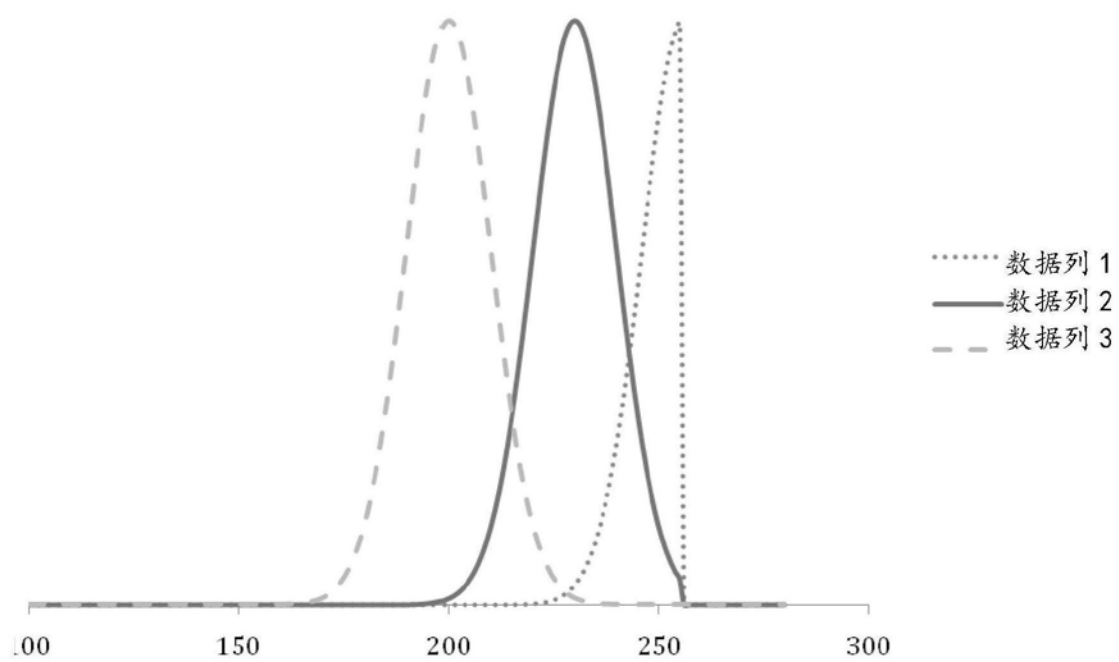


图128

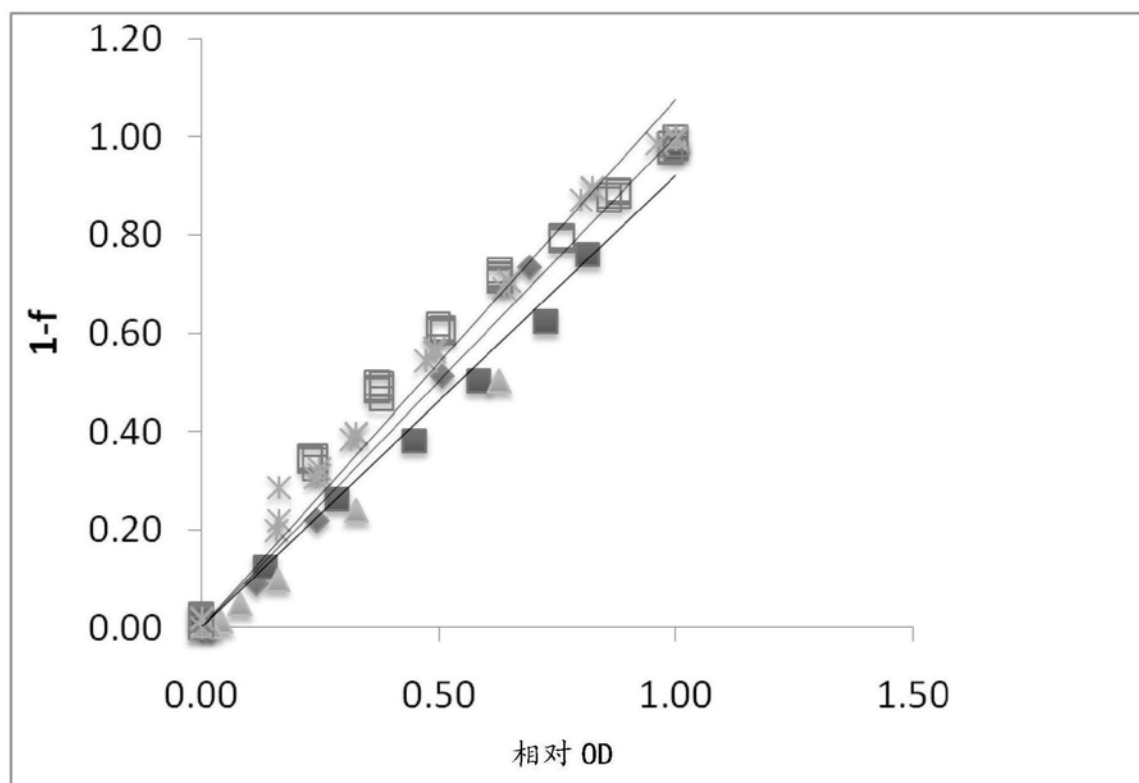


图129

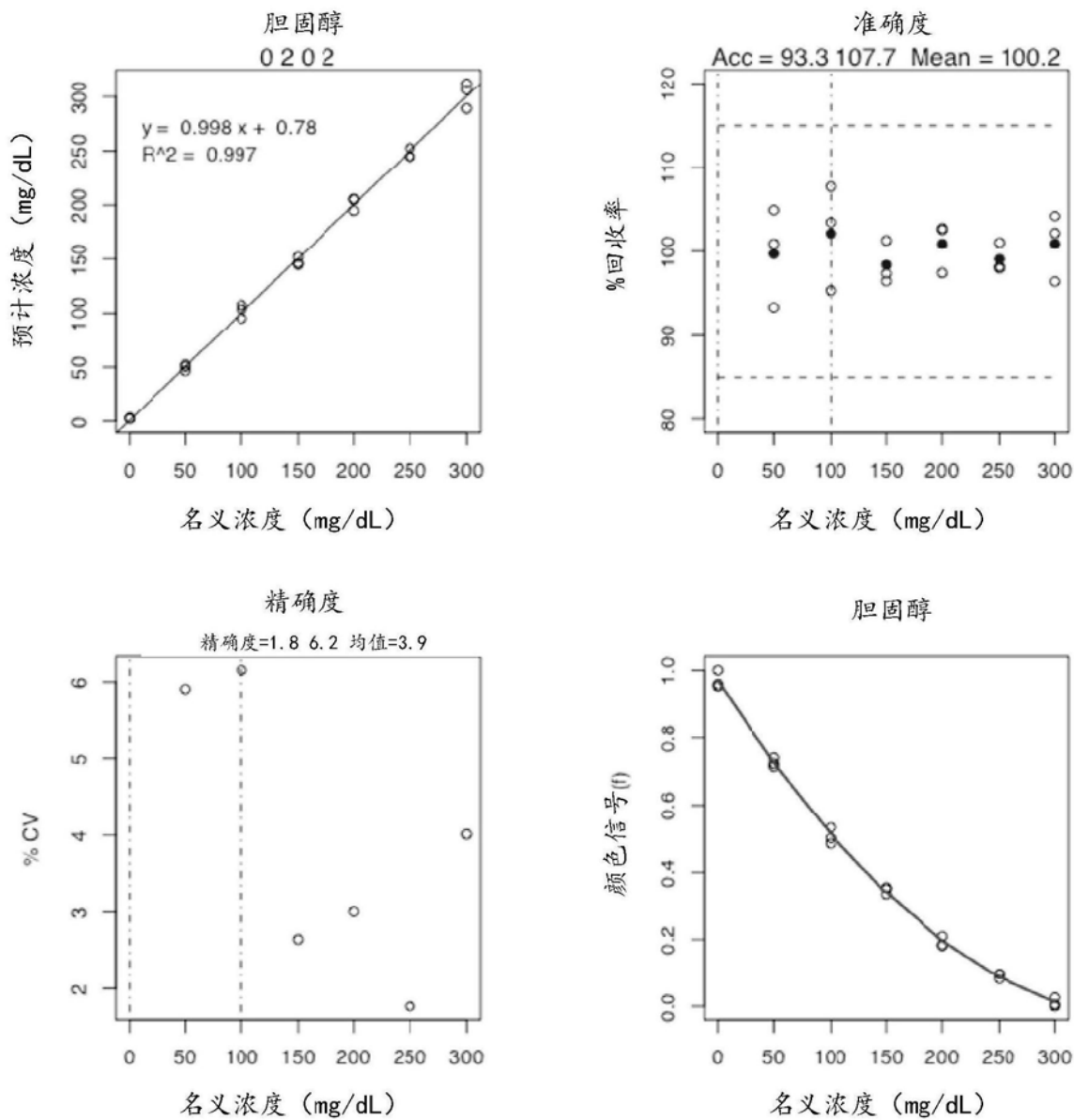
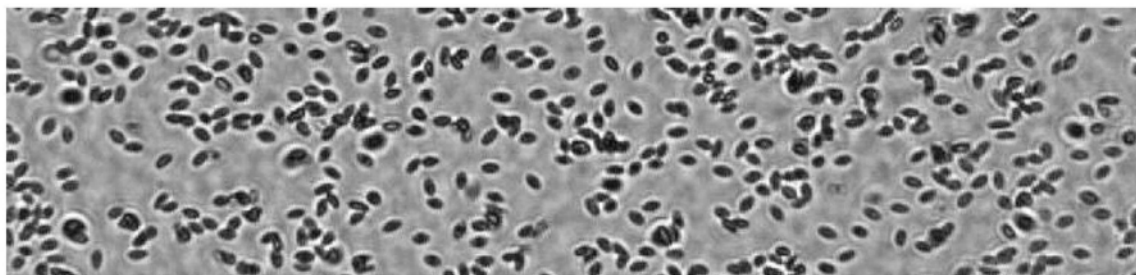
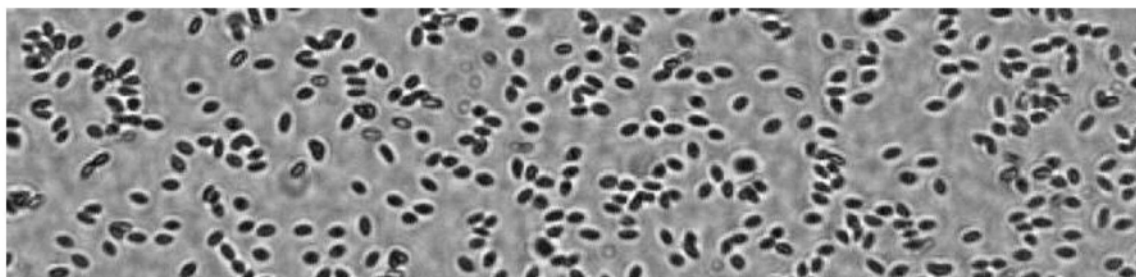


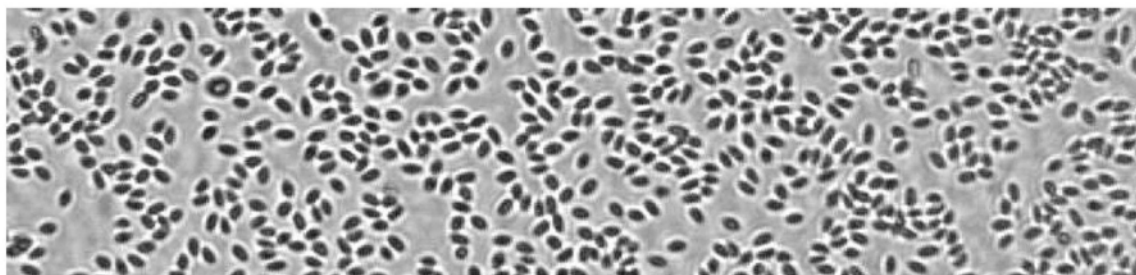
图130



样品 1-未凝聚（无病毒，无抗体）



样品 2-未凝聚样品（病毒和抗体）



样品 3-凝聚（病毒，无抗体）

图131

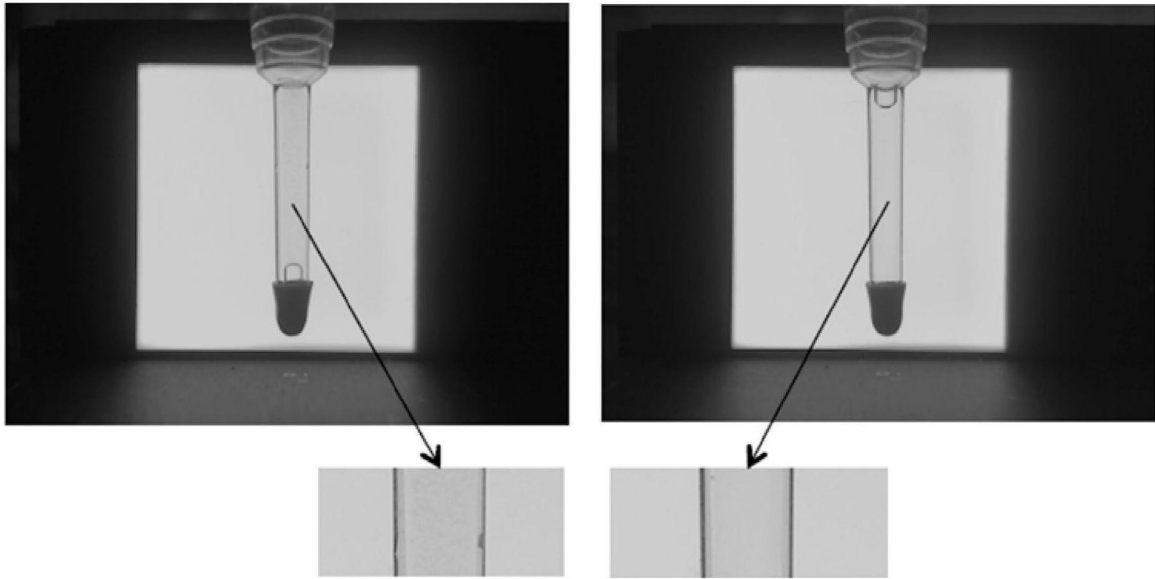


图132

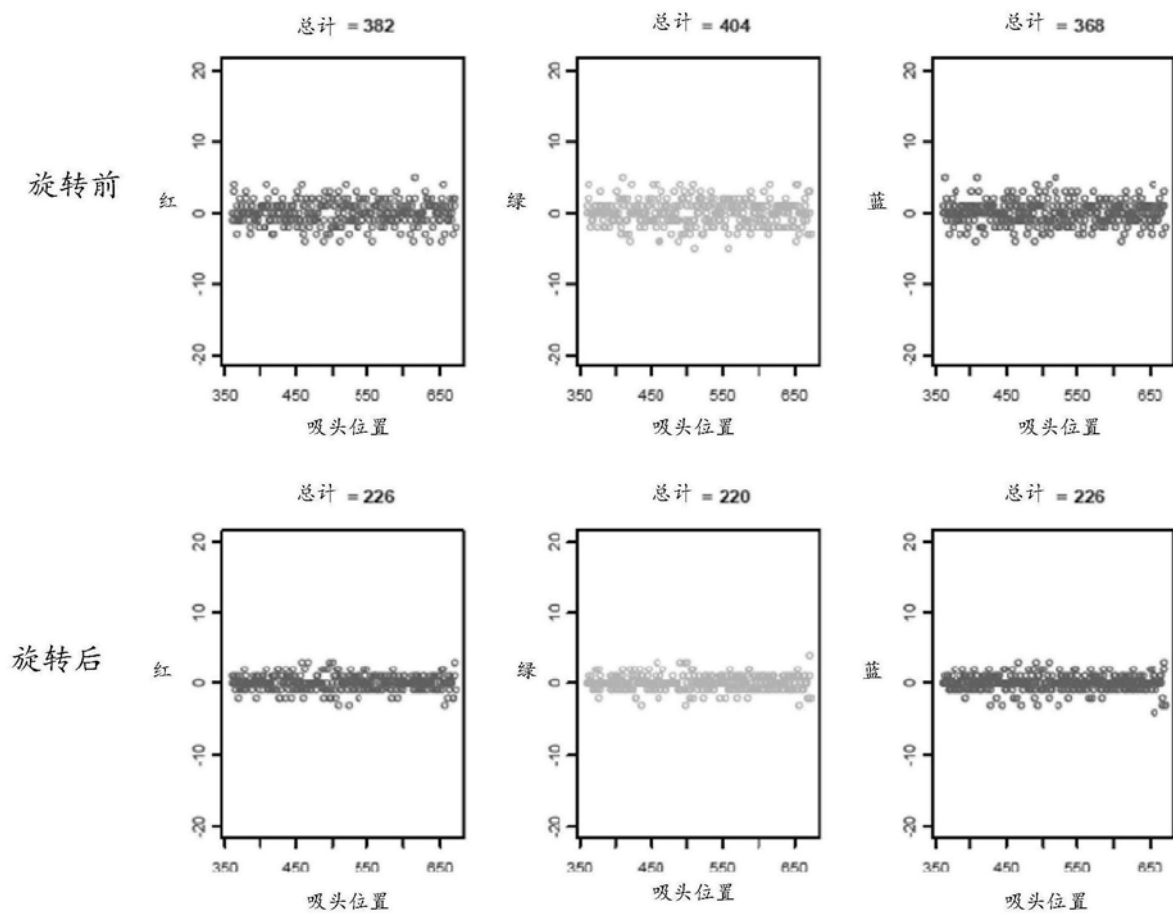


图133



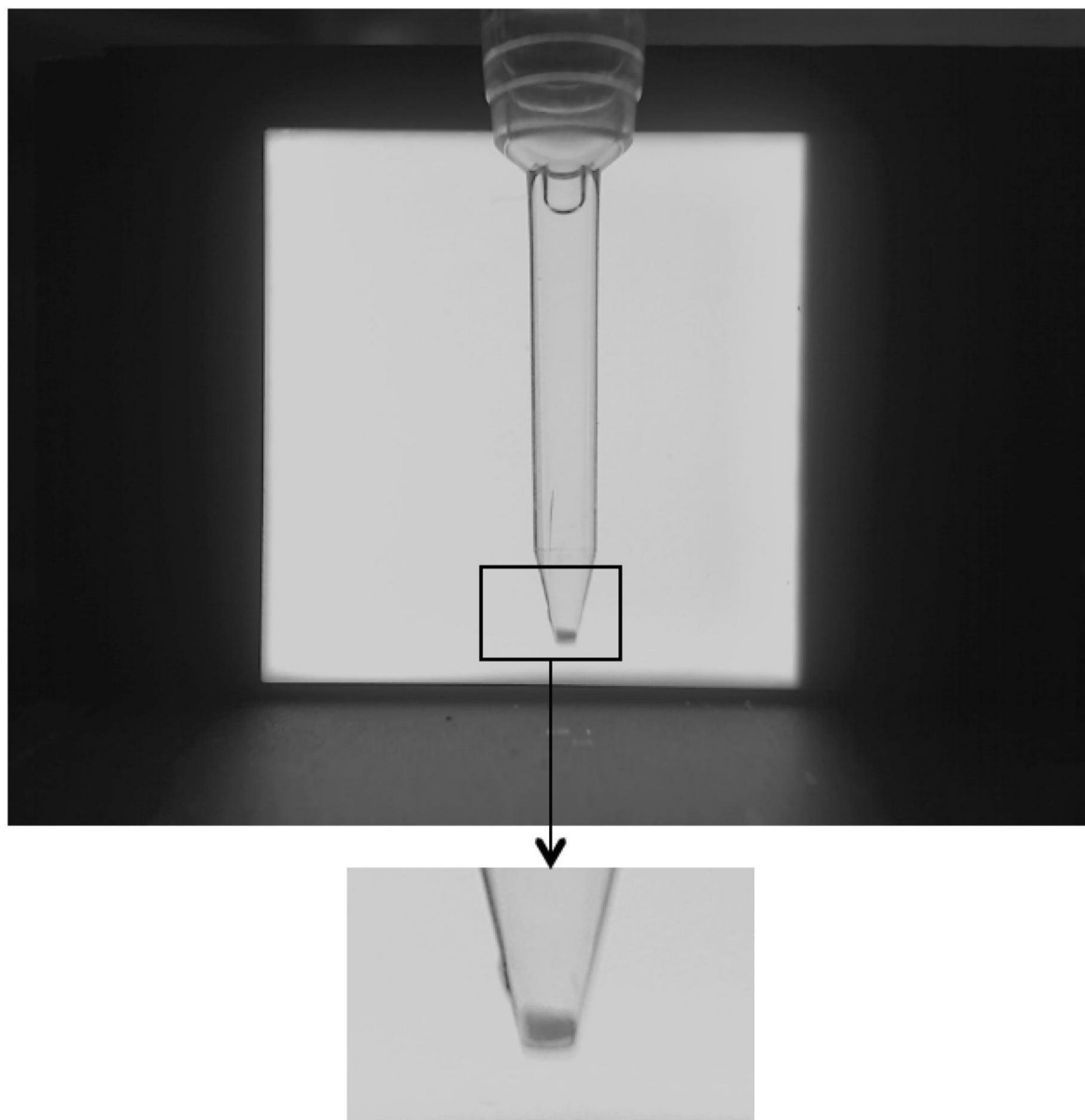


图134

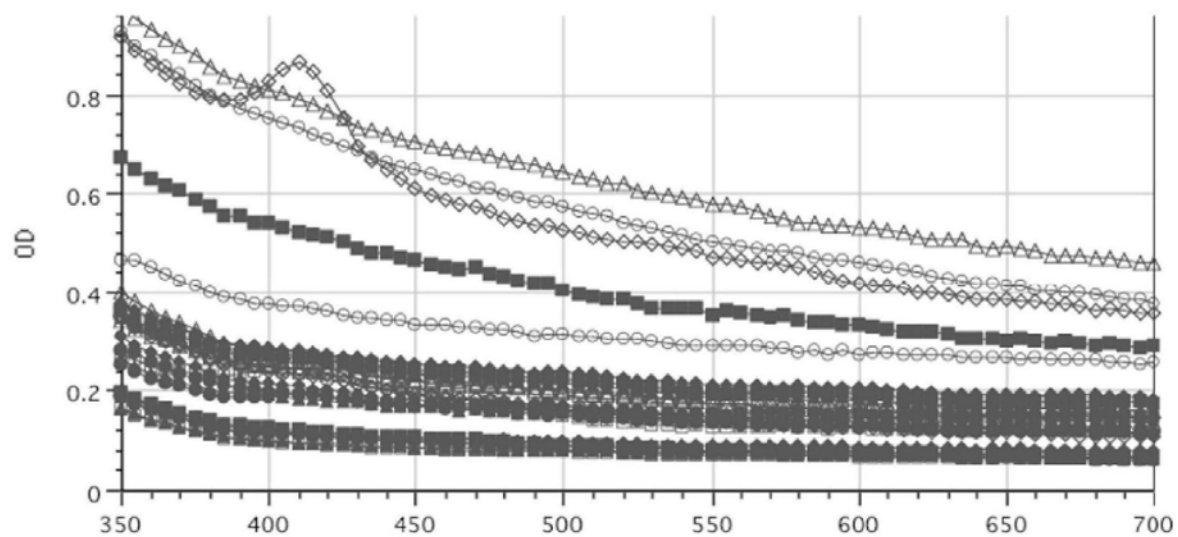


图135

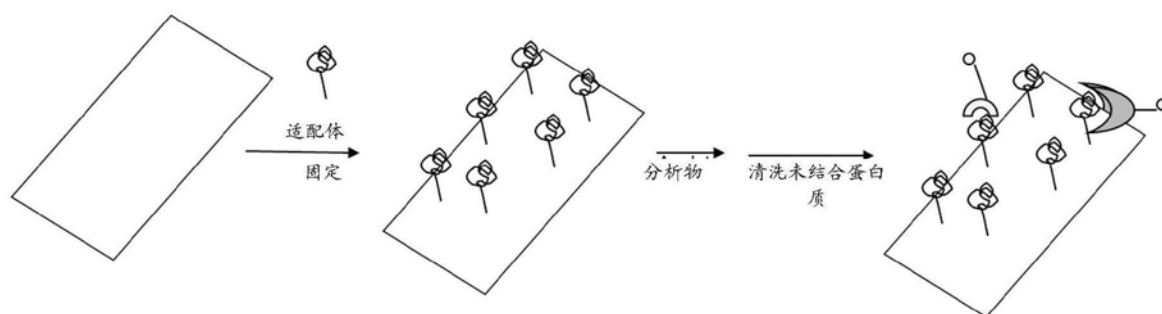


图136

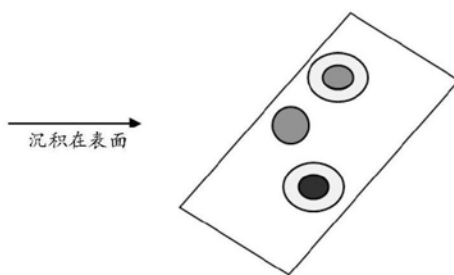
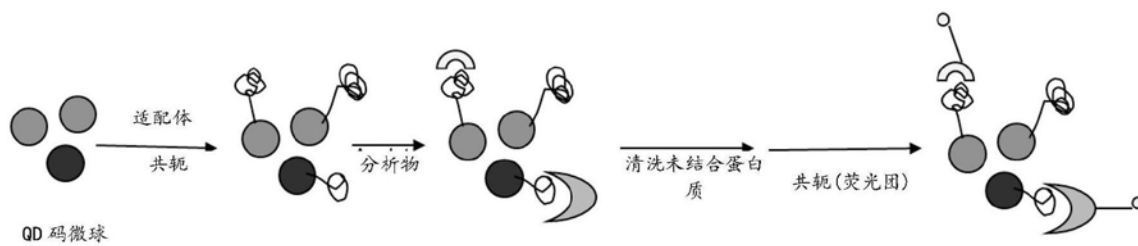


图137

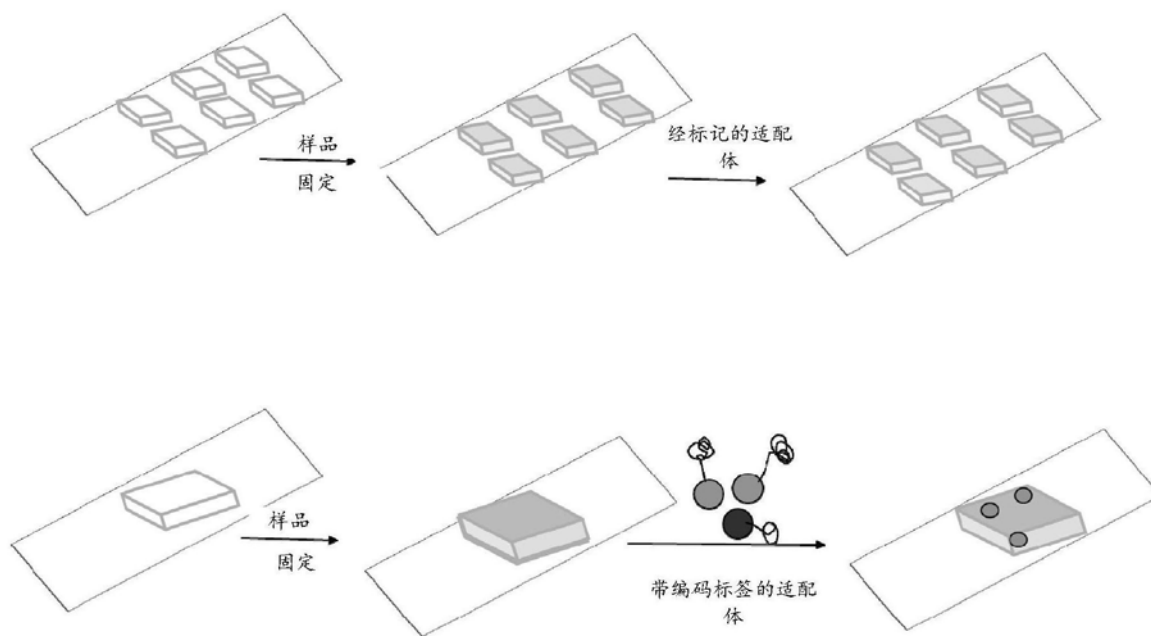


图138

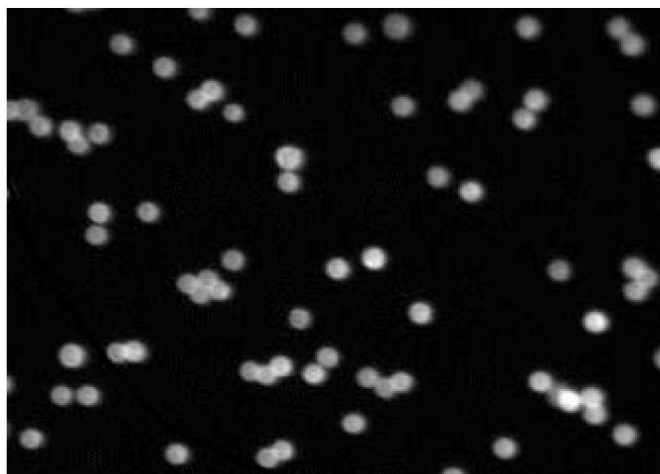


图139



图140



图141



图142

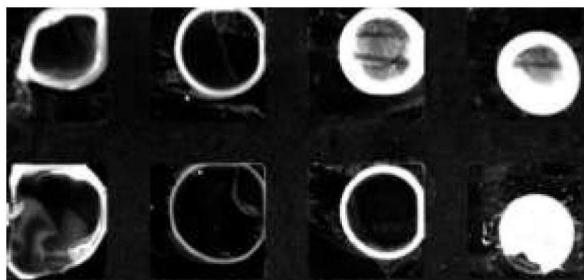


图143

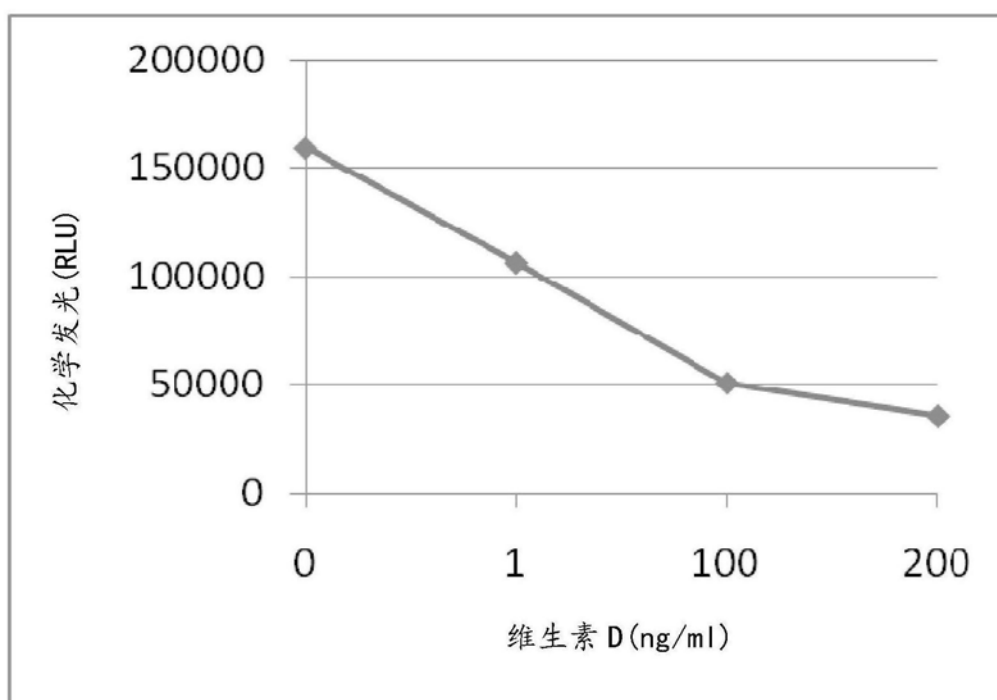


图144

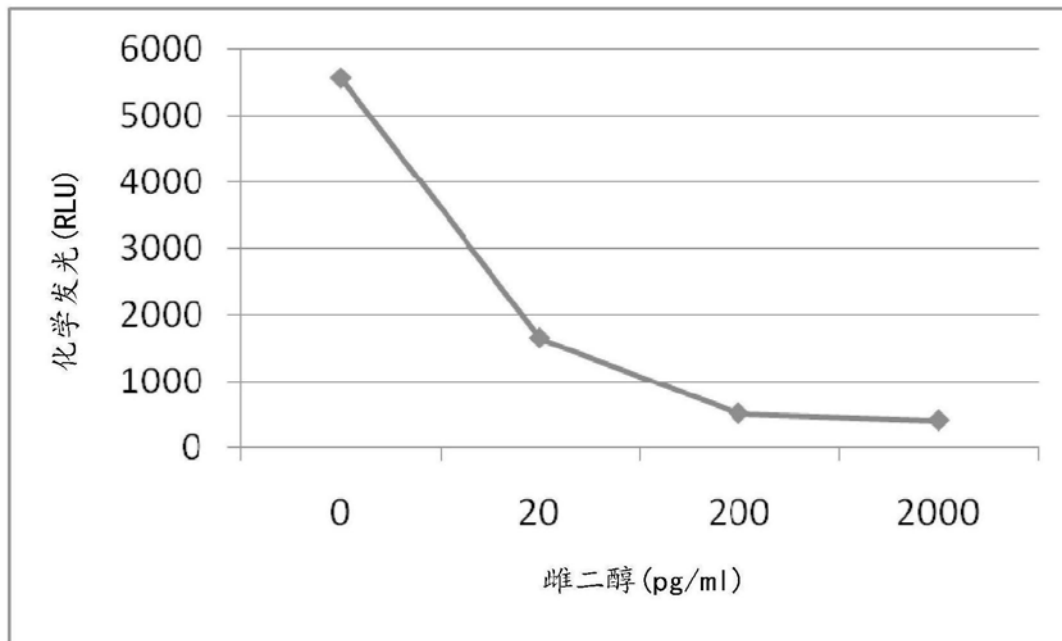


图145

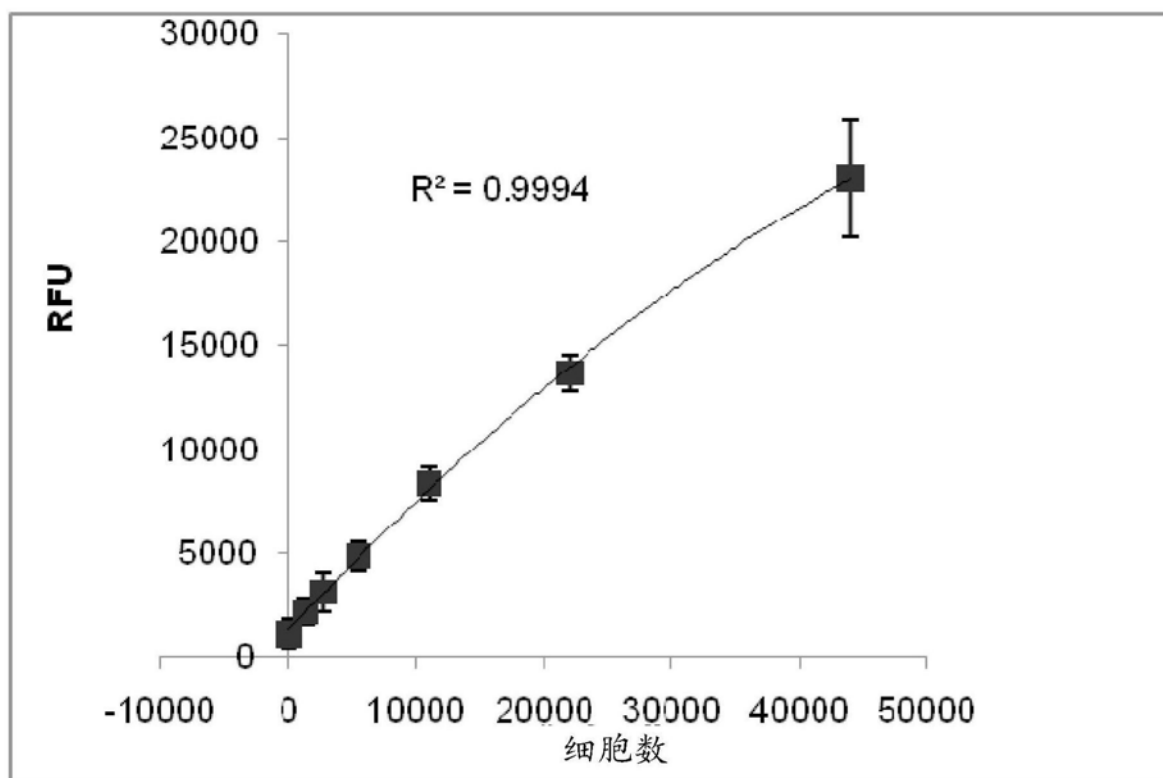


图146

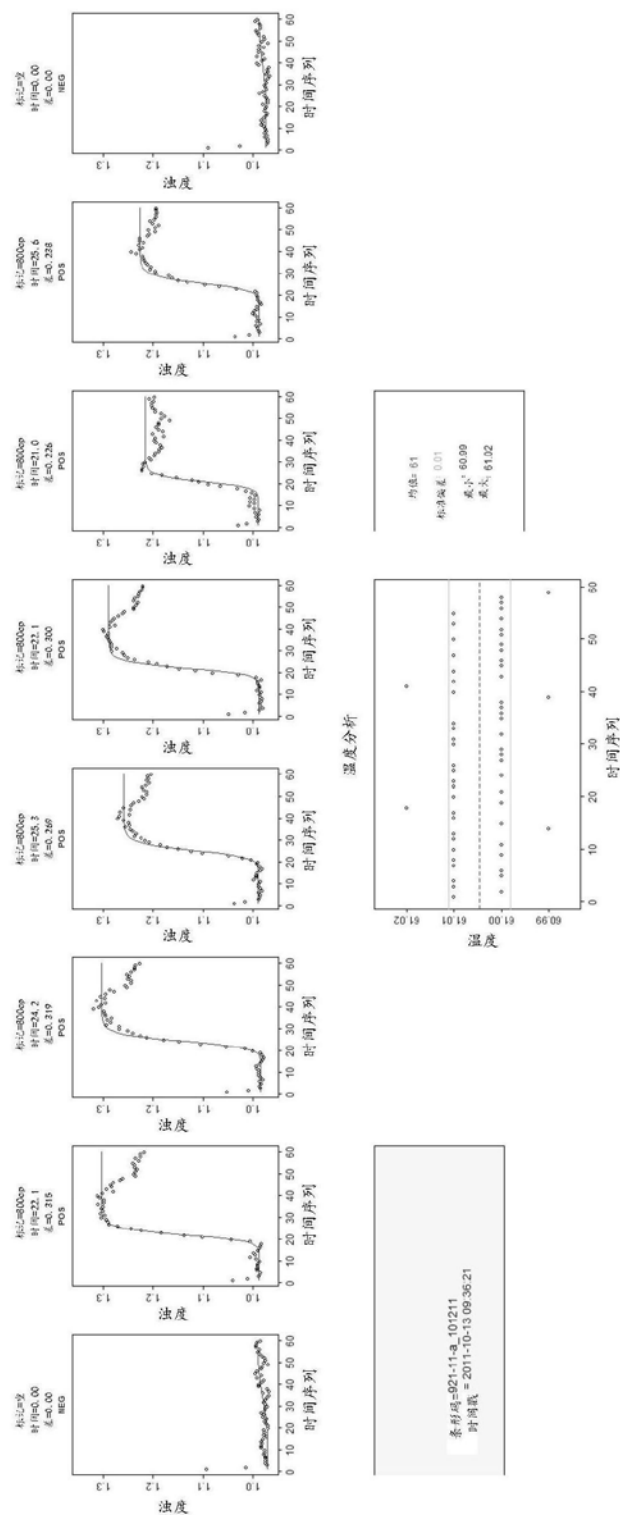


图147

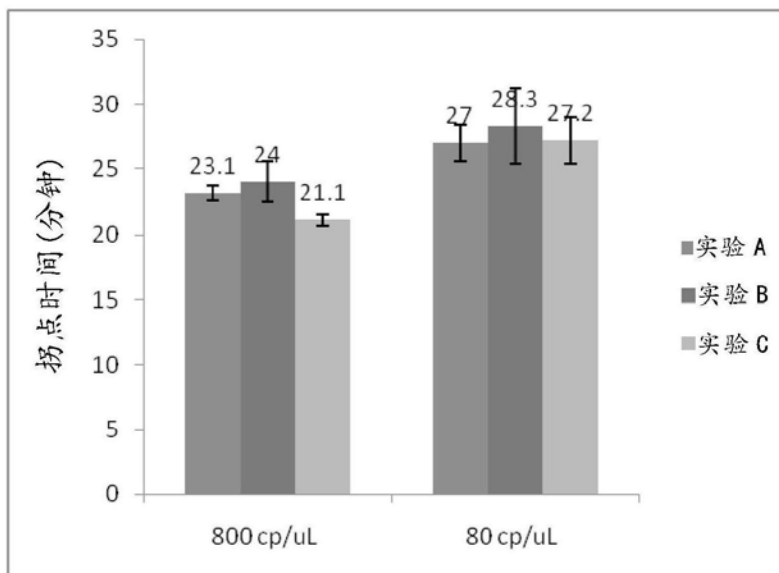


图148

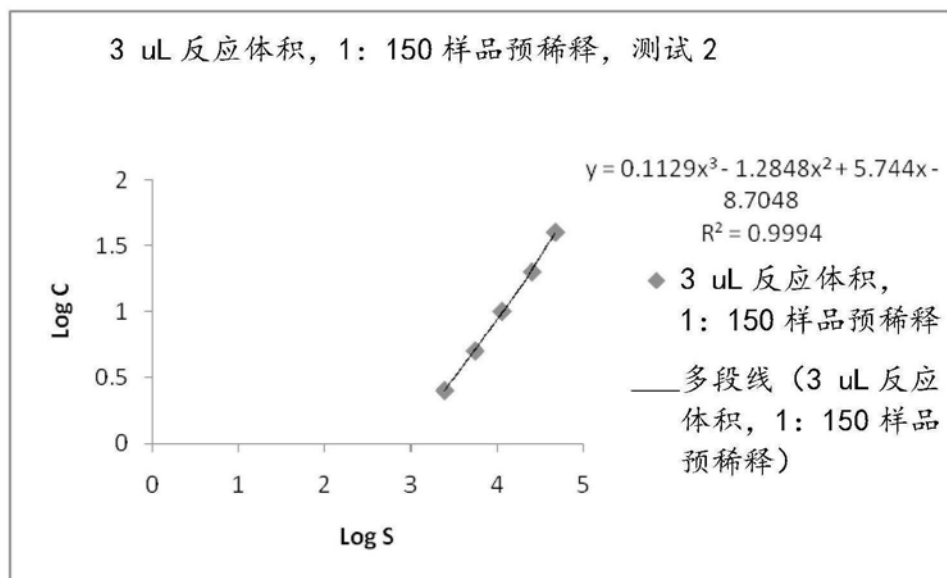


图149



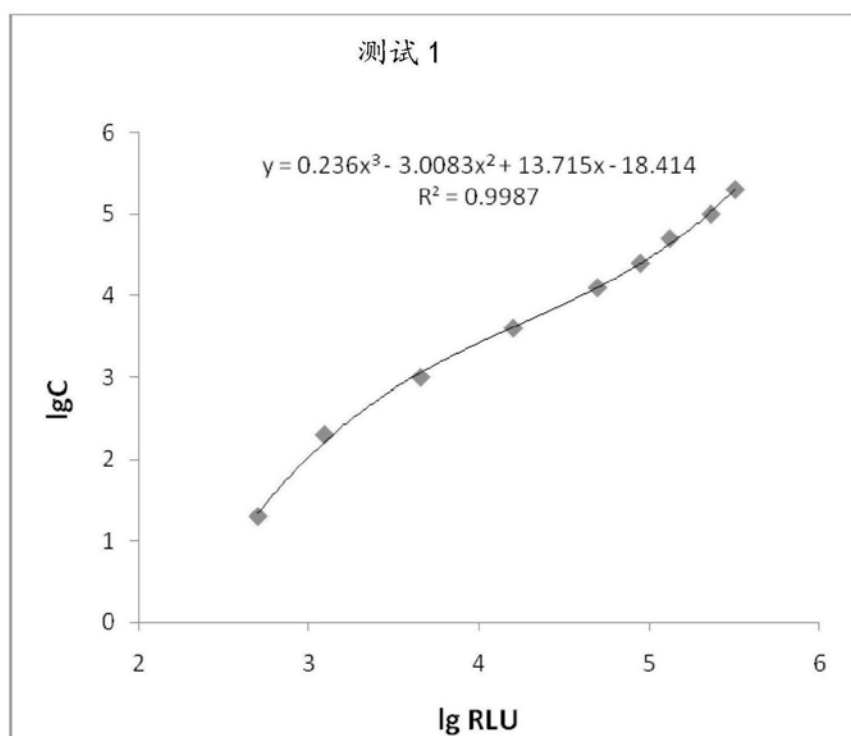


图150