



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 102762990 B

(45) 授权公告日 2014. 10. 29

(21) 申请号 201080061774. 5

(22) 申请日 2010. 11. 29

(30) 优先权数据

61/266, 907 2009. 12. 04 US

61/303, 938 2010. 02. 12 US

61/359, 310 2010. 06. 28 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2012. 07. 18

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2010/058242 2010. 11. 29

(87) PCT国际申请的公布数据

W02011/068764 EN 2011. 06. 09

(73) 专利权人 生命技术公司

地址 美国明尼苏达

(72) 发明人 G·卡达查克 M·D·沃德

J·A·布莱德弗德 A·T·G·帕克

(74) 专利代理机构 中国国际贸易促进委员会专

利商标事务所 11038

代理人 张阳

(51) Int. Cl.

G01N 35/08 (2006. 01)

G01N 33/483 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2009/0048805 A1, 2009. 02. 19, 说明书  
0014 段及图 7A.

US 2009/0048805 A1, 2009. 02. 19, 说明书  
0014 段及图 7A.

US 2009/0178716 A1, 2009. 07. 16, 说明书  
0040、0066、0074 段及图 7、9.

W0 2008/122051 A1, 2008. 10. 09, 全文.

US 2009/0158823 A1, 2009. 06. 25, 全文.

审查员 王奇云

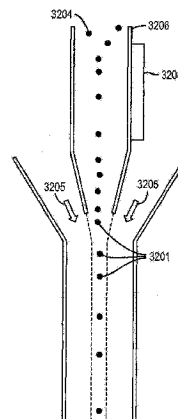
权利要求书2页 说明书24页 附图38页

(54) 发明名称

用于声学流式细胞计量术的装置、系统、方法和计算机可读介质

(57) 摘要

一种流式细胞计数器,包括:具有样本通道的毛细管;耦合到所述毛细管的至少一个振动产生换能器,所述至少一个振动产生换能器被配置成产生声信号,所述声信号引起所述样本通道内的声辐射压力以声学集中在所述样本通道中的流体样本流内流动的颗粒;以及具有紫光激光器和蓝光激光器的探测源,所述紫光激光器和所述蓝光激光器被配置成与经声学集中的颗粒的至少一些相互作用以产生输出信号。



1. 一种流式细胞计数器,包括:

包括样本通道的毛细管;

耦合至所述毛细管的至少一个振动产生换能器,所述至少一个振动产生换能器被配置成产生声信号,所述声信号引起所述样本通道内的声辐射压力以声学集中在所述样本通道中的流体样本流内流动的颗粒;

包括紫光激光器和蓝光激光器的探询源,所述紫光激光器和所述蓝光激光器被配置成与经声学集中的颗粒中的至少一些相互作用以产生输出信号;

光学模块,用于收集来自所述探询源的输出信号;

检测器模块,用于检测所述光学模块的输出信号;以及

数据采集模块,用于处理所述检测器模块的输出,

其中所述光学模块包括收集来自所述探询源的输出信号的收集透镜,并且其中所述收集透镜的输出用空间滤光针孔装置分成两个光束,其中第一光束是来自所述紫光激光器的输出而第二光束是来自所述蓝光激光器的输出。

2. 根据权利要求 1 所述的流式细胞计数器,其中所述至少一个振动产生换能器包括压电装置,所述紫光激光器具有大约 405 纳米的波长,并且所述蓝光激光器具有大约 488 纳米的波长。

3. 根据权利要求 1 所述的流式细胞计数器,其中所述毛细管还包括鞘流动通道,所述鞘流动通道被配置成在由所述声辐射压力引起的颗粒的声学集中的下游使鞘液围绕所述流体样本流流动以流体动力学地集中流体样本流内的所述经声学集中的颗粒。

4. 根据权利要求 3 所述的流式细胞计数器,包括第一泵和第二泵,所述第一泵被配置成使包括颗粒的流体样本在所述毛细管内的所述样本通道中以大约 200 微升每分钟至大约 1000 微升每分钟的样本流体输入速率流动,所述第二泵被配置成使鞘液在所述毛细管的鞘流动通道中以大约 2200 微升每分钟至大约 1400 微升每分钟的鞘液输入速率流动,所述第一泵和所述第二泵被配置成保持在所述毛细管中流动的样本流体和鞘液的总输入速率恒定以保证所述经声学集中的颗粒的至少一些通过所述紫光激光器和所述蓝光激光器的探询时间保持恒定,而与所述样本流体输入速率无关。

5. 根据权利要求 1 所述的流式细胞计数器,包括处理器,所述处理器被配置成控制所述至少一个振动产生换能器、所述检测器模块和所述数据采集模块中的至少一个。

6. 根据权利要求 1 所述的流式细胞计数器,包括在所述毛细管和所述光学模块之间的阻挡杆。

7. 根据权利要求 6 所述的流式细胞计数器,其中所述阻挡杆附连到大致圆柱形的销柱,所述销柱可旋转以定位所述阻挡杆并且调节所述探询源的输出信号的输出孔径。

8. 根据权利要求 7 所述的流式细胞计数器,其中所述探询源的输出信号的输出孔径在大约 17 度至大约 21 度之间。

9. 根据权利要求 1 所述的流式细胞计数器,其中所述检测器模块包括检测器,所述检测器检测来自所述紫光激光器输出的所述第一光束的前向散射信号和侧向散射信号。

10. 一种流式细胞计数器,包括:

毛细管,被配置成允许包括颗粒的样本流体在其中流动;

第一聚焦机构,被配置成将所述样本流体中的所述颗粒的至少一些声学聚焦在所述毛

细管内的第一区域中；

第二聚焦机构，被配置成将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体流体动力学地聚焦在所述毛细管内处于第一区域下游的第二区域中；

在所述毛细管中或下游的探询区，经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒中的至少一些能够流动通过所述探询区；

至少一个检测器，被配置成检测在所述探询区获得的关于所述经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒的至少一些的信号；

光学模块，用于收集所述至少一个信号；

检测器模块，用于检测所述光学模块的输出信号；以及

数据采集模块，用于处理所述检测器模块的输出，

其中所述光学模块包括收集来自所述探询源的输出信号的收集透镜，并且其中所述收集透镜的输出用空间滤光针孔装置分成两个光束，其中第一光束是来自所述紫光激光器的输出而第二光束是来自所述蓝光激光器的输出。

11. 根据权利要求 10 所述的流式细胞计数器，包括样本流体泵和鞘液泵，所述样本流体泵被配置成使样本流体以大约 25 微升每分钟至大约 1000 微升每分钟之间的样本流速流入所述毛细管，所述鞘液泵被配置成使鞘液以大约 2375 微升每分钟至大约 1400 微升每分钟之间的鞘流速流入所述毛细管。

12. 根据权利要求 11 所述的流式细胞计数器，其中所述第一聚焦机构被配置成将所述第一区域中的经声学聚焦的颗粒的至少一些聚焦到从所述第一区域流动到所述第二区域的单行线，并且其中所述样本流体泵和所述鞘液泵被配置成保持在所述毛细管中流动的样本流体和鞘液的总速率恒定以保证经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒的所述至少一些通过所述探询区的探询时间保持恒定，而与所述样本流速无关。

13. 根据权利要求 10 所述的流式细胞计数器，包括样本流体泵和鞘液泵，所述样本流体泵被配置成使样本流体以大约 200 微升每分钟至大约 1000 微升每分钟之间的样本流速流入所述毛细管，所述鞘液泵被配置成使鞘液以大约 2200 微升每分钟至大约 1400 微升每分钟之间的鞘流速流入所述毛细管。

## 用于声学流式细胞计量术的装置、系统、方法和计算机可读介质

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2009 年 12 月 4 日提交的美国临时申请第 61/266,907 号、于 2010 年 2 月 12 日提交的美国临时申请第 61/303,938 号以及于 2010 年 6 月 28 日提交的美国临时申请第 61/359,310 号的优先权,上述每一申请的全部内容通过引用被合并于本文中。

### 技术领域

[0003] 本申请一般地涉及流式细胞计量术,尤其涉及使用声学流式细胞计量术检测罕见事件的装置、系统、方法和计算机可读介质。

### 背景技术

[0004] 在传统流式细胞计量术中,通过使鞘液以极高的容积流率(大约是样本流体的容积流率的 100-1000 倍)围绕样本流体流动而将样本流体聚焦到大约 10-50  $\mu\text{m}$  的小核心直径。样本流体中的颗粒以极快的线速度(以米/秒的数量级)流动并且因此仅需要极短的时间穿过探测点(通常仅 1-10  $\mu\text{s}$ )。这具有明显的缺点。首先,颗粒不能被重定向到探测点,原因是流动不能被反向。其次,颗粒不能保持在探测点,原因是在没有鞘液的情况下聚焦丢失。再次,较短的通过时间限制了灵敏度和分辨率,这导致罕见事件检测困难并且耗时。

[0005] 解决这些缺点的以前尝试不令人满意。可以增加样本流体中的颗粒浓度以补偿这些缺点中的一些,但是这可能不总是可行的并且可能是成本很高的。同样地,可以增加探测点处的光子通量以提取更多的信号,但是这可能常常光漂白(即,激发到非辐射状态)用于生成信号的荧光团并且可能增加背景瑞利散射、拉曼散射和荧光。因此,需要用于流式细胞计量术的新装置、系统、方法和计算机可读介质,其在避免或最小化这些缺点中的一个或多个的同时,允许颗粒的高吞吐量分析以及快速高效的罕见事件检测。

### 发明内容

[0006] 根据在本申请中具体化的原理,提供了用于流式细胞计量术的新装置、系统、方法和计算机可读介质,其在避免或最小化这些缺点中的一个或多个的同时,允许颗粒的高吞吐量分析以及快速高效的罕见事件检测。

[0007] 根据本发明的实施例,提供了一种流式细胞计数器,其包括:(1)包括样本通道的毛细管;(2)耦合至所述毛细管的至少一个振动产生换能器,所述至少一个振动产生换能器被配置成产生声信号,所述声信号引起所述样本通道内的声辐射压力以声学地集中在所述样本通道中的流体样本流内流动的颗粒;以及(3)包括紫光激光器和蓝光激光器的探测源,所述紫光激光器和所述蓝光激光器被配置成与所述经声学集中的颗粒中的至少一些相互作用以产生输出信号。

[0008] 根据本发明的另一个实施例,提供了一种流式细胞计数器,其包括:(1)毛细管,被配置成允许包括颗粒的样本流体在其中流动;(2)第一聚焦机构,被配置成将所述样本

流体中的所述颗粒中的至少一些声学聚焦在所述毛细管内的第一区域中；(3) 第二聚焦机构，被配置成将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体流体动力学地聚焦在所述毛细管内位于所述第一区域下游的第二区域中；(4) 在所述毛细管中或下游的探询区，所述经声学 and 流体动力学聚焦颗粒中的至少一些可以流动通过所述探询区；以及(5) 至少一个检测器，被配置成检测在所述探询区获得的关于所述经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒中的至少一些至少一个信号。

[0009] 根据本发明的另一个实施例，提供了一种使用流式细胞计数器检测罕见事件的方法，包括：(1) 使包括颗粒的样本流体流入通道；(2) 通过将声辐射压力施加到包含在所述通道内的第一区域而将所述样本流体中的所述颗粒的至少一些声学聚焦在所述第一区域中；(3) 通过使鞘液围绕所述样本流体流动而将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体流体动力学地聚焦在位于所述第一区域下游的第二区域中；(4) 调节所述鞘液与所述样本流体的容积比以保持位于所述第二区域内或下游的探询区中的大致恒定的总颗粒速度；(5) 分析所述探询区中的所述经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒中的至少一些；以及(6) 基于在所述探询区检测到的至少一个信号检测一个或多个罕见事件，所述一个或多个罕见事件选自下列：一个或多个罕见荧光事件、一个或多个罕见细胞类型以及一个或多个死亡细胞。

[0010] 在附图和以下描述中阐述了本发明的这些和其它实施例的附加细节，其仅仅是示例性的和解释性的并且不以任何方式限制本发明。本发明的其它实施例、特征、目的和优点将从描述和附图并且从权利要求中显见。

## 附图说明

[0011] 包含在说明书中并且形成说明书的一部分的附图示出了本发明的一个或多个实施例，并且与描述一起用于解释本发明的各实施例的原理。附图仅仅是示例性的和解释性的并且不应当被理解为以任何方式限制或约束本发明。

[0012] 图 1 示出了平面和线驱动毛细管聚焦的比较。

[0013] 图 2A 和 2B 示出了线驱动声学聚焦装置。

[0014] 图 3 示出了流动越过线驱动声学聚焦装置中的层流线的经声学聚焦的颗粒。

[0015] 图 4A 和 4B 示出了声学聚焦装置中的经声学再定向的层流。

[0016] 图 5A-5C 示出了声学聚焦装置中的微米级聚苯乙烯荧光橙色 / 红色颗粒与纳米级绿色颗粒的背景的分离。图 5D 示出了流动越过声学聚焦装置中的层流线的声学聚焦颗粒。

[0017] 图 6A-6C 示出了越过层流边界的颗粒的声学分离。

[0018] 图 7A-7C 示出了若干声学聚焦装置。

[0019] 图 8 示出了与声学流式细胞计数器组合的声学聚焦流动室的示意图。

[0020] 图 9 示出了声学聚焦系统的流程图。

[0021] 图 10 示出了修改成包括线内分层冲洗的图 9 的示意图。

[0022] 图 11 示出了分层冲洗流体的声学聚焦。

[0023] 图 12 示出了并行流体声学切换装置的示意图。

[0024] 图 13A 和 13B 示出了未溶解全血的切换的示意图。

[0025] 图 14 示出了声学流切换颗粒计数装置的示意图。

- [0026] 图 15 示出了阴性对比载体颗粒与血液样本核心的分离。
- [0027] 图 16 示出了声学冲洗系统中的多路免疫测定。
- [0028] 图 17 示出了使用声学聚焦的高吞吐量筛选的流程图。
- [0029] 图 18 示出了使用声学冲洗的双室培养 / 收获皿。
- [0030] 图 19A-19C 示出了来自库的适体选择。
- [0031] 图 20 示出了双级声学阀分拣器。
- [0032] 图 21A 和 21B 示出了经声学再定位的颗粒和介质的光学分析。
- [0033] 图 22 示出了具有不同参数的颗粒分组的示图。
- [0034] 图 23 示出了由成像器成像的经声学再定位的颗粒。
- [0035] 图 24 示出了颗粒的声学融合。
- [0036] 图 25 示出了颗粒的声学聚焦和分离。
- [0037] 图 26A-26F 示出了使用各种激光器和灵敏度设置在非声学流式细胞计数器上和声学聚焦细胞计数器上运行的荧光微球的比较输出绘图。
- [0038] 图 27A 和 27B 是直方图绘图, 示出了与声学细胞计量术关联的通过时间的 8 倍增加对细胞周期分析的影响。
- [0039] 图 28A 是细胞被声学集中以形成在声学细胞计数器中流动的绳状结构的血液的照片。图 28B 是细胞被声学集中在声学细胞计数器中的单行线中的更为稀释的血液的照片。
- [0040] 图 29 是光谱图, 显示了紫光激发荧光团 Pacific Blue™ 的激发和发射光谱。
- [0041] 图 30 示出了将 0.07%CD34 阳性细胞的罕见事件群体检测作为活 CD45 阳性细胞的亚群。
- [0042] 图 31A 和 31B 分别显示了声学聚焦系统中单独流体动力学聚焦系统中的溶解全血的 FSC 相对于 SSC 的绘图。
- [0043] 图 32A 和 32B 显示了使用与图 31A 和 31B 中相同的系统和参数获得的 Jurkat 细胞的 FSC 相对于 SSC 的绘图。
- [0044] 图 33 示出了声学流式细胞计量系统的示意图。
- [0045] 图 34 示出了声学流式细胞计数器中的声学聚焦毛细管的示意图。
- [0046] 图 35 示出了声学流式细胞计数器中的光学收集块的一部分。
- [0047] 图 36 示出了声学流式细胞计数器中的光学数据收集块的示意图。
- [0048] 图 37 示出了声学流式细胞计数器中的射流系统的示意图。
- [0049] 图 38 示出了具有下游流体动力学聚焦的单换能器声学聚焦毛细管的示意图。
- [0050] 图 39 示出了可以调节声学流式细胞计数器中的前向散射孔径的阻挡杆装置的示意图。
- [0051] 图 40A-40F 示出了将 0.050% 和 0.045%CD34 阳性细胞的罕见事件群体检测作为活 CD45 阳性细胞的亚群。
- [0052] 图 41A-41D 示出了在非声学流式细胞计数器上和声学聚焦细胞计数器上运行的细胞检测的比较输出绘图。
- [0053] 图 42 示出了声学聚焦细胞计数器的各部件的示意图。
- [0054] 图中的相似标记指示相似元件。

## 具体实施方式

[0055] 当在本文中使用时,“声学对比度”表示两对象的材料性质在用声辐射压力操纵其位置的能力方面的相对差异,并且例如可以包括密度和压缩率的差异;“测定”表示用于探询一个或多个颗粒或一个或多个流体的方法;“测定物”表示产品,例如包括测定套件、数据和/或报告;“流动室”表示通道、室或毛细管,具有选自矩形、方形、椭圆形、扁圆形、圆形、圈形(round)、八边形、七边形、六边形五边形和三角形的内部形状;并且“通道”表示至少具有入口并且优选地具有出口的路线、路径或管道,其可以包含一定量的流体,并且具有选自矩形、方形、椭圆形、扁圆形、圆形、圈形、八边形、七边形、六边形五边形和三角形的内部形状。

[0056] 当在本文中使用时,“声学聚焦”、“经声学聚焦”、“经声学聚焦的”以及“经声学聚焦地”表示借助于声场定位流动室内的颗粒的动作。颗粒的声学聚焦的例子是沿着通道的轴线对准颗粒。颗粒所在的聚焦区域的空间范围可以由流动室几何形状、声场和声学对比度确定。在流动室的横截面中观察,观察到的聚焦区域的形状可以类似于规则几何形状(例如点、线、弧、椭圆等)或者它可以是任意的。用于定位对象的主要的力是声辐射压力。

[0057] 当在本文中使用时,“声学再定向的”和“声学再定向”表示用声辐射压力再定位装置内的流体或介质的可混溶、部分可混溶或不可混溶层流的位置的动作。该技术利用的是流动通道中的独立层流的机械性质(声学对比度)的差异。当使两个流体接触时,会由于它们的分子组成的差异而存在大浓度梯度,导致界面密度和/或压缩率梯度(各流之间的声学对比度)。在声场的作用下,各个流可以基于其声学对比度在流动室内再定向。

[0058] 当在本文中使用时,“颗粒”表示物质的小单位,例如包括生物细胞(例如真核细胞和原核细胞)、古生菌、细菌、霉菌、植物细胞、酵母菌、原生动物、变形虫、原生生物、动物细胞;细胞器;有机/无机元素或分子;微球;以及不可混溶流体的小滴(例如水包油)。

[0059] 当在本文中使用时,“分析物”表示待分析的物质或材料;“探针”表示物质,其有标签或以另外方式被标记并且用于检测或识别流体或样本中的另一种物质;“靶部”表示探针的结合部分;并且“试剂”表示已知以特定方式反应的物质。

[0060] 当在本文中使用时,“微球”或“小珠”表示具有声学对比度的颗粒,其可以与球形一样是对称的、与哑铃形一样是不对称的或者是不具有对称性的大分子。微球或小珠的例子例如包括硅石、玻璃和中空玻璃、乳胶、硅橡胶、聚合物,例如聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯、聚亚甲基三聚氰胺、聚丙烯腈、聚甲基丙烯腈、聚(偏二氯乙烯共丙烯腈)和聚交酯。

[0061] 当在本文中使用时,“标签”表示可识别物质,例如染料或放射性同位素,其被引入系统(例如生物系统)中并且可以跟随流动室或通道的路线,提供关于流动室或通道中的颗粒或靶部的信息;并且“信号分子”表示可识别物质,例如染料或放射性同位素,其被引入系统(例如生物系统)中并且可以用作颗粒的信号。

[0062] 图1示出了根据本发明的示例性实施例的平面驱动和线驱动毛细管聚焦的比较。在平面聚焦103/105中,可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒102可被聚焦为二维片并且具有沿着流动方向的可变速度(参见不同箭头)。在线驱动毛细管聚焦107/109中,颗粒102可被聚焦到毛细管的中心轴线并且具有沿流动方向的速度。毛细管可以具有例如圆形、扁圆形或椭圆形横截面。作为替换,颗粒102也可被聚焦到毛细管内的另一轴线或

沿着毛细管的壁。

[0063] 图 2A 和 2B 示出了根据本发明的示例性实施例的线驱动声学聚焦装置的侧视图和轴视图。可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒 203 可以使用换能器 205 被声学聚焦到管 201 (例如可以是圆柱形管) 的中心 209 中的压力最小值。颗粒 203 可以形成单线轨迹 211, 其可以允许具有类似尺寸和声学对比度的颗粒的均匀停留时间, 这又可以允许颗粒的高吞吐量系列分析而不损害灵敏度和分辨率。

[0064] 图 3 示出了流经根据本发明的示例性实施例的线驱动声学聚焦装置中的层流线的经声学聚焦的颗粒。可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒 305 可以使用换能器 303 从样本流 309 被声学聚焦到线驱动毛细管 301 中的流动流体 / 冲洗流 315 的中心 307。颗粒 305 可以越过层流线移动并且于是可以作为单行线移动并且在分析点 311 处被分析。

[0065] 图 4A 和 4B 示出了根据本发明的示例性实施例的声学聚焦装置中的声学再定向层流。在图 4A 中, 没有声场并且层流 403 和 407 彼此平行地在声驱动毛细管 401 中流动。在图 4B 中, 声场由换能器 405 施加并且因此流 403 和 407 可以基于它们的声学对比度被声学再定向。具有较大声学对比度的流 403b 可以被再定向到毛细管 401 的中心, 而具有较低声学对比度的流 407b 可被再定向为靠近毛细管 401 的壁。如果在偶极模式中启动声场, 则流 403b 与毛细管 401 的中心轴线重合地移动, 部分地移位流 407b, 如图 4B 中所示。流可以是不可混溶的、部分可混溶的或可混溶的。大浓度梯度可能由于它们的不同分子组成而存在于流之间。为了声压力, 浓度梯度可以被视为密度和 / 或压缩率梯度, 并且流可以被视为可以用声辐射压力作用的具有不同密度和压缩率(声学对比度)的孤立实体。

[0066] 图 5A-5C 示出了根据本发明的示例性实施例的声学聚焦装置中的微米级聚苯乙烯荧光橙色 / 红色颗粒与纳米级绿色颗粒的背景的分离。图 5D 示出了流动越过根据本发明的示例性实施例的声学聚焦装置中的层流线的经声学聚焦的颗粒。分离可以基于尺寸和声学对比度, 原因是时间平均声力与颗粒的体积成比例。如果中心冲洗流具有比外部样本流更高的特定比重和 / 或更低的压缩率, 则初始在具有比中心冲洗流更大的声学对比度的外部样本流中的颗粒将继续聚焦到毛细管轴线, 而较小对比度的颗粒将被排除。图 5A 显示了当声场关闭时与绿色 200nm 颗粒混合的红色 5.7  $\mu\text{m}$  颗粒在落射荧光照明下流动通过毛细管。图 5B 显示了当声场打开时 5.7  $\mu\text{m}$  颗粒(其在蓝光照明下发出黄色荧光)被声学聚焦到中心线, 而 200nm 颗粒保持在它们的初始流中。图 5C 显示了 5.7  $\mu\text{m}$  颗粒在具有红色带通滤光器的绿光照明下发出红色荧光, 而 200nm 颗粒未被激发。图 5D 示出了在同轴流 505 的旁边引入的清洁核心流 507, 所述同轴流包含在毛细管 501 中流动的荧光背景流体。当换能器 503 产生声驻波(未显示)时, 可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒 509 可以被声学聚焦并且从同轴流 505 移动到核心流 507, 在那里它们以单行朝着分析点 511 流动。

[0067] 图 6A-6C 示出了越过根据本发明的示例性实施例的层流边界的颗粒的声学分离。介质或流体可被声学再定向, 同时可能包括一个或多个罕见事件颗粒的介质或流体中的颗粒可被声学操纵或聚焦。图 6A 显示了当声场关闭时耦合到 250  $\mu\text{m}$  声学聚焦室 609 的端部的光室的荧光图像。白线 601 和 611 指示流动室的边缘。掺有 25  $\mu\text{g/ml}$  的藻红蛋白(R-Phycoerythrin)荧光蛋白(橙色荧光)的 PBS 缓冲液中的 10% 全血的混合物流动通过流动室的下半部 605 (白血细胞 DNA 用 **SYTOX®** 绿色染色); 在上半部 603 的是 6% 碘克沙醇(iodixanol) PBS 缓冲液(暗)。图 6B 显示了当声场打开时, PBS 缓冲液中的 6% 碘克沙醇

被声学再定向到中心 613, 血液 / PBS 缓冲液 / 藻红蛋白混合物朝着室侧(图中的顶部和底部)被声学再定向, 并且白血细胞离开它们的初始介质并且被声学聚焦到中心, 在那里它们显示为绿线(红血细胞类似地被声学聚焦, 但是在荧光图像中不可见)。图 6C 示出了比背景密度更大 / 压缩率更小的颗粒的近似声力势(Acoustic Force Potential)的 MATLAB 绘图 617。密度较大、压缩率较小的颗粒 / 介质(例如细胞和碘克沙醇 / PBS 缓冲液)朝着中心被声学聚焦 / 声学再定向(暗蓝区域、势最小), 而密度较小和 / 或压缩率较大的介质(例如血液 / PBS 缓冲液 / 藻红蛋白混合物)朝着左侧和右侧被声学聚焦 / 声学再定向(暗红区域、势最大)。如果密度较低(和 / 或压缩率较高)的样本流沿着大致圆柱形毛细管的轴向中心流动并且密度较高(和 / 或压缩率较低)的流邻近它流动, 则各个流将被声学再定向到与图 6C 中所示的势一致(尚未在平面系统中证明或报告的特征)。

[0068] 图 7A-7C 示出了根据本发明的示例性实施例的若干声学聚焦装置。图 7A 显示了流式细胞计量系统 700a, 其中包括颗粒 712(可能包括一个或多个罕见事件颗粒)的样本 715a 和冲洗缓冲液 713a 被引入毛细管 703。线驱动器 701(例如, PZT 驱动器或能够产生声驻波的其它机构)在用户定义模式(例如偶极模式)下引入声驻波(未显示)。因此, 样本 715a 和冲洗缓冲液 713a 可以被声学再定向(如 715b 和 713b)并且颗粒 712 可以基于它们的声学对比度被声学聚焦(如 717)。照明源 709(例如激光器或一组激光器, 或任何合适的照明源, 例如发光二极管)在探测点 716 照明颗粒 717。照明源可以是紫光激光器(例如 405nm 激光器)、蓝光激光器(例如 488nm 激光器)、红光激光器(例如 640nm 激光器)或它们的组合。来自被测样本的光信号 719 可以由检测器或检测器阵列 705(例如 PMT 阵列、光电倍增管、雪崩光电二极管(APD)、多像素 APD 装置、硅 PMT 等)检测。图 7B 显示了流式细胞计量系统 700b, 其中清洁流 713a 可以独立地流动通过光室。可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒 702 可以被声学聚焦以如线 717 流动, 样本缓冲液 715b 可以被丢弃到废物 721, 并且线 717 可以传递到第二声波引起机构 714。图 7C 显示了流式细胞计量系统 700c, 其中样本 715a 可被喷射为稍偏向中心的一侧并在毛细管壁 703 附近流动, 同时缓冲液 713a 贴靠相对壁流动。换能器 701 可以声学再定向样本 715a(如 715b), 可以声学聚焦可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒 702(如 714/717), 并且可以声学地再定向缓冲液 713a。

[0069] 图 8 示出了与根据本发明的示例性实施例的用于声学定向颗粒和流的声学流式细胞计数器组合的声学聚焦流动室的示意图。包括颗粒 803、807 和 809 且可能包括一个或多个罕见事件颗粒的样本 801 被引入包含换能器 811 的流动室 810, 所述换能器将颗粒 803、807 和 809 声学聚焦为在收集 / 培育部位 819 收集的颗粒 815。来自冲洗容器 802 的冲洗或其它试剂 805 作为侧向离开的背景流 813 被引入流动室 810。另一冲洗流 821 从冲洗容器 817 引入具有声场发生器 822 的聚焦细胞计数器 850 的流动室 810b 中, 在进入另一个流动室 851 中的入口 829 之前所述声场发生器将颗粒 823 声学聚焦为颗粒 825/827。在由探测光 833 在探测点 852 进行探测之前换能器 831 还将颗粒 825/827 声学聚焦为颗粒 832。在收集点 837 收集被测量颗粒之前, 来自被探测颗粒的信号 854 被发送到检测器 835 进行分析。

[0070] 图 9 示出了根据本发明的示例性实施例的声学聚焦系统的流程图。在步骤 901 中, 包括颗粒的样本被收集并且引导到可控流动泵。在步骤 903 中, 可控流动泵将样本泵送到声学聚焦设备。在步骤 905 中, 声学聚焦设备将可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒

中的至少一些聚焦成线或平面,并且然后将颗粒引导到探询区进行光学激发和检测。在步骤 907 中,光学激发颗粒中的至少一些并且检测来自激发颗粒的至少一些信号,并且随后引导颗粒进行进一步分析或者引导到废物或进行某些其它处理。在步骤 909 中,可以由更长通过时间数据收集和分析部分进一步分析颗粒。在步骤 911 中,颗粒可以由废物或附加处理部分提取为废物或者受到附加处理。可控泵可以为颗粒的期望线速度而被调节到期望颗粒流率,其可以在例如大约 0m/s 至大约 10m/s、大约 0m/s 至大约 0.3m/s 或大约 0.3m/s 至大约 3m/s 的范围内。激发 / 检测可以是脉动的或经调制的,并且可以使用在模拟 / 数字电子学和 / 或光学中已知的任何合适的激发 / 检测方法进行,包括使用瑞利散射检测器。

[0071] 颗粒速度的控制具有许多优点。首先,它可以通过增加由荧光 / 发光标签发出的光子的数量来改善信号,原因是标签可以被照明更长时间。在 0.3m/s 的线速度下,光子的数量可以增加大约 10 倍并且然后当使用声学聚焦时每秒可以分析大约 3,000 个颗粒(假设颗粒中心之间的平均距离为 100 微米)。并且在 0.03m/s 的线速度下,该数量可以增加大约 100 倍并且每秒可以分析 300 个颗粒。其次,典型地由于快速通过时间在常规流式细胞计量术中不使用的标记物(例如镧系元素、镧系元素螯合物、使用铈的纳米颗粒、半导体纳米晶体(例如量子点)、诸如细胞染色剂和台盼蓝的吸收性染料等)可以变得可使用。再次,其它标记物(例如具有长寿命和 / 或低量子产率 / 消光系数的荧光团或发光团;多数化学-生物发光物种;寿命大于大约 10ns、在大约 10nm 至大约 1 $\mu$ s 之间、在大约 1 $\mu$ s 至大约 10 $\mu$ s 之间、在大约 10 $\mu$ s 至大约 100 $\mu$ s 之间和在大约 100 $\mu$ s 至大约 1ms 之间的标签)可以受益于减小光漂白的更低激光功率并且受益于通过线速度的控制成为可能的更长通过时间。对于例如 10ms 的通过时间,在每秒一千次的速率以 10 $\mu$ s 脉冲进行的脉冲调制允许激发和发光收集的 10 个周期,其中实际上例如铈螯合物的所有发光衰减可以被监测。在该脉冲速率下若没有通过本发明的实施例提供的线速度的控制而成为可能的更长通过时间的益处,90% 或以上的颗粒可能在未被探询的情况下通过。如果脉冲速率增加到 100kHz 并且具有 1 $\mu$ s 脉冲,则可能仍然有将近 9 $\mu$ s 监测镧系元素发光(原因是多数荧光团具有 1-2ns 寿命并且多数自发荧光在 10ns 内衰减)。

[0072] 图 10 示出了根据本发明的示例性实施例的修改成包括线内分层冲洗的图 9 的示意图。在步骤 1001 中,包括颗粒的样本被收集并引导到可控样本流动泵。在步骤 1005 中,可控样本流动泵将样本泵送到声学装置 1019 的分层冲洗装置部分中(其可以基于颗粒和流体的声学聚焦和 / 或再定向)。与此同时,在步骤 1003 中,冲洗流体被收集并引导到可控冲洗流体泵。在步骤 1007 中,可控冲洗流体泵将冲洗流体泵送到分层冲洗装置中。在步骤 1009 中,分层冲洗装置线内冲洗样本 / 颗粒。在步骤 1011 中,收集清洁流体,并且然后将可能包括一个或多个罕见事件颗粒的已冲洗样本 / 颗粒引导到探询区以进行光学激发和检测。在步骤 1013 中,光学地激发颗粒中的至少一些,检测来自经激发的颗粒的至少一些信号,并且然后引导颗粒进行进一步分析或将其引导到废物或进行某些其它处理。在步骤 1015 中,所述颗粒可由更长通过时间数据收集和分析部分进一步分析。在步骤 1017 中,所述颗粒可由废物或附加处理部分提取为废物或者受到附加处理。

[0073] 图 11 示出了根据本发明的示例性实施例的分层冲洗流体的声学聚焦。包含颗粒 1109 (可能包括一个或多个罕见事件颗粒)的样本连同分层冲洗流体 1107 一起被引入平面声学流动室 1101 中。换能器 1103 基于声学对比度生成声波 1105,所述声波将颗粒 1109 声

学聚焦到穿过节点 1111 的轨迹。平面声学流动室 1101 也可以具有位于外部的声学节点,在该情况下颗粒 1109 可以声学聚焦到流动室的顶部。

[0074] 图 12 示出了根据本发明的示例性实施例的并行流体声学切换装置的示意图。包含第一颗粒 1202 和第二颗粒 1204 (可能包括一个或多个罕见事件颗粒)的第一、最外侧样本介质 1205 被引入毛细管 1201。第二、中间介质 1213 连同第三、最内侧介质 1209 一起被引入毛细管 1201。线驱动器 1203 可以声学地再定向第一、第二和第三介质并且可以基于它们的声学对比度而声学聚焦第一颗粒和第二颗粒。所述颗粒然后可以流到毛细管之外。当切换时,颗粒中的一些可以从第一介质穿过第二介质(其可以是试剂流)声学聚焦到第三介质,或者它们可以从第二介质声学聚焦到第三介质。

[0075] 图 13A 和 13B 示出了根据本发明的示例性实施例的未溶解全血的切换。血液样本 1309 和冲洗缓冲液 1307 在不同位置被引入毛细管 1302。当启动换能器 1304 时,可能包括一个或多个罕见事件红/白血细胞的红血细胞 1303 和白血细胞 1305 被声学聚焦,并且样本 1309 和冲洗缓冲液 1307 被声学再定向。由于它们的数量较小,所以白血细胞在经聚焦血液的绳状结构中保持分离。

[0076] 图 14 示出了根据本发明的示例性实施例的声学流切换颗粒计数装置的示意图。所述装置 1400 允许与未知或不可用导电缓冲液 1403 一起流动的具有颗粒 1409 (可能包括一个或多个罕见事件颗粒)的样本 1405 的线内分析。颗粒 1409 可以使用换能器 1407 声学聚焦到缓冲液 1403,而样本介质可以在废物出口 1411 被丢弃。当颗粒移动经过第二换能器 1413 到达具有孔径大小 1419b 的检测点 1419 时颗粒可以由检测电极 1415 处的信号的任何合适的电子检测器 1417 分析并且计数。

[0077] 图 15 示出了根据本发明的示例性实施例的阴性对比度载体颗粒与血液样本核心的分离。其中,换能器 1507 可以声学聚焦可能包括一个或多个罕见事件颗粒的阴性对比度载体颗粒 1505,这些颗粒 1505 从初始包括它们和血细胞 1503 的血液核心样本 1511 横越血液核心样本 1511 和清洁缓冲液 1513 之间的界面 1502,朝着毛细管壁 1501 移动。在其它声学模式中,血细胞 1503 可以被驱动到壁,而阴性对比度载体颗粒 1505 可以被驱动到中心轴线。

[0078] 图 16 示出了根据本发明的示例性实施例的声学冲洗系统中的多路免疫测定。在声学冲洗系统 1600 中,可以通过使分析物 1609/1611/1613 在中心流 1607 中流动并且将预先结合有荧光抗原的小珠 1603/1605/1621 从外部流 1601 推入中心流 1607 中而快速地执行竞争免疫测定。特定化学制品可被置于在单反应容器中混合并且在流动中处理的每个群体上。离开容器的群体 1615 (可能包括一个或多个罕见事件群体)可以在分析点 1617 经由尺寸和或荧光颜色和/或荧光而加以区分。

[0079] 图 17 示出了根据本发明的示例性实施例的使用声学流体的高吞吐量筛选的流程图。在步骤 1701 中,可能包括一个或多个罕见事件颗粒的细胞/小珠型颗粒被收集和/或培养以供试验。在步骤 1703 中,用感兴趣的标签和/或药物候选培育这些颗粒并将其引导到声学聚焦器/流切换器。与此同时,在步骤 1709 中,(一种或多种)其它药物和/或(一种或多种)附加反应物可以被引入声学聚焦器/流切换器。在步骤 1705 中,声学聚焦器/流切换器聚焦和/或切换颗粒和/或流,并且可以使颗粒从过量的药物/配体中分离。在步骤 1707 中,立即或在附加切换之后使用声学聚焦器/流切换器收集清洁流体。在步骤 1711

中,可以识别和 / 或分拣颗粒。然后,在步骤 1713 中,可以将不需要的颗粒送往废物,并且在步骤 1715 中,可以将选定颗粒送往附加分析或处理。在步骤 1717 中,可以执行包括药物结合的确定、闪烁计数、存活 / 凋亡确定和基因表达分析的附加处理。

[0080] 图 18 示出了根据本发明的示例性实施例的使用声学冲洗的双室培养 / 收获皿。其中,可能包括一个或多个罕见事件细胞的细胞在室 1801 中培养并且可被定期发送以声学聚焦到通道 1805 中,在那里它们可由光学检测器 1817 检查细胞密度 / 生长。当满足生长目标并且室 1801 中的培养基用完时,可以启动阀以允许来自容器 1803 的新鲜培养基沿着通道 1805 流动并且在室 1811 中收获用过的培养基。细胞然后可被声学聚焦到新鲜培养基中并被转移到第二培育室 1809。于是可以反向重复相同过程,以使得细胞在室 1809 中培养并被转移到室 1801 内的新鲜培养基中。

[0081] 图 19A-19C 示出了根据本发明的示例性实施例的来自库的适体选择。图 19A 显示了具有用适体库 1901 培育的靶分子的多重小珠 / 细胞 1903。图 19B 示出了使用线内声学介质切换使小珠 / 细胞 1903 和 1907 从未结合适体 1904 分离。可以调节冲洗核心(中心圆)的盐和 / 或 pH 以选择更高亲和力适体,并且可以执行连续冲洗以增加纯度。图 19C 示出了经分选的小珠 1911。

[0082] 图 20 示出了根据本发明的示例性实施例的允许罕见细胞群体的线内非稀释高速分选的双级声学阀分选器。其中,包括颗粒 2007 的样本被引入声学阀分选器 2000 的部分 2001。第一换能器 2002 引起通道 2004 中的声波,并且探测源 2013 在探测点 2006 探测颗粒 2007。在分选点 2009 检测到的不需要的颗粒可以被引导通过废物阀 2010a,而选定颗粒可以沿着通道 2004 被引导到下游处理 2011 以供第二换能器 2002 进一步聚焦、由光源 2015 探测并且对于不需要的颗粒朝着废物阀 2010b 适当地分选或者对于选定颗粒 2019 从通道 2004 离开。对于罕见细胞,上述分选提供捕获感兴趣细胞的高速初始阀分选,因此增加了分选部分中的期望细胞的比率。随后,上述分选可以在更低速率下再次进行以用于提高纯度。如果例如以每秒 30,000 个细胞的速率分析细胞并且阀分选能够以每秒 300 个细胞的速度进行分选,则每个初始分选决定应当包含平均大约 100 个细胞。如果这些 100 个细胞随后以更慢的流速转移到第二分选器(或在初始分选之后的相同分选器),则可以显著地纯化感兴趣的细胞。

[0083] 图 21A 和 21B 示出了根据本发明的示例性实施例的声学再定位颗粒和介质的光学分析。其中,样本 2103 中的颗粒 2102 (可能包括一个或多个罕见事件颗粒)基于声学对比度由线驱动器 2105 声学聚焦(作为颗粒 2115)。颗粒 2115 进入光室 2117 并且探测源 2111 探测这些颗粒。检测器阵列 2107 随后收集来自每个颗粒的光信号 2113,并且如果信号满足某个用户确定的标准,则相应颗粒(或颗粒组)由光源 2119 (例如闪光 LED(宽带或 UV))照明并且由成像器 2109 成像。在图 21A 中,不采集图像并且颗粒 2125 的流速 2129 保持不变。然而在图 21B 中,颗粒 2125 的流速 2127 减小到适合于所需成像分辨率的值以采集颗粒的图像。

[0084] 图 22 示出了具有不同参数的颗粒分组的示图,所述参数例如可以在如图 21A 和 21B 中所示的系统被分析。颗粒组 2202 内的每个颗粒关于参数 1 和参数 2 (各自例如可以是前向散射、侧向散射或荧光)是类似的。用户定义的阈值 2201 基于参数 1 和参数 2 的值识别满足该阈值的用于成像的颗粒。如果颗粒满足用户定义的阈值,则流动可以减小到

合适速率以供成像器捕获颗粒的焦内图像。也可以建立其它检测阈值 2205、2209 和 2215。当然,不需要成像每个颗粒。相反地,可以构造来自选通亚群的颗粒的采样矩阵以基于它们的散射和荧光标记来限定待捕获的一组颗粒图像,这可以允许高颗粒分析速率(例如超过每秒 2000)。图像可以捕获细胞形态、定向和内部结构(例如细胞核的位置和数量),并且可使用本领域中已知的任何合适的成像装置获得,包括电子 CCD 摇拍技术。成像可以相对较慢(达 300 细胞 / 秒),但是更慢的流动可以允许保持高灵敏度的长探测时间并实现良好的空间分辨率(达 0.5 微米)。

[0085] 图 23 示出了根据本发明的示例性实施例的由成像器成像的声学再定位颗粒。它显示了从声学再定向流 2305 捕获的血细胞 2303 的照片,其中为了血细胞 2303 的焦内图像捕获而减慢光室 2307 中的流。为创建图像,例如内径 410  $\mu\text{m}$  的线驱动毛细管可以用光室(其例如可以是具有内部圆柱形通道的硼硅玻璃立方体,所述内部圆柱形通道具有与线驱动毛细管的内径相同的直径)截断。激发频率为大约 2.1MHz 并且声学装置的功耗为 125 毫瓦。线驱动毛细管可以在超过 5ml/min 的容积流速下产生 5  $\mu\text{m}$  乳胶颗粒和血细胞的精细聚焦。线驱动毛细管可以附连到方形横截面石英光室。光室的内腔可以在横截面上为圆形,并且可以具有与线驱动毛细管相同的内径以延长流体柱的共振条件并且由此将声学聚焦力延伸到光室中。

[0086] 图 24 示出了根据本发明的示例性实施例的颗粒的声学融合。包含第一颗粒类型的第一样本 2401 被泵送通过由 PZT 换能器 2404 驱动的第一声学聚焦器 2402 并且所述颗粒被声学聚焦成线 2408。包含第二颗粒类型的第二样本 2403 类似地被泵送并且聚焦成由 PZT 换能器 2407 驱动的第二声学聚焦器 2405 中的线 2409。样本流动到由 PZT 换能器 2411 驱动的第三声学聚焦器 2410 中使得颗粒的线被聚焦以形成颗粒可以相互作用的单线。在下游,颗粒穿过使用融合颗粒 2412 的电极 2413 产生的电场,可能形成一个或多个罕见事件颗粒。

[0087] 图 25 示出了根据本发明的示例性实施例的颗粒的声学聚焦和分离。可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒 2503 移动到第一声学聚焦器 2505,所述第一声学聚焦器用第一换能器 2507 将它们聚焦成单行线 2509。线 2509 随后可以被给馈入基于尺寸和声学性质中的一个或多个进行分离和收集的声学分离器 2513 中,所述声学分离器配备有第二换能器 2512 和多个出口 2519a、2519b 和 2519c。当进入声学分离器 2513 中时可以通过拉走流体或以另外方式例如通过侧向通道 2511 去除流体而调节线 2509 的位置。

[0088] 根据本发明的示例性实施例,通过使用能够控制颗粒速度并且允许长通过时间的声学流式细胞计数器执行这样的测定,如本文中所述,可以减小对单个患者的血液进行测定的临床免疫表型板中的测定量,这可以增加一次测定的标记物的数量。可以一次执行例如 4、6 或更多抗体的更大无补偿板。例如,在 AIDS 进展监测中用于 T 细胞的 CD4 阳性枚举的 anti-CD45、CD4 和 CD8 抗体的板中,例如可以加入或代用 CD3 以有助于识别 T 细胞。可以使用蓝色(例如 488nm)和红色(例如 635nm)激光细胞计数器进行测定,每个抗体具有不同的荧光物(例如 FITC、PE、PE-Cy5 和 APC)。例如可以使用用于白血病 / 淋巴瘤分类的许多四抗体测定组合,例如可以包括(1) CD3、CD14、HLADr 和 CD45 ;(2) CD7、CD13、CD2 和 CD19 ;(3) CD5、Lambda、CD19 和 Kappa ;(4) CD20、CD11c、CD22 和 CD25 ;(5) CD5、CD19、CD10 和 CD34 ;以及(6) CD15、CD56、CD19 和 CD34。此外,在 Sutherland 等人的“Enumeration

of CD34+Hematopoietic Stem and Progenitor Cells”, Current Protocols in Cytometry, 6. 4. 1-6. 4. 23(2003) 中描述的方案可以有利地用于本文中所述的本发明的示例性实施例中的一个或多个,上述文献通过引用完整地合并于本文中。

[0089] 也可以使用用于白血病/淋巴瘤分类的许多六抗体测定组合,包括表 1 中所示的例子(左列指示测定编号并且顶栏指示用于每个抗体的荧光物;从左到右在其相应的荧光物标记物之下列出了每个抗体的特异性)。通过用长寿命试剂和窄带试剂代替荧光物,最小补偿抗体板是可能的。在表 2 中显示了可以实现不需要补偿控制的最小补偿结果的标记物的更多几个例子。测定例如可以使用 405nm 和 635nm 脉冲二极管激光器。

[0090] 表 1

[0091]

FITC	PE	PerCP-CY5.5	PE-CY7	APC	APC-CY7
1 CD7	CD4	CD2	CD8	CD3	CD45
1.Kappa	Lambda	CD5	CD10	CD34	CD19
2.CD38	CD11c	CD22	CD19	CD23	CD20
3.CD57	CD56	CD33	CD8	CD161	CD3
4.CD11b	CD13	CD33	HLADr	CD34	CD45
5.CD71	CD32	CD41a	CD16	CD64	CD45

[0092] 表 2

[0093]

Qdot® 545	Qdot® 800	EuropiumDEADIT	PerCP	APC	AlexaFluor® 405
1 CD7	CD4	CD2	CD8	CD3	CD45
1.Kappa	Lambda	CD5	CD10	CD34	CD19
2.CD38	CD11c	CD22	CD19	CD23	CD20
3.CD57	CD56	CD33	CD8	CD161	CD3
4.CD11b	CD13	CD33	HLADr	CD34	CD45
5.CD71	CD32	CD41a	CD16	CD64	CD45

[0094] 可以通过将快速红细胞溶解试剂并入中心冲洗流来溶解流动分离器中的线内红细胞而用红细胞溶解执行血液中的免疫表型。在溶解之后,未溶解白细胞可被快速转移到后续分离器中的淬灭缓冲液。这可以在很短的时间内执行,最小化白细胞的损伤或损失,并且还可以用于排除包括溶解红细胞“鬼影”的碎片,所述“鬼影”具有由溶解过程导致的降低的声学对比度。可以在溶解之前在小体积血液内进行用于免疫表型的白血细胞的染色,或者可以在溶解之后进行(同时小心地控制样本体积和白细胞数量以保证恰当的免疫反应)。如本文中所述的声学冲洗系统可以用于将靶细胞或颗粒集中成小体积以进行恰当的免疫染色,这对具有低浓度靶细胞的样本是有用的。例如,这样的系统可以用于减小对于 AIDS 进展监测有价值的 CD4 阳性 T 细胞的测定的成本。

[0095] 血液免疫表型还可以通过触发荧光信号而不是散射信号的检测在没有红细胞溶解的情况下执行。全血随后可用适当的抗体染色并在没有溶解的情况下给馈入细胞计数器,在一些情况下实际上不进行稀释。根据本发明的实施例的声学细胞计数器可以对大约每分钟 100-500  $\mu$  l 的全血执行该类型的测定,原因是血细胞可以被集中到具有很小间质

间隙的中心核心内。由于正常患者体内的白血细胞通常占全血中的细胞总数的1%以下,因此密集血液核心中的白血细胞的重合是罕见的。流体动力学聚焦的唯一用途似乎不是产生这样的固体核心,这限制了穿过指定横截面区域的细胞的数量。还可以执行远离自由抗体将血细胞转移到清洁缓冲液中的声学冲洗步骤,这可以减小荧光背景并且增加灵敏度。

[0096] 图 26A-26F 示出了使用各种激光器和灵敏度设置在非声学流式细胞计数器上和声学聚焦细胞计数器上运行的荧光微球的比较输出绘图以显示使用根据本发明的示例性实施例的声学细胞计数器可以实现的增加的通过时间。荧光微球(可从 Spherotech, Libertyville, IL 获得, 商标为 Rainbow RCP-30-5A,  $3.2\ \mu\text{m}$ )使用 488nm 蓝光激光器(顶行, 图 26A-26C)和 405nm 紫光激光器(底行, 图 26D-26F)在仅仅使用流体动力学聚焦的非声学流式细胞计数器上(图 26C 和 26F)和使用上游声学聚焦及随后使用下游流体动力学聚焦的声学聚焦细胞计数器上(图 26A、26B、26D 和 26E)运行。非声学流式细胞计数器以其具有  $15\ \mu\text{l}/\text{min}$  的样本输入速率的最高灵敏度设置运行(右列, 图 26C 和 26F)。声学聚焦细胞计数器以其具有  $100\ \mu\text{l}/\text{min}$  的样本输入速率的标准灵敏度设置(中间列, 图 26B 和 26E)和以其具有  $100\ \mu\text{l}/\text{min}$  的样本输入速率的最高灵敏度设置并且颗粒被激光器照射的时间增加 4 倍(左列, 图 26A 和 26D)运行。考虑两个总流速( $2.4\text{ml}/\text{min}$  和  $0.6\text{ml}/\text{min}$ )。鞘和样本输入速率相对于彼此调节以针对  $2.4\text{ml}/\text{min}$  总速率允许  $25\ \mu\text{l}/\text{min}$  至  $1000\ \mu\text{l}/\text{min}$  并且针对  $0.6\text{ml}/\text{min}$  的总速率允许  $25\ \mu\text{l}/\text{min}$  至  $200\ \mu\text{l}/\text{min}$  的样本输入速率。图 26A-26F 显示了 8 峰荧光 rainbow 微球(其由不同荧光强度水平的 8 个群体组成)由声学聚焦细胞计数器更清楚地分辨, 这可以通过该组 8 峰小珠内各峰值之间的更大和更清楚分离看到, 尤其在图 26A 和 26D 中, 这得益于颗粒被激光器照射时间的 4 倍增加(例如从大约  $10\ \mu\text{s}$  增加到大约  $40\ \mu\text{s}$ )。这证明荧光群体的更好分辨率由减慢流动并且增加通过时间导致。

[0097] 图 27A 和 27B 是直方图绘图, 示出了根据本发明的示例性实施例的与声学细胞计量术关联的通过时间的约 8 倍增加对细胞周期分析的影响。图 27A 显示了当使用紫光激光器和低样本速率设置(通过时间为大约  $5\ \mu\text{s}$ )通过非声学(仅流体动力学)流式细胞计数器运行用紫染色(可从加利福尼亚州 Carlsbad 的 Life Technologies Corp. 获得, 商标为 FxCycle™)标记的 ST486B 淋巴球时获得的数据。图 27B 显示了相同类型的数据, 但是使用紫光激光器和  $25\ \mu\text{l}/\text{min}$  样本输入速率(通过时间为大约  $40\ \mu\text{s}$ )由具有上游声学聚焦和下游流体动力学聚焦的声学聚焦细胞计数器获得。在两种情况下采集到总共大约 15,000 个事件。使用可从 Verity Software House 获得的、商标为 ModFit LT v. 3.2.1 的曲线拟合软件执行的数据分析产生底层细胞周期相分布和软件定义的  $G_0G_1$  峰值的变化的百分比系数(%CV)和  $G_2/G_1$  比率。%CV 是落入  $G_0G_1$  峰值的细胞的精度的量度(%CV 越低, 测量精度越高)。图 27A 显示了当使用声学聚焦时的更不同群体和更低 %CV (2.81% 相对于 5.84%)。

[0098] 其它类似细胞周期分析实验显示尽管仅使用流体动力学聚焦会在样本速率增加时使得数据质量和 %CV 降低, 但是使用声学聚焦的情况下在样本速率增加时数据质量和 %CV 可以几乎不变化。具体地, 对于仅在  $1 \times 10^6$  细胞 /ml 的浓度下的流体动力学聚焦,  $12\ \mu\text{l}/\text{min}$ 、 $35\ \mu\text{l}/\text{min}$  和  $60\ \mu\text{l}/\text{min}$  的样本速率的 %CV 值分别为 4.83%、6.12% 和 7.76%, 并且 S 相数据从  $12\ \mu\text{l}/\text{min}$  低速率的 37.83% 变化到  $60\ \mu\text{l}/\text{min}$  高速率的 26.17%。但是对于下游流体动力学聚焦已经声学聚焦的样本,  $25\ \mu\text{l}/\text{min}$ 、 $100\ \mu\text{l}/\text{min}$ 、 $200\ \mu\text{l}/\text{min}$ 、 $500\ \mu\text{l}/\text{min}$  和  $1000\ \mu\text{l}/\text{min}$  的样本速率的 %CV 值分别为 3.22%、3.16%、3.17%、4.16% 和 4.21%, 并且

S 相数据仅从  $25 \mu\text{l}/\text{min}$  低速率的 40.29% 变化到  $1000 \mu\text{l}/\text{min}$  高速率的 38.55%。因此,即使在远超过非声学聚焦系统的样本速率下,声学系统也可以显著地改善性能。

[0099] 根据本发明的示例性实施例,声学细胞计数器可以允许在极大缩短的时间段内统计学地采集相当数量的罕见事件,原因是这样的细胞计数器可以输送几乎高一个量级的样本输入速率。例如,非声学流式细胞计数器通常具有  $10\text{--}150 \mu\text{l}/\text{min}$  的样本输送速率,这可以导致在  $5 \times 10^5$  细胞 /ml 的浓度下运行 2ml 细胞超过 13 分钟的估计运行时间,而声学聚焦细胞计数器可以具有  $25\text{--}1000 \mu\text{l}/\text{min}$  的样本输入速率,这可以导致在  $5 \times 10^5$  细胞 /ml 的浓度下运行 2ml 细胞的约 2 分钟的估计运行时间。表 3 显示了样本浓度和样本流速的各种组合可以获得的事件的数量。当然可能通过增加浓度而增加事件的数量。但是通过用声学聚焦使用尽可能高的容积样本输入速率,可以在较低浓度下获得相同数量,即,高样本输入速率允许高数据率而不需要增加与非声学系统关联的样本浓度。

[0100] 表 3

[0101]

样本浓度 (part/ml)	样本流速 ( $\mu\text{l}/\text{min}$ )								
	10	30	60	100	120	150	200	500	1000
1.00E+04	2	5	10	17	20	25	33	83	167
5.00E+04	8	25	50	83	100	125	167	417	833
1.00E+05	17	50	100	167	200	250	333	833	1,667

[0102]

5.00E+06	83	250	500	833	1,000	1,250	1,667	4,167	8,333
1.00E+06	167	500	1,000	1,667	2,000	2,500	3,333	8,333	
5.00E+06	833	2,500	5,000	8,333	10,000				
1.00E+07	1,667	5,000	10,000						

[0103] 需要时由声学聚焦细胞计数器提供的样本输入速率的宽范围允许高容积样本吞吐量与低鞘或无鞘或高容积鞘组合。对于低浓度样本,高容积吞吐量转化为快得多的颗粒分析速率,这又转化为更短的测定时间,特别是对于罕见事件分析,其中必须被处理以获得统计学显著结果的体积在毫升或更大量级上。对于适度高浓度样本该容积吞吐量也可以转化为超高颗粒速率。例如如果声学细胞计数器将使用 6 百万细胞 /ml 的样本浓度并且样本输入速率为  $1000 \mu\text{l}/\text{min}$ ,则细胞将以 100,000 细胞 /s 的速率穿过器械激光器。在  $2.4 \text{ml}/\text{min}$  的总流速下,该浓度将导致极高的重合事件率,但是器械例如可以使用快得多的总流速,例如  $24 \text{ml}/\text{min}$ 。这样的性能明显优于其中通过探测激光器的通过时间通常仅为约  $1\text{--}6 \mu\text{s}$  的常规细胞计数器。对于单位时间 0.1 的平均事件率,  $10 \mu\text{s}$  对应于大约 10,000 颗粒 /s 的分析速率。对于可接受的重合和 1000 颗粒 /s 的事件率,本发明的声学系统可以适应  $100 \mu\text{s}$  的通过时间,该范围大大改善了光子统计并且开启了更长效光探针的应用领域。声学聚焦细胞计数器中的颗粒分析的速率可以达到 70,000 颗粒 /s,并且当定期调节聚焦流的速度时可达 100,000 细胞 /min 以上。

[0104] 对于  $300 \mu\text{m}$  直径的声学聚焦毛细管、通过探测激光器的  $10 \mu\text{s}$  通过时间和 10,000

颗粒/s 的颗粒速率,需要大约  $2.8 \times 10^5$  细胞/ml 或更小的浓度来实现小于每十个时间窗口中一个的平均事件率。根据泊松统计,这对应于时间窗口将包含一个以上事件的大约 1% 的概率,意味着大约 10% 的事件将是重合的。该 10,000 颗粒/s 速率的例子所需的容积流速为大约 2.1ml/min。对于这类的 300  $\mu$ m 直径毛细管,大约  $2.8 \times 10^5$  细胞/ml 的浓度对于具有大约 10% 重合事件的最大吞吐量是最佳的。对于更大颗粒或更大激光束,或者如果期望更少的重合事件,可以通过减小浓度来降低重合事件。在比以 10  $\mu$ l/min 的样本速率运行的非声学细胞计数器需要更多时间来处理样本之前,以 2.1ml/min 的流速在声学细胞计数器上运行的样本可以稀释达到 210 倍。因此,使用简单的提前稀释,对于达到大约  $6 \times 10^7$  细胞/ml 的浓度,声学细胞计数器可以在比非声学细胞计数器更高的吞吐量下操作。 $6 \times 10^7$  细胞/ml 浓度的样本可以在 1000 细胞/s 的最大速率下进行常规处理。大约 10  $\mu$ l/min 的输入速率典型地稀释大约 20 倍以达到用于声学细胞计数器的最佳浓度。通过在 2ml/min 下运行,可以使用声学聚焦细胞计数器以非声学细胞计数器的速率的近 10 倍速率分析颗粒。在一些实施例中,可以在非声学细胞计数器的速率的至少 2 倍、至少 4 倍、至少 5 倍、至少 8 倍或至少 15 倍的速率下分析颗粒。如果用户偏好利用通过激光器的更长通过时间,则样本可以减慢到 0.2ml/min,其中它将具有类似于非声学细胞计数器的颗粒分析速率,但是具有更长通过时间,而这则开启了更长效光探针的应用领域。

[0105] 稀释用过量抗体染色的样本会减小溶液中自由抗体的浓度,由此减小背景信号并且增加灵敏度。因此有可能在没有离心冲洗的情况下执行灵敏测定,同时仍然保持相对高的分析速率,如果稀释因数足够高的话。作为替换,可以增加染色抗体的数量以便更快地驱动染色反应并且然后可以快速地稀释以减小非特异性结合。这能够得到快得多的总 workflow。通常需要 15 分钟培育和 15 分钟离心的样本潜在地能仅在 2 分钟内进行。如果例如 2  $\mu$ l 样本用总抗体染色浓度是用于 15 分钟培育的 10 倍的染色浓度进行染色,则染色可以在仅仅 2 分钟的很短时间内完成,在这之后它被稀释 500 倍达到 1ml 并且抗体浓度是正常染色浓度的 50 分之一。1ml 样本可以在 1000  $\mu$ l/min 的样本输入速率下在仅 1 分钟内被分析。

[0106] 图 28A 是根据本发明的示例性实施例的细胞被声学集中以形成在声学细胞计数器中流动的绳状结构的血液的照片。图 28B 是细胞声学地集中在声学细胞计数器中的单行线内的更为稀释的血液的照片。图 28B 中的细胞充分集中以致导致许多重合散射事件,但是使用类似样本的紫光激发的散射高度数据仍然能够分辨不同的白血细胞群体彼此。如果细胞浓度减小到使得绳状结构变为密集线,则可能继续使用散射以通过散射测量来区分白细胞群体和红细胞。如果使用仅染色期望群体的荧光标记物(例如指示有核细胞的荧光 CD45 抗体或 DNA 染料),则该线中的细胞间隔会比重合事件通常可接受的间隔密得多。

[0107] 图 29 是光谱图,显示了紫光激发 Pacific Blue™ 荧光团的激发和发射光谱。它显示了 405nm 紫光激光器激发和可以与 Pacific Blue™ 荧光团组合用于自发荧光校正的窄带通滤光器(415/10)。可以在接近自发荧光的峰值发射(接近 430nm 的峰值发射)的紧密色带中收集自发荧光,但是在较低 Pacific Blue™ 荧光的区域中(接近 455nm 的峰值发射)

[0108] 图 30 示出了根据本发明的示例性实施例的将 0.07%CD34 阳性细胞的罕见事件群体检测作为活 CD45 阳性细胞的亚群。大约八百个 CD34 阳性 KG-1a 细胞被掺入从正常供体收集的 100  $\mu$ l 全血中。样本用 CD45Pacific Blue™ 轭合物和 CD34 藻红蛋白轭合物标记。在

培育之后,加入高产溶解溶液进行红血细胞溶解,并且加入**SYTOX® AADvanced™**死细胞染色剂进行标记。细胞在具有上游声学聚焦和下游流体动力学聚焦的声学聚焦细胞计数器上以高吞吐速率设置(200  $\mu$  l/min)进行分析并且收集总共大约 200,000 个事件。通过选通**SYTOX® AADvanced™**阴性细胞并在随后考虑 CD45 相比于 CD34 事件而从分析中去除死细胞。

[0109] 图 31A 和 31B 分别显示了声学聚焦系统中和仅流体动力学聚焦系统中的溶解全血的前向散射(FSC)相对于侧向散射(SSC)的绘图。图 31A 显示了以 100  $\mu$  l/min 的样本输入速率在声学聚焦系统中以 405nm 激发的溶解全血的 FSC 相对于 ZSC 的绘图。图 31B 显示了以 15  $\mu$  l/min 的相同输入速率在流体动力学聚焦系统中以 488nm 激发的相同绘图。使用 405nm 激光器(紫光)作为主激光线收集 FSC 和 SSC 两者。图 31A 显示了相对于图 31B 的群体之间的更大分离,以及看上去与死细胞一致的附加细胞群体的可能创建。

[0110] 图 32A 和 32B 显示了使用分别与上述图 31A 和 31B 相同的系统和参数获得的 Jurkat 细胞的 FSC 相对于 SSC 的绘图。再次地,图 32A 显示了相对于图 32B 的群体之间的更大分离,显示了声学聚焦系统的提升的性能。

[0111] 图 33 示出了根据本发明的示例性实施例的声学流式细胞计量系统的示意图。系统 3000 具有包含通过毛细管 3006 泵送的样本 3004(可能包括一个或多个罕见事件颗粒的颗粒)的样本管 3002。邻近毛细管 3006 布置的压电元件 3008 可以在处理器 3022 的控制下由控制电路 3009 操作,并且可以基于例如包括尺寸和密度的颗粒性质施加声能以声学聚焦和 / 或分离颗粒。经声学聚焦的颗粒随后可以进入探询区 3010,在那里它们穿过探询源 3012 的光束(例如被高度聚焦的激光束或者两个或更多个激光束),并且它们中的一些或全部可以在废物部 3014 被收集。由探询源 3012 与颗粒的相互作用导致的散射光可以由收集透镜和光学收集块 3016 收集,并且可以使用与数据采集模块 3012 和处理器 3022 互连的光电倍增管阵列 3018 进行分析。

[0112] 图 34 示出了根据本发明的示例性实施例的声学流式细胞计数器中的声学聚焦毛细管的示意图以显示压电元件对颗粒的影响。样本 3004 中的颗粒 3001a 和 3001b 在声学聚焦毛细管 3006 中的背景或载体流体 3003 中移动。可以是压电陶瓷元件的压电元件 3008 将颗粒 3001a 声学聚焦到内部同轴流 3030 中并且将颗粒 3001b 聚焦到外部同轴流 3032 中。

[0113] 图 35 示出了根据本发明的示例性实施例的声学流式细胞计数器中的光学收集块的一部分。光学收集块 3016 包括具有第一激光器 3040(例如 405nm 紫光激光器)和第二激光器 3042(例如 488nm 蓝光激光器)的探询区 3010。由激光器 3040 和 3042 发射的光束进入束成形光学器件 3044 的布置中,所述束成形光学器件将它们紧密地聚焦到颗粒 3001a 的经声学聚焦的同轴流上(图 34)。当颗粒 3001a 穿过激光束时,散射光由聚光透镜 3046 收集并且在传到探测器阵列 3018(图 33)之前进入光学收集块 3048(图 36)。当与长通过时间结合时具有或不具有脉冲的 405nm 波长可以是很有用的,并且尤其有用于可用于多色测定的量子点的激发。也可以使用其它波长,例如包括 640nm。相同颗粒可以由两个不同的激光器分析。较强的激光器可以用于分析较暗的颗粒,而不同的、较弱的激光器可以用于较亮的颗粒。单一的较弱的激光器也可以与增加的通过时间一起用于信号积分,并且这类激光器还可以通过在不同时间施加更强和更弱的脉冲而在脉冲调制系统中使用。

[0114] 两个激光器的使用有助于改善自发荧光和背景变化问题并且通过减小信号和背

景的变化增加信噪比。例如,第一激光器可以在激发激光器的波长之上激发自发荧光,并且在该波长之上检测到的信号可以用于估计预期用于主检测激光器的自发荧光贡献。这可以用具有紫光激光器和蓝光激光器或仅仅具有紫光激光器或具有激发一个以上颜色的紫光激光器(如果存在有监测自发荧光的独立色带)的系统完成。可以仅监测蓝色荧光通道,并且然后可以减去其它通道中的预期贡献。也可以使用红光激光器。对于具有长寿命探针的脉冲或调制系统,可以测量与长寿命探针的初始输出组合的自发荧光的短寿命贡献。也可以测量并且反算自发荧光衰减之后的长寿命探针的荧光以确定所有通道中的自发荧光贡献。

[0115] 根据本发明的示例性实施例,可以使用**Qdot®** 525、585、655 和 800 和单一紫光二极管激光器执行仅具有自发荧光补偿的四色测定。如果加入第二激光器,例如 650nm 或 780nm 激光二极管,则能够加入实际上无补偿的具有更多颜色的其它组合。例如,可以加入在 780nm 下被及有效激发的**Qdot®** 525、565、605、705 和 Alexa **Fluor®** 750。也可以使用其它染料组合,也可以使用其它激光器或二极管,包括 473nm DPSS 蓝光激光器、488nm 波长激光器和绿光 DPSS 模块。如果例如休止期为 1  $\mu$  s 并且使用具有 10ns 脉冲的四个不同的激光器,则每微秒触发一个激光器,并且不同波长的脉冲每 250ns 撞击靶部。每个激光器的第二低功率脉冲可用于扩展动态范围(最亮的信号可从低功率脉冲量化,最暗信号则从高功率脉冲量化)。在 405nm、532nm、650nm 和 780nm 下使用激光器,使用 405nm 自发荧光和 Pacific Orange™, 532nm-PE 或 Cy3、635nm-Alexa **Fluor®** 647 和 780nm-Alexa **Fluor®** 790 可以实际上无补偿地监测四种颜色和自发荧光,虽然由于在 405nm 下 PE 有一些激发并且在 635nm 下 Alexa **Fluor®** 790 有一些激发,因此可能需要略微补偿。

[0116] 图 36 示出了根据本发明的示例性实施例的声学流式细胞计数器中的光学数据收集块的示意图。来自激光器 3040 和 3042 的散射光 3050 由聚光透镜 3046 收集,以箭头 A 的方向进入收集块 3048,并且行进到一对空间滤光针孔 3052,其中的一个由反射镜(未显示)背衬,由此将光束 3050 分离为初级光束 3054 和次级光束 3056。初级光束 3054 进入准直透镜 3060 并且横越分束器 BS1、BS2 和 BS3 和关联的聚焦透镜以进入检测器阵列 3018 (图 33) 中的侧向散射通道 3062 以及荧光通道 FL4、FL5 和 FL6。次级光束 3056 进入准直透镜 3070 并且横越反射镜 3072 和分束器 BS5 和 BS4 和关联的聚焦透镜以进入检测器阵列 3018 中的荧光通道 FL1、FL2 和 FL3。

[0117] 图 37 示出了根据本发明的示例性实施例的声学流式细胞计数器中的射流系统的示意图。在系统 3100 中,泵部分 3702 中的样本泵 3102 将来自样本管 3002 的样本流体 3004 (图 34) 泵送到样本部分 3705 中的歧管 3104 并且在经过用于检测样本线中的空气的存在的气泡传感器 3008 之后到达隔膜泵 3106。因此,可能不需要做预定容积样本抽取,并且样本可被抽取至样本结束状态,原因是在样本抽取阶段内检测到空气将标志样本的结束。气泡传感器 3008 可以基于各种模态,包括可以确定空气相对于流体样本的存在的超声、阻抗、电容、光学或任何其它类型的传感器模态。歧管 3014 中的样本流体然后可以被泵送到下歧管部分 3703 中的下歧管 3110 以进入声学聚焦毛细管 3006。鞘液泵 3124 将保持在容器部分 3701 中的鞘容器 3120 中的鞘液 3205 (图 38) 泵送到鞘缓冲罐 3122 中并在随后被泵送到在毛细管 3006 的上歧管部分 3704 中的上歧管 3130 中。水和冲洗流体可以保持在水容器 3140 和冲洗流体容器 3150 中,并在必要时被泵送到系统中,同时在废物容器 3160 中进

行废物收集。

[0118] 图 38 示出了根据本发明的示例性实施例的具有上游声学聚焦并跟随有下游流体动力学聚焦的单换能器声学聚焦毛细管的示意图。包括颗粒 3204(可能包括一个或多个罕见事件颗粒)的样本流体流动通过毛细管 3206。单换能器 3208 然后可以将颗粒 3204(作为 3201)沿着毛细管 3206 的大致中心轴线声学聚焦到第一区域中。这可以在任何流体动力学聚焦之前进行。鞘液 3205 然后可以用于围绕经声学聚焦的样本流体和颗粒流动并且进一步将流体和颗粒 3201 流体动力学地聚焦到第一区域的下游的第二区域中。使用用于上游声学聚焦的一个以上换能器是可行的,但是优选单换能器。同样地,在第一、上游声学聚焦相之后使用经声学 and 流体动力学两者聚焦颗粒 3201 的第二、下游双聚焦相也是可行的。然而优选地,颗粒首先被声学聚焦并于随后在声学聚焦位置下游的第二位置被流体动力学聚焦而不需要进一步声学聚焦,原因是这一组合提供相当令人惊叹的罕见事件检测能力。

[0119] 尽管可以代替流体动力学聚焦单独使用具有明显优点的声学聚焦,但是组合使用声学聚焦和流体动力学聚焦的某些配置是特别有用的。例如,组合声学/流体动力学聚焦可以抵抗外力以进一步稳定颗粒流的绝对位置;可以进一步固定经聚焦的颗粒流的焦点(这在样本被稀释或“粘性”细胞必须保持在较低浓度以防止聚集的情况下是特别有用的);并且可以有助于保证样本不会接触壁(这在一些应用中可能是重要的)。最后,意外证明在上游单独使用声学聚焦并且接着沿着相同通道在下游使用流体动力学聚焦产生优良性质,允许在相对较短时间内检测某些罕见事件,如以上示例性实施例中的一些所述。

[0120] 根据本发明的示例性实施例,样本泵 3102 和鞘液泵 3124 可以由处理器控制以调节毛细管 3006 中鞘液与样本流体的容积比,从而保持探询区中大致恒定的总颗粒速度。例如,鞘液与样本流体的容积比可以保持在从大约 1:10 至大约 100:1。在保持紧密聚焦颗粒流的同时调节样本输入速率的能力允许调节通过探询激光器的速度(和因此花费的时间)。更长的探询时间通过允许随着时间收集更多光子而允许更高灵敏度的测量。当颗粒分析系统只能控制样本流动时,对于指定样本浓度,可调节流速限制增加或减小颗粒分析速率的能力,原因是增加或减小样本输入速率必然增加或减小通过时间。通过包括响应样本输入调节的鞘流动使得总流体流动保持恒定,可以允许宽范围的样本输入速率而不改变总流体速度。然后,通过改变总流体速度,能够利用更长探询时间的优点。通过不加速颗粒和同轴鞘流动,通过声学流式细胞计数器的激光器探询区域的颗粒通过时间可以为常规流体动力学聚焦系统中的大约 20-100 倍。优选地,它们可以为至少 20  $\mu$ s、至少 25  $\mu$ s、至少 30  $\mu$ s、至少 35  $\mu$ s、至少 40  $\mu$ s、至少 60  $\mu$ s、至少 80  $\mu$ s 或至少 100  $\mu$ s。这可以允许更高灵敏度光学测量,同时保持类似的颗粒分析速率。

[0121] 图 39 示出了根据本发明的示例性实施例的可以调节声学流式细胞计数器中的前向散射孔径的阻挡杆装置的示意图。在前向散射光进入聚光透镜 3048 之前阻挡杆 3300 可以用于改变前向散射光的孔径。由激光器 3040 和 3042 发出的光束 3041 与颗粒的经声学聚焦流(流出图中纸面)相互作用。阻挡杆 3300 可以安装在圆柱形销柱 3302 的下侧和离轴位置使得自旋销柱 3302 改变它相对于散射激光束 3050 的传播的位置。一旦激光器与颗粒流对准,这允许操作者使阻挡杆 3300 与激光器 3040 和 3042 对准。可以通过改变阻挡杆 3300 的形状而改变前向散射器 3050 的孔径,这可以通过将轴环加入杆上而完成。销柱 3302 可以旋转以定位阻挡杆 3300,从而提供在大约 15° 至大约 23° 之间或大约 17° 至 21° 之间

或大约  $19^\circ$  的前向散射器 3050 的孔径  $\alpha$ 。

[0122] 图 40A-40F 示出了根据本发明的示例性实施例的将 0.050% 和 0.045%CD34 阳性细胞的罕见事件群体检测作为活 CD45 阳性细胞的亚群。其中,周围血液被染色并且以  $500 \mu\text{l}/\text{min}$  (图 40A-40C) 和  $1000 \mu\text{l}/\text{min}$  (图 40D-40F) 的流速以设在 500,000 个总细胞的停止门限使用具有上游声学聚焦和下游流体动力学聚焦的声学聚焦细胞计数器运行。图 40A 和 40D 显示了用 **SYTOX**<sup>®</sup> AADvanced<sup>™</sup> 死细胞染色剂染色的总细胞并且显示了活细胞门限。图 40B 和 40E 显示了在活细胞上选通的细胞。图 40C 和 40F 显示了在活 CD45 阳性细胞上选通的细胞。在  $500 \mu\text{l}/\text{min}$  的流速下,采集时间为大约 6 分 26 秒;检测到白血球的 0.050%CD34 阳性细胞;并且 CD34 阳性细胞的直接测量值为 0.07 细胞/ $\mu\text{l}$ 。在  $1000 \mu\text{l}/\text{min}$  的流速下,采集时间为大约 4 分 28 秒;检测到白血球的 0.045%CD34 阳性细胞;并且 CD34 阳性细胞的直接测量值为 0.05 细胞/ $\mu\text{l}$ 。

[0123] 图 41A-41D 示出了在非声学流式细胞计数器上和声学聚焦细胞计数器上运行的细胞检测的比较输出绘图。来自正常供体的周围血液掺杂有 CD34 阳性细胞和  $50 \mu\text{l}$  的 CountBright<sup>™</sup> 绝对计数小珠并且用于计算 CD34 计数。图 41A 和 41B 显示了在活细胞(图 41A)和 CD45 阳性细胞(图 41B)上选通的数据,其在仅仅流体动力学聚焦流式细胞计数器上运行。图 41C 和 41D 显示了在活细胞(图 41C)和 CD45 阳性细胞(图 41D)上选通的数据,其在根据本发明的示例性实施例的具有上游声学聚焦和下游流体动力学聚焦的声学聚焦细胞计数器上运行。使用仅仅流体动力学聚焦流式细胞计数器,采集时间为 13 分 49 秒;使用小珠导出的 CD34 阳性细胞计数为 8.01 细胞/ $\mu\text{l}$ ;并且不产生直接测量值。使用声学聚焦流式细胞计数器,采集时间为 1 分 17 秒;使用小珠导出的 CD34 阳性细胞计数为 7.91 细胞/ $\mu\text{l}$ ;并且 CD34 阳性细胞的直接测量值为 8 细胞/ $\mu\text{l}$ 。

[0124] 图 42 示出了根据本发明的示例性实施例的声学聚焦细胞计数器的各部件的示意图。示例性细胞计数器包括用于鞘液的第一流体路径 4205 和用于样本流体的第二流体路径 4209,第一流体路径包括鞘液 4208、鞘液过滤器 4207 和鞘液容器 4206,第二流体路径包括样本流体 4213、气泡传感器 4212、样本回路 4211 和毛细管组件 4210。鞘液和样本流体可以在流动室 4204 中流动并且第一激光器 4202 和第二激光器 4203 可以探测可能在样本流体中的颗粒。最后,一些鞘液和样本流体可以被送入废物容器 4201。

[0125] 本发明的实施例可以更快地分析罕见细胞事件;在更少的时间内运行更多的细胞而没有灵敏度的损失;检测细胞中抗原的弱表达;并且以更小的含糊性更清楚地分辨细胞群体。本发明的实施例可以提供对样本浓度、流速、可检测光子的数量、实验时间长度和样本吞吐量的有力控制。声学聚焦细胞计量术可以改变许多目前的细胞测定的执行方式,并且提供用于创建新细胞测定的机会。它可以使用例如 2MHz 以上的超声波以在没有高速或高容积鞘液的情况下将细胞定位到沿着流动通道中心轴线的单聚焦线中,并且可以与容积无关地集中细胞。声学聚焦可以利用细胞或颗粒相对于背景介质的物理差异,允许细胞保持紧密聚焦。声学聚焦可以用声能将细胞集中在流体的中心,这创建被分析样本浓度的相当大灵活性。更重要地,声学聚焦可以使细胞的对准与颗粒流速分离,因此可以在不破坏毛细管中细胞的聚焦的情况下增加或减小细胞的流速。该可调节流速的精确性可以有助于研究者确定被分析细胞的数量和细胞在经聚焦激光束中花费的时间量。声学流式细胞计量术的附加特征和优点可以在 Ward 等人的“Fundamentals of Acoustic Cytometry”, Current

Protocols in Cytometry, Supplement 49, 1. 11. 1-1. 22. 12 (2009) 中找到, 上述文献的完整公开通过引用被合并于本文中。

[0126] 在仅使用流体动力学聚焦的系统中, 样本核心由快速流动鞘液“夹持”, 并且鞘液的体积典型地是样本流体的 100 至 1000 倍。这样的大比率导致低样本输入速率, 这通常阻碍分辨率。然而根据本发明的示例性实施例, 先前经声学聚焦的样本可以在声学聚焦的下游进一步地被流体动力学地聚焦, 鞘液和样本流体之间的容积比可被显著地减小。例如, 该容积比可以减小到例如大约 50 比 1、40 比 1、30 比 1、20 比 1、10 比 1、9 比 1、8 比 1、7 比 1、6 比 1、5 比 1、4 比 1、3 比 1、或 2 比 1。该容积比也可以为大约 1 比 1、1 比 2、1 比 3、1 比 4、1 比 5、1 比 6、1 比 7、1 比 8、1 比 9、和 1 比 10。这些数字是示例性的并且也可以使用它们之间的其它分数比。优选地, 鞘液和样本流体之间的容积比可以在大约 10 比 1 至 1 比 10 之间或大约 5 比 1 至 1 比 5 之间。该系统可以使具有颗粒的流体样本以大约 200  $\mu$  l/min 至大约 1000  $\mu$  l/min 的样本流体输入速率在毛细管中的样本通道中流动并且使鞘液以大约 2200  $\mu$  l/min 至大约 1400  $\mu$  l/min 的鞘液输入速率在鞘流动通道中流动, 同时保持样本流体和鞘液的总输入速率恒定, 由此保证通过一个或多个探测激光器的颗粒的探测时间保持恒定, 与样本流体输入速率无关。该系统也可以使样本流体以大约 25  $\mu$  l/min 至大约 1000  $\mu$  l/min 之间的样本流速流动并使鞘液以大约 2375  $\mu$  l/min 至大约 1400  $\mu$  l/min 的鞘流速流动。该系统也可以使样本流体以至少 200  $\mu$  l/min 的样本流速流动并且使鞘液以至多 2200  $\mu$  l/min 的鞘流速流动, 同时将鞘液与样本流体的容积比调节到大约 11 比 1 至大约 1.4 比 1 之间的比率。该系统也可以使样本流体以至少 500  $\mu$  l/min 的样本流速流动并且使鞘液以至多 1900  $\mu$  l/min 的鞘流速流动, 同时将鞘液与样本流体的容积比调节到大约 3.8 比 1 至大约 1.4 比 1 之间的比率。

[0127] 根据本发明的实施例, 提供了一种流式细胞计数器, 包括: (1) 包括样本通道的毛细管; (2) 耦合至所述毛细管的至少一个振动产生换能器, 所述至少一个振动产生换能器被配置成产生声信号, 所述声信号引起所述样本通道内的声辐射压力以声学集中在所述样本通道中的流体样本流内流动的颗粒; 以及 (3) 包括紫光激光器和蓝光激光器的探测源, 所述紫光激光器和所述蓝光激光器被配置成与经声学集中的颗粒的至少一些相互作用以产生输出信号。

[0128] 在这样的流式细胞计数器中, 所述至少一个振动产生换能器可以包括压电装置, 所述紫光激光器可以具有大约 405 纳米的波长, 并且所述蓝光激光器可以具有大约 488 纳米的波长。此外, 所述毛细管还可以包括鞘流动通道, 所述鞘流动通道被配置成在由所述声辐射压力引起的所述颗粒的声学聚焦的下游使鞘液围绕所述流体样本流流动以流体动力学地集中所述流体样本流内的经声学集中的颗粒。此外, 这样的流式细胞计数器可以包括第一泵和第二泵, 所述第一泵被配置成使包括颗粒的流体样本以大约 200 微升每分钟至大约 1000 微升每分钟的样本流体输入速率在所述毛细管中的所述样本通道内流动, 所述第二泵被配置成使鞘液以大约 2200 微升每分钟至大约 1400 微升每分钟的鞘液输入速率在所述鞘流动通道中流动, 并且所述第一泵和所述第二泵被配置成保持在所述毛细管中流动的样本流体和鞘液的总输入速率恒定, 由此保证通过所述紫光激光器和所述蓝光激光器的经声学集中的颗粒的至少一些的探测时间保持恒定, 而与所述样本流体输入速率无关。

[0129] 这类流式细胞计数器还可以包括: 光学模块, 其收集来自所述探测源的输出信号;

检测器模块,其检测所述光学模块的输出信号;以及数据采集模块,其处理所述检测器模块的输出,并且这类流式细胞计数器还可以包括处理器,所述处理器被配置成控制所述至少一个振动产生换能器、所述检测器模块和所述数据采集模块中的至少一个。此外,这类流式细胞计数器可以包括在所述毛细管和所述光学模块之间的阻挡杆,所述阻挡杆可以附连到大致圆柱形的销柱,所述销柱可旋转以定位所述阻挡杆并且调节所述探测源的输出信号的输出孔径,并且所述探测源的输出信号的输出孔径在大约 17 度至大约 21 度之间。此外,所述光学模块可以包括收集来自所述探测源的输出信号的收集透镜,并且所述收集透镜的输出用空间滤光针孔装置分成两个光束,其中第一光束是来自所述紫光激光器的输出并且第二光束是来自所述蓝光激光器的输出。并且,所述检测器模块可以包括检测器,所述检测器检测来自所述紫光激光器输出的所述第一光束的前向散射信号和侧向散射信号。

[0130] 根据本发明的另一个实施例,提供了一种流式细胞计数器,包括:(1)毛细管,其被配置成允许包括颗粒的样本流体在其中流动;(2)第一聚焦机构,其被配置成将所述样本流体内的所述颗粒的至少一些声学聚焦在所述毛细管内的第一区域中;(3)第二聚焦机构,其被配置成将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体流体动力学地聚焦在所述第一区域的下流的所述毛细管内的第二区域中;(4)在所述毛细管中或下流的探测区,经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒的至少一些能够流动通过所述探测区;以及(5)至少一个检测器,其被配置成检测在所述探测区获得的关于经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒的至少一些至少一个信号。

[0131] 这类流式细胞计数器还可以包括样本流体泵和鞘液泵,所述样本流体泵被配置成使样本流体以大约 25 微升每分钟至大约 1000 微升每分钟之间的样本流速流入所述毛细管,所述鞘液泵被配置成使鞘液以大约 2375 微升每分钟至大约 1400 微升每分钟之间的鞘流速流入所述毛细管。此外,所述第一聚焦机构可以被配置成将所述第一区域中的经声学聚焦的颗粒的至少一些聚焦到从所述第一区域流动到所述第二区域的单行线,并且所述样本流体泵和所述鞘液泵可以被配置成保持在所述毛细管中流动的样本流体和鞘液的总速率恒定,由此保证通过所述探测区的经声学 and 流体动力学聚焦颗粒的至少一些探测时间保持恒定,而与样本流速无关。这类流式细胞计数器还可以包括样本流体泵和鞘液泵,所述样本流体泵被配置成使样本流体以大约 200 微升每分钟至大约 1000 微升每分钟之间的样本流速流入所述毛细管,所述鞘液泵被配置成使鞘液以大约 2200 微升每分钟至大约 1400 微升每分钟之间的鞘流速流入所述毛细管。

[0132] 根据本发明的另一个实施例,提供了一种使用流式细胞计数器检测罕见事件的方法,包括:(1)使包括颗粒的样本流体流入通道;(2)通过将声辐射压力施加到包含在所述通道内的第一区域而使得所述样本流体中的所述颗粒的至少一些声学聚焦在所述第一区域中;(3)通过使鞘液围绕所述样本流体流动将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体流体动力学地聚焦在所述第一区域的下流的第二区域中;(4)调节所述鞘液与所述样本流体的容积比以保持所述第二区域中或下流的探测区中的大致恒定的总颗粒速度;(5)分析所述探测区中的经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒的至少一些;以及(6)基于在所述探测区检测到的至少一个信号检测一个或多个罕见事件,所述一个或多个罕见事件选自下列:一个或多个罕见荧光事件、一个或多个罕见细胞类型以及一个或多个死亡细胞。

[0133] 这类方法还可以包括使所述样本流体以至少 200 微升每分钟的样本流速流动并

且使所述鞘液以至多 2200 微升每分钟的鞘液流速流动,并且调节所述鞘液与所述样本流体的容积比可以包括将所述鞘液与所述样本流体的容积比调节到大约 11 比 1 至大约 1.4 比 1 之间的比率。此外,这类方法可以包括使所述样本流体以至少 500 微升每分钟的样本流速流动并且使所述鞘液以至多 1900 微升每分钟的鞘液流速流动,并且调节所述鞘液与所述样本流体的容积比可以包括将所述鞘液与所述样本流体的容积比调节到大约 3.8 比 1 至大约 1.4 比 1 之间的比率。此外,所述方法可以包括保证所述经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒通过所述探询区的通过时间超过大约 20 微秒,或保证所述经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒通过所述探询区的通过时间超过大约 40 微秒。

[0134] 根据本发明的另一个示例性实施例,提供了一种包括计算机可读指令的计算机可读介质,当由声学流式细胞计量装置中的或与其通信的计算机执行时所述计算机可读指令控制所述装置以:(1)使包括颗粒的样本流体流入通道;(2)通过将声辐射压力施加到包含在所述通道内的第一区域将所述样本流体中的所述颗粒的至少一些声学聚焦在所述第一区域中;(3)通过使鞘液围绕所述样本流体流动将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体流体动力学地聚焦在所述第一区域的下流的第二区域中;(4)调节所述鞘液与所述样本流体的容积比以保持所述第二区域中或下流的探询区中的大致恒定的总颗粒速度;(5)分析所述探询区中的经声学 and 流体动力学聚焦颗粒的至少一些;以及(6)基于在所述探询区检测到的至少一个信号检测一个或多个罕见事件,所述一个或多个罕见事件选自下列:一个或多个罕见荧光事件、一个或多个罕见细胞类型以及一个或多个死亡细胞。

[0135] 这类计算机可读介质还可以控制所述装置以使所述样本流体在至少 200 微升每分钟的样本流速下流动并且使所述鞘液在至多 2200 微升每分钟的鞘液流速下流动,并且通过将所述鞘液与所述样本流体的容积比调节到大约 11 比 1 至大约 1.4 比 1 之间的比率调节所述鞘液与所述样本流体的容积比。此外,这类计算机可读介质还可以控制所述装置以使所述样本流体在至少 500 微升每分钟的样本流速下流动并且使所述鞘液在至多 1900 微升每分钟的鞘液流速下流动,并且通过将所述鞘液与所述样本流体的容积比调节到大约 3.8 比 1 至大约 1.4 比 1 之间的比率调节所述鞘液与所述样本流体的容积比。此外,这类计算机可读介质还可以控制所述装置以保证所述经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒通过所述探询区的通过时间超过大约 20 微秒,或保证所述经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒通过所述探询区的通过时间超过大约 40 微秒。

[0136] 根据本发明的实施例,提供了一种装置,其包括:(1)包括通道的毛细管;(2)耦合至所述毛细管的至少一个振动源,所述至少一个振动源被配置成将振动施加于所述通道;以及(3)包括 405nm 激光器的探询源,所述探询源被配置成具有输出,所述输出与在所述毛细管中流动的一个或多个颗粒相互作用。所述探询源还可以包括 488nm 激光器。所述振动源可以包括压电材料。所述振动源可以被配置成产生声信号,所述声信号引起所述通道内的声辐射压力,所述声辐射压力可以集中所述通道中的流体样本流内的多个选定颗粒,并且所述毛细管可以包括鞘流动通道以流体动力学地集中所述流体样本流内的选定颗粒。

[0137] 根据本发明的另一个实施例,提供了一种系统,其包括:(1)具有通道的毛细管;(2)耦合至所述毛细管的至少一个振动产生换能器,所述至少一个振动产生换能器被配置成产生声信号,所述声信号引起所述通道内的声辐射压力,其中所述声辐射压力集中所述通道中的流体样本流内的多个选定颗粒;以及(3)包括 405nm 激光器的探询源,所述探询

源被配置成具有输出,所述输出与所述选定颗粒中的至少一些相互作用以产生输出信号;(4)光学模块,其收集来自所述探测源的输出信号;(5)检测器模块,其检测所述光学模块的输出信号;以及(6)数据采集模块,其处理所述检测器模块的输出。所述振动产生换能器可以包括压电装置。所述探测源还可以包括 488nm 激光器,并且所述 405nm 激光器和所述 488nm 激光器都可以探测所述选定颗粒中的至少一些。所述毛细管可以包括至少一个鞘流动通道,并且所述鞘流动通道可以包括鞘液以流体动力学地集中所述流体样本流内的所述选定颗粒。所述系统可以包括处理器,所述处理器被配置成控制所述振动产生换能器、所述检测器模块和所述数据采集模块中的至少一个。它还可以包括在所述毛细管和所述光学模块之间的阻挡杆,并且所述阻挡杆可以附连到大致圆柱形的销柱,所述销柱可以是可旋转的,以定位所述阻挡杆并且调节所述探测源的输出信号的输出孔径。所述探测源的输出信号的输出孔径可以为大约  $19^\circ$ 。所述光学模块可以包括收集来自所述探测源的输出信号的收集透镜,并且所述收集透镜的输出用空间滤光针孔装置分成两个光束,其中第一光束是来自所述 405nm 激光器的输出并且第二光束是来自所述 488nm 激光器的输出。所述检测器模块可以包括检测器,所述检测器检测来自所述 405nm 激光器输出的所述第一光束的前向散射信号和侧向散射信号。所述系统可以包括泵,所述泵将样本流体从容器沿着样本流动路径移动到所述毛细管,所述样本流动路径可以包括气泡传感器,并且所述泵可以被配置成在大约  $200 \mu\text{l}$  每分钟至大约  $1000 \mu\text{l}$  每分钟的样本输入速率下将所述样本流体输入到所述毛细管中。所述系统还可以包括用于成像所述流体样本流中的颗粒的成像器。

[0138] 根据本发明的另一个实施例,提供了一种流式细胞计量系统,包括:(1)第一泵,其被配置成使包括颗粒的样本流体在毛细管中的第一通道中流动;(2)压电装置,其被配置成产生在平面方向上的声辐射压力以声学聚焦所述第一通道中的所述颗粒;(3)第二泵,其被配置成使鞘液在所述毛细管中的第二通道中在第二平面方向上流动以在所述第二平面方向上流体动力学地聚焦所述颗粒并且进一步聚焦所述颗粒;(4)探测源,其中来自所述探测源的输出会输出来自 405nm 激光器的第一光束和来自 488nm 激光器的第二光束,并且其中所述第一光束和所述第二光束与在所述毛细管中流动的所述颗粒的至少一些相互作用以产生输出信号;(5)光学模块,其收集来自所述探测源的输出信号;(6)检测器模块,其检测所述光学模块的输出信号;以及(7)数据采集模块,其处理所述检测器模块的输出。

[0139] 根据本发明的另一个实施例,提供了一种使用流式细胞计数器检测罕见事件的方法,其包括:(1)使包括颗粒的样本以  $25 \mu\text{l}$  每分钟至大约  $1000 \mu\text{l}$  每分钟之间的流速在流动通道中流动;(2)将所述样本中的所述颗粒的至少一些声学聚焦在包含在所述流动通道内的第一区域中;(3)将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体动力学地聚焦在所述第一区域的下流的第二区域中;以及(4)基于在探测区检测到的至少一个信号检测罕见事件,允许经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒的至少一些流动通过所述探测区。所述方法可以包括使所述样本以至少  $200 \mu\text{l}$  每分钟的流速或至少  $500 \mu\text{l}$  每分钟的流速流动。它还可以包括保证经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒通过所述探测区的通过时间超过大约 20 微秒,或超过大约 40 微秒。并且它可以包括检测罕见荧光事件、检测罕见细胞类型的一个或多个细胞和 / 或检测一个或多个死亡细胞。

[0140] 根据本发明的另一个示例性实施例,提供了一种包括计算机可读指令的计算机可

读介质,当由声学流式细胞计量装置中的或与其通信的计算机执行时所述计算机可读指令控制所述装置以:(1)使包括颗粒的样本以 $25\mu\text{l}$ 每分钟至大约 $1000\mu\text{l}$ 每分钟之间的流速在流动通道中流动;(2)将所述样本中的所述颗粒的至少一些声学聚焦在包含在所述流动通道内的第一区域中;(3)将包括所述至少一些经声学聚焦的颗粒的样本流体动力学地聚焦在所述第一区域的下流的第二区域中;以及(4)基于在探询区检测到的至少一个信号检测罕见事件,允许经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒的至少一些得以流动通过所述探询区。所述计算机可读介质还可以控制所述装置以使所述样本在至少 $200\mu\text{l}$ 每分钟的流速下或在至少 $500\mu\text{l}$ 每分钟的流速下流动。它还可以控制所述装置以保证经声学 and 流体动力学聚焦的颗粒通过所述探询区的通过时间超过大约20微秒,或超过大约40微秒。并且它可以控制所述装置以检测罕见荧光事件、检测罕见细胞类型的一个或多个细胞和/或检测一个或多个死亡细胞。

[0141] 根据本发明的另一个实施例,提供了一种用于流式细胞计量术的方法,包括:(1)使包括颗粒的样本流体流入流体通道;(2)将所述颗粒声学聚焦在所述流体通道的第一区域中;(3)将鞘液流动到在所述第一区域的下流的所述流体通道的第二区域中以进一步流体动力学地聚焦所述声学聚焦颗粒;(4)调节样本流体与鞘液的容积比以在所述第二区域中保持总颗粒速度大致恒定;以及(5)分析所述第二区域中的所述颗粒。

[0142] 根据本发明的另一个示例性实施例,提供了一种包括计算机可读指令的计算机可读介质,当由声学流式细胞计量装置中的或与其通信的计算机执行时所述计算机可读指令控制所述装置以:(1)使包括颗粒的样本流体流入流体通道;(2)将所述颗粒声学聚焦在所述流体通道的第一区域中;(3)将鞘液流动到在所述第一区域的下流的所述流体通道的第二区域中以进一步流体动力学地聚焦所述声学聚焦颗粒;(4)调节样本流体与鞘液的容积比以在所述第二区域中保持总颗粒速度大致恒定;以及(5)分析所述第二区域中的所述颗粒。

[0143] 可以在本发明的以上示例性实施例中的一个或多个中存在或检测或使用的罕见事件或罕见事件颗粒的例子包括干细胞(任何类型)、微小残留病细胞、四聚物、NKT细胞、胎母输血综合症细胞、死亡细胞、具有罕见荧光标记的细胞等,并且更一般地可以包括具有某些识别特性的任何识别颗粒或细胞或者颗粒或细胞的群体,将预料到所述识别特性仅仅存在于样本中总体颗粒或细胞的一小部分内。对于给定问题或应用可适用部分将当然取决于特定细胞或颗粒。例如,罕见识别群体可以表示具有颗粒或细胞的总数量的大约5%、或大约2.5%、或大约1%、或大约0.1%、或大约0.05%、或大约0.01%的颗粒或细胞。这些值仅仅是示例性的并且在它们中的任何两个之间的其它值也是可能的,也可以是更小的值。

[0144] 适合用在或用于本发明的以上示例性实施例中的一个或多个的测定的例子包括抗原或配体密度测量、凋亡分析、细胞周期研究、细胞增殖测定、细胞分选、染色体分析、DNA/RNA内容分析、药物吸收和外排测定、酶活性测定、荧光蛋白测定、基因表达或转染测定、免疫表型、膜电势分析、代谢研究、多重小珠分析、核染色检测、网状细胞和血小板分析、干细胞分析以及生存性和细胞毒性测定。

[0145] 适合用在或用于本发明的以上示例性实施例中的一个或多个的介质制剂的例子包括泛影酸(amidotrizoate);具有非离子表面活性剂的氯化铯,例如**Pluronic®**F68;在一些应用中有助于高粘性的化合物(例如甘油、右旋糖酐、涂覆有聚乙烯吡咯烷酮的纳米二

氧化硅);泛影酸(diatrizoate);甘油、重盐,例如氯化铯或溴化钾;含碘化合物;碘克沙醇(iodixanol);碘帕醇(iopamidol);碘克沙酸(ioxaglate);甲泛葡胺(matrizamide);甲泛影酸(metrizoate);纳米颗粒材料,例如带聚合物涂层的二氧化硅;**Nycodenz®**;葡聚糖(polydextran);聚蔗糖(polysucrose);盐水缓冲液;用蛋白、清洁剂或其它添加剂缓冲的盐水;与用于增加比重的添加剂组合而没有过度的盐分增加的盐和蛋白;以及蔗糖。

[0146] 适合用在或用于本发明的以上示例性实施例中的一个或多个的探针的例子包括包含 BFP 的染料、生物发光和 / 或化学发光物质、C 点、Ca<sup>2+</sup>/ 发光蛋白质、加载染料的纳米球、藻红蛋白和荧光素、与纯荧光素结合使用的荧光素 / 铽配合物、荧光蛋白、消光系数小于 25,000cm<sup>-1</sup>M<sup>-1</sup> (例如 Alexa **Fluor®** 405 和 430、APC-C7) 和 / 或量子效率小于 25% (例如钪、Cy3) 的标记物;镧系元素、镧系元素螯合物(尤其是使用铈和铽的螯合物)、镧系元素串联染料、LRET 探针、萤光素 / 萤光素酶、金属配体络合物、微生物特定探针、自然发生荧光物种(例如 NAD(P)H)、核酸探针、磷光体、光漂白敏感性或三重态倾向性染料(例如蓝色荧光蛋白)、藻红蛋白串联染料、倾向于非辐射态激发的探针(例如 Rhodamine Attot532 和 GFP)、在超过大约 50,000/cm<sup>2</sup> 的激光功率下抗光漂白的探针、寿命大于 10 纳秒的探针、**Qdot®** 产品、**Qdot®** 串联探针、拉曼散射探针、半导体纳米晶体、串联探针、铽络合物、铽荧光素络合物以及上转换磷光体。

[0147] 适合用在或用于本发明的以上示例性实施例中的一个或多个的二级试剂的例子包括使用配体(例如生物素、蛋白 A 和 G)的次级试剂,二次抗体、抗生蛋白链菌素、铈合到抗体或其它配体的紫外激发染料(包括紫光激发二次铈合物,例如铈合到抗生蛋白链菌素 / 生物素或蛋白 A/G 的 Pacific Blue™ 或 Pacific Orange™)以及在二次编排中使用的**Qdot®** 产品或半导体纳米晶体(例如作为抗生蛋白链菌素铈合物)。

[0148] 上述本发明的各种示例性实施例中的一个或多个可以与许多类型的环境和工业样本一起使用(尤其当感兴趣颗粒是罕见的并且通常需要相当大的浓度时)。例如,它们可以用于从城市用水、特定核酸探针和其它微生物探针、包括饮料、牛奶、啤酒、嗽口水等的各种食品的类似微生物试验处理或分析微生物;从而使环境和工业分析物从诸如染色探针的试剂分离;从而分析在某些工业过程(例如用于复印机和打印机的油墨生产和巧克力制造中的质量控制)中重要的颗粒的形状和粒度;从而从废物流或馈送流集中和 / 或去除颗粒;从而延长某些过滤器的寿命;从而从加工流体去除金属、陶瓷或其它微粒或从废油(例如机油和食用油等)去除微粒。

[0149] 以上方法中的任何一个可以用处理器和数据库自动化。包含指令的计算机可读介质可以导致数据处理介质(例如计算机系统)中的程序执行以上示例性实施例中所述的任何一个或多个步骤。

[0150] 可以通过加入或替换上面在前述示例性实施例中描述的一般或具体描述的部件和 / 或物质和 / 或步骤和 / 或操作条件同样成功地重复前述的示例性实施例。尽管特别地参考以上示例性实施例详细地描述了本发明,但是其它实施例也是可能的并且在本发明的范围内。本领域的技术人员通过考虑说明书和附图以及在说明书和附图中描述的本发明的实施将显而易见本发明的变型和修改。

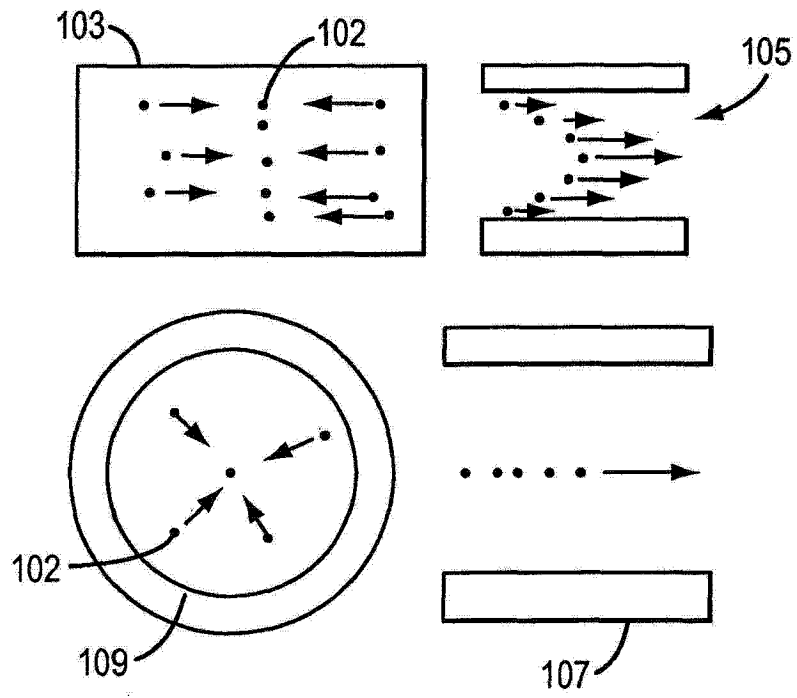


图 1

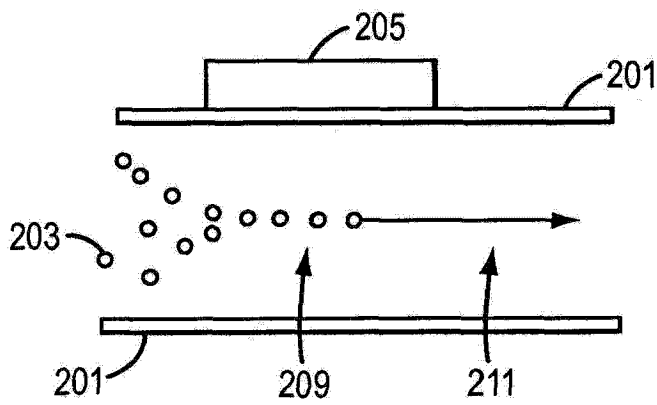


图 2A

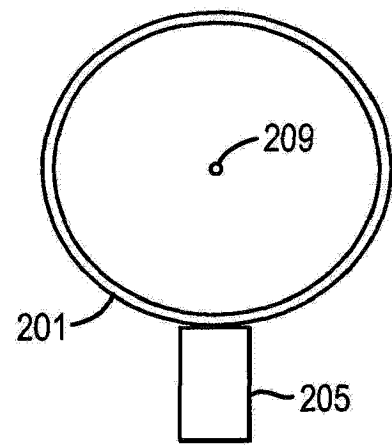


图 2B

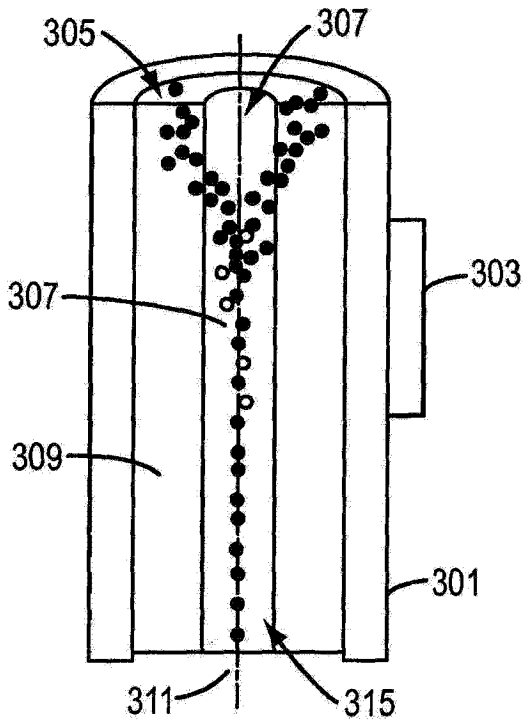


图 3

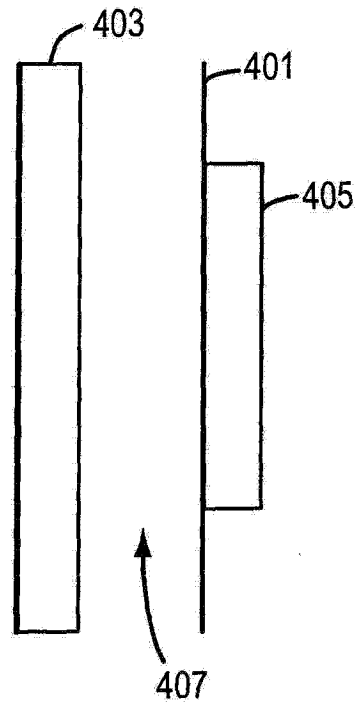


图 4A

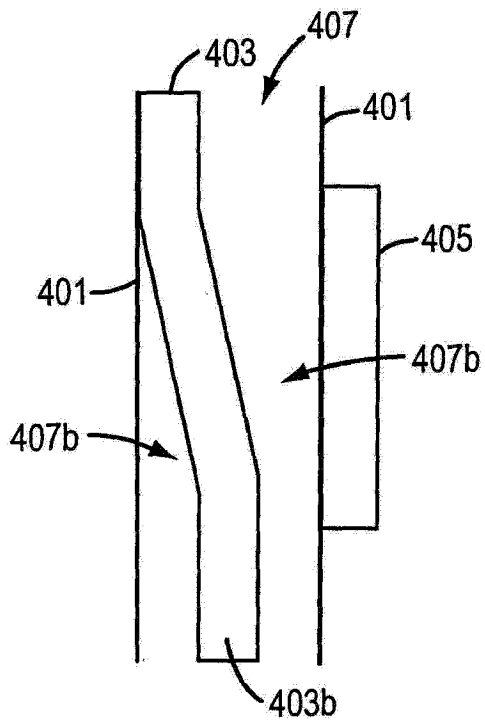


图 4B



图 5A

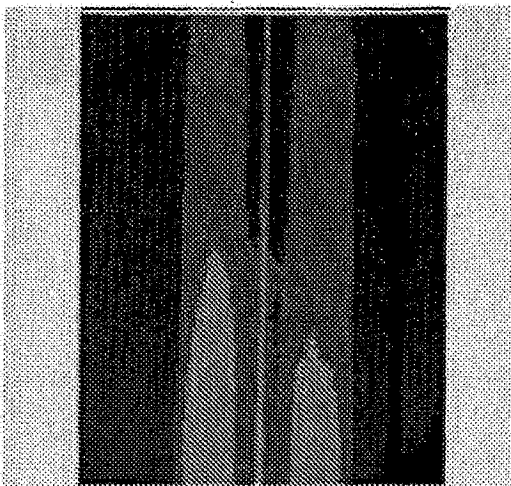


图 5B

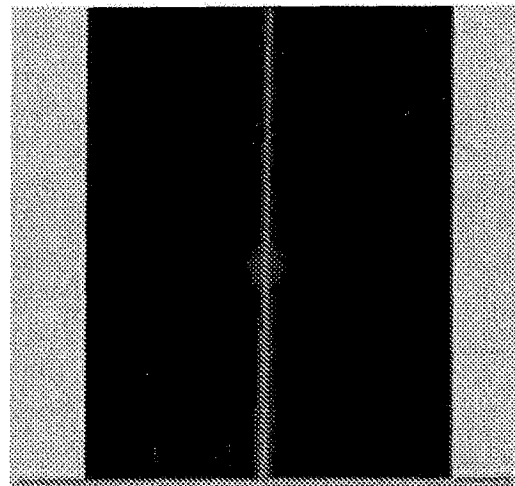


图 5C

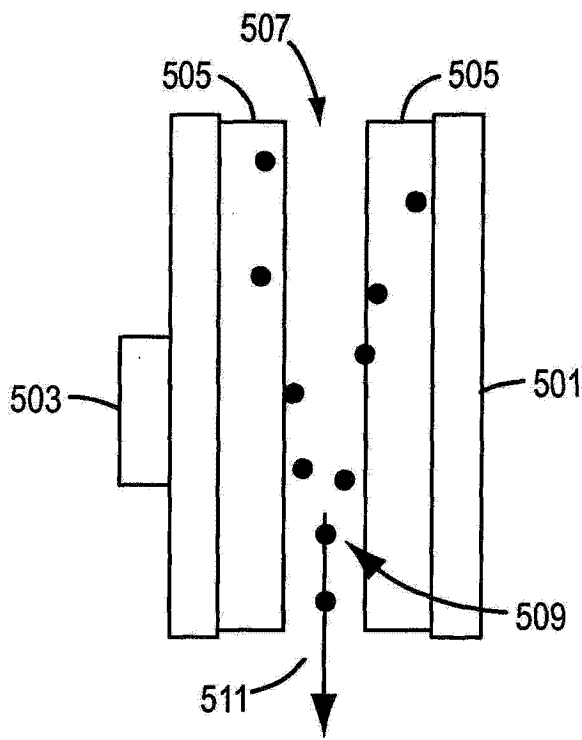


图 5D

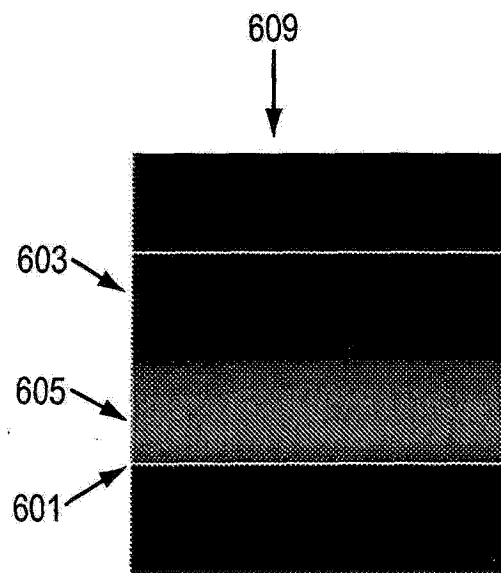


图 6A

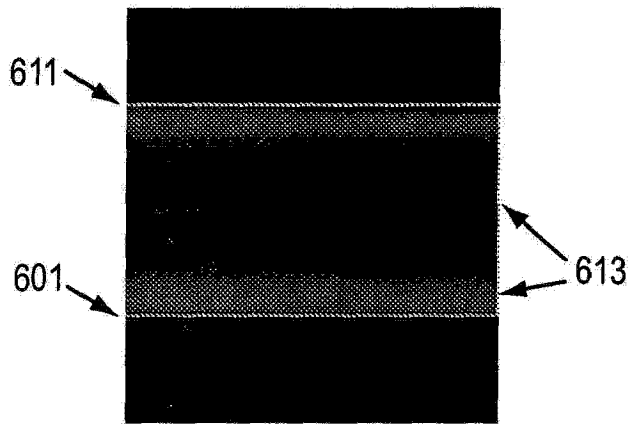


图 6B

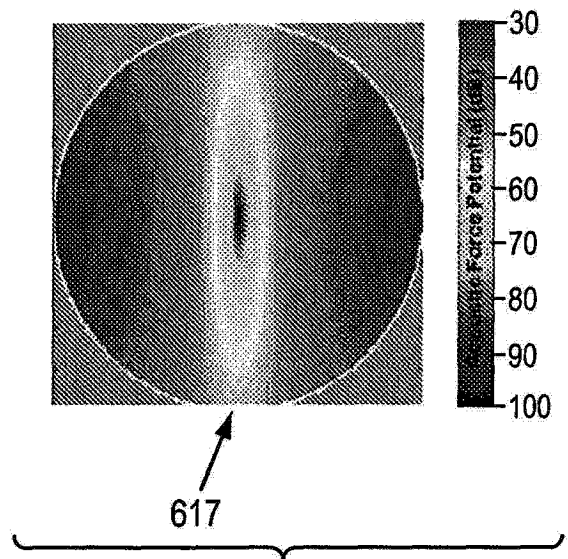


图 6C

700a

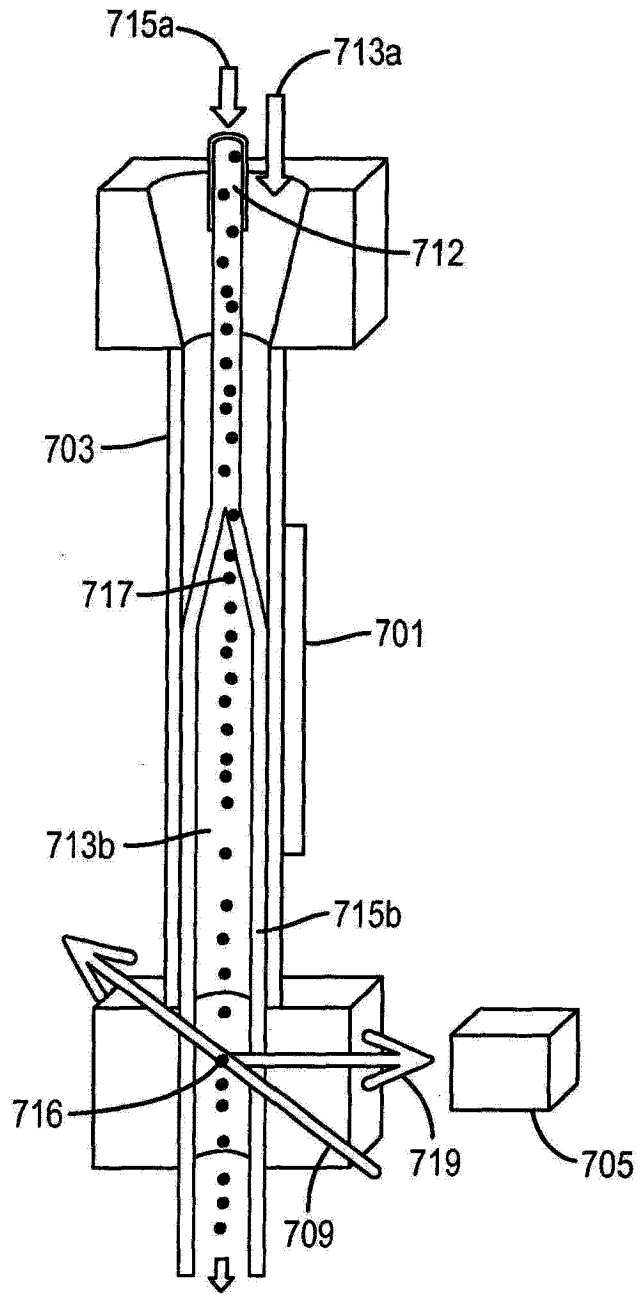


图 7A

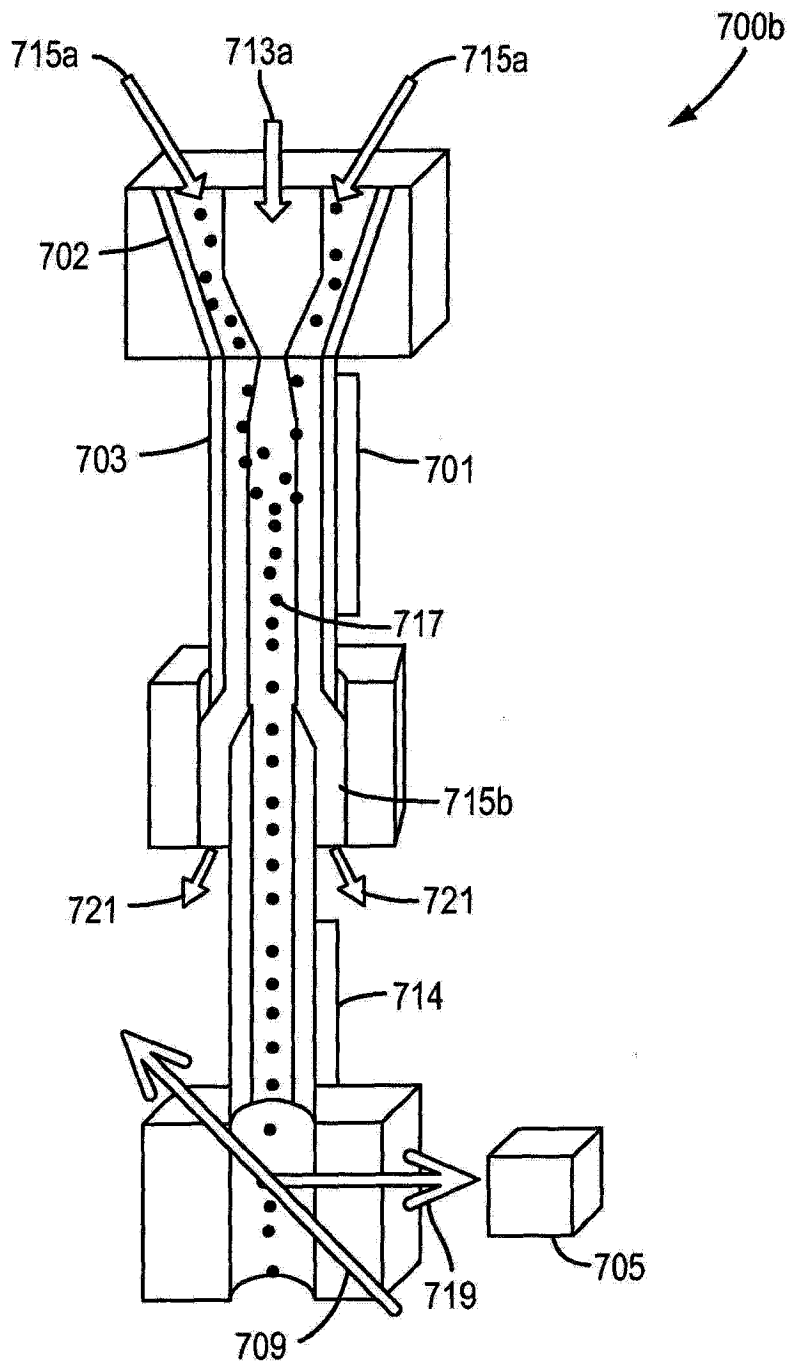


图 7B

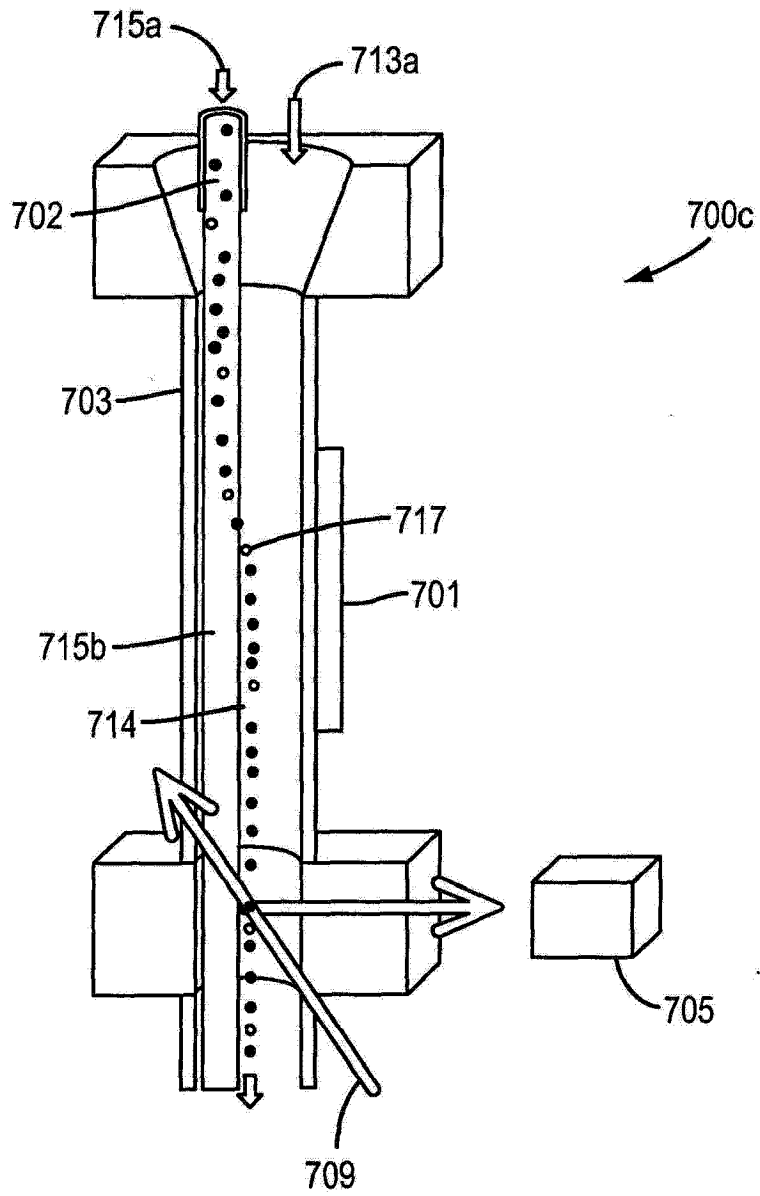


图 7C

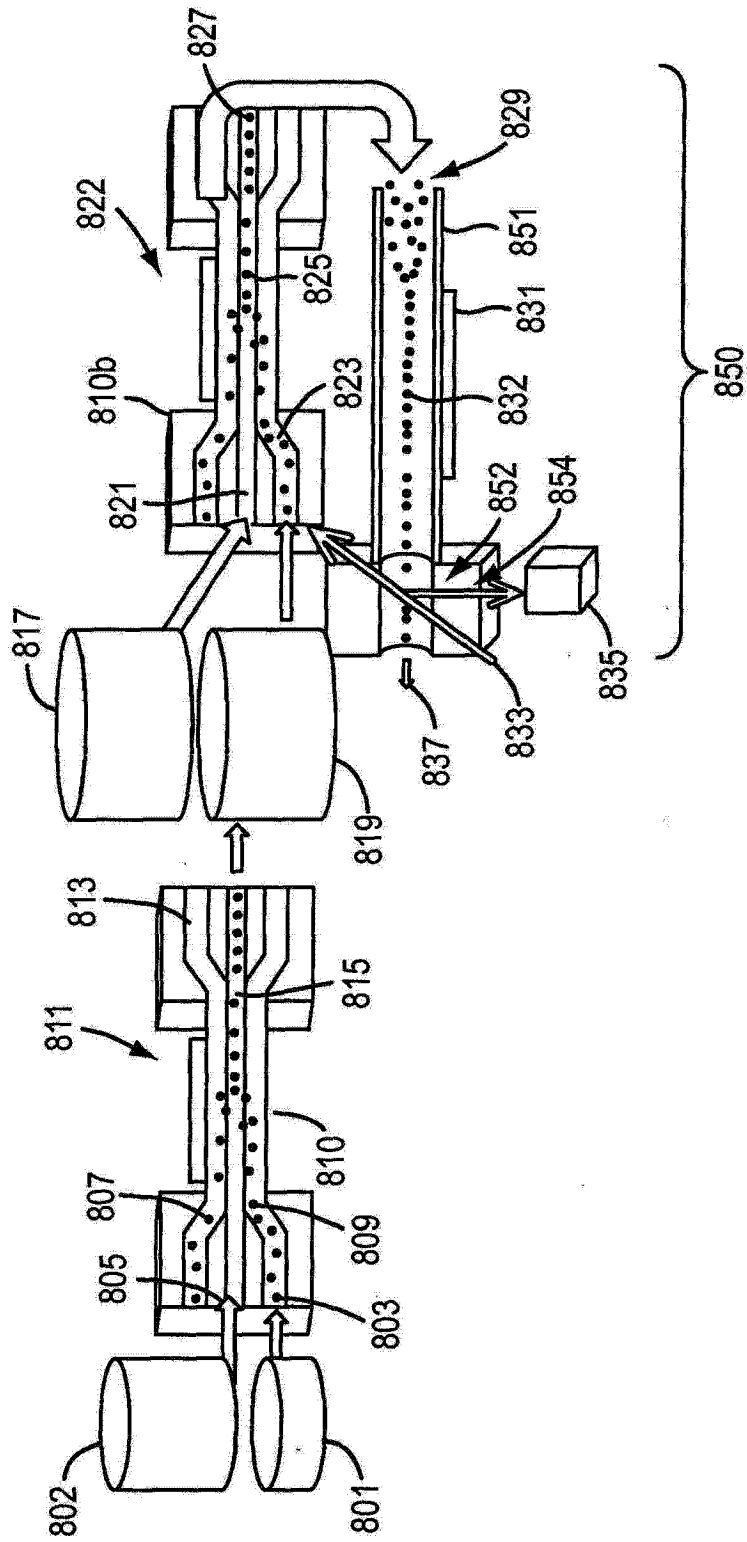


图 8

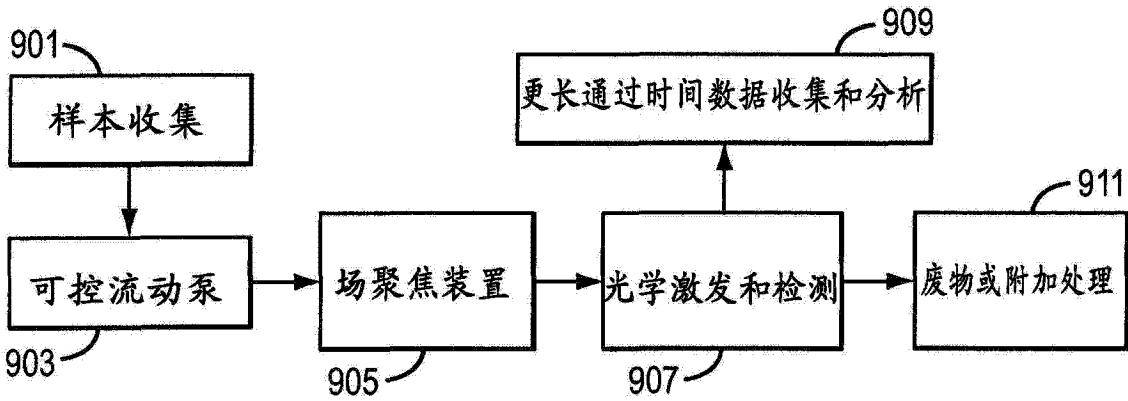


图 9

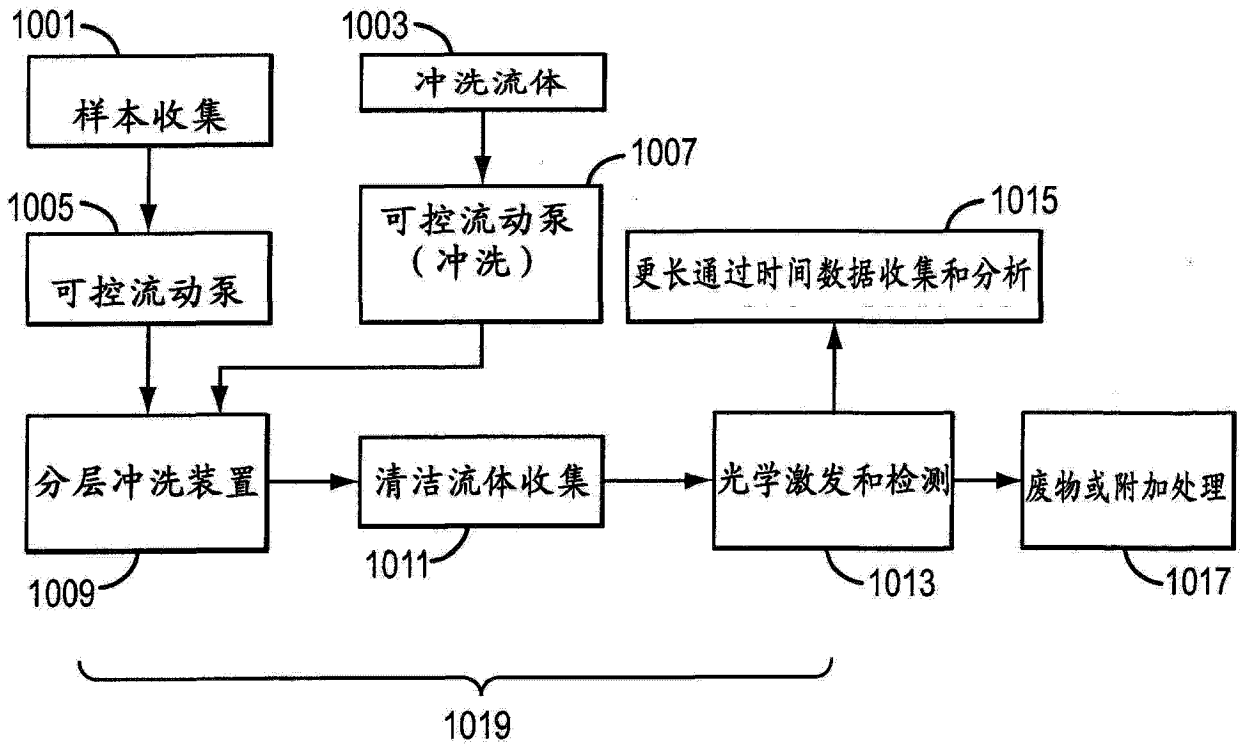


图 10

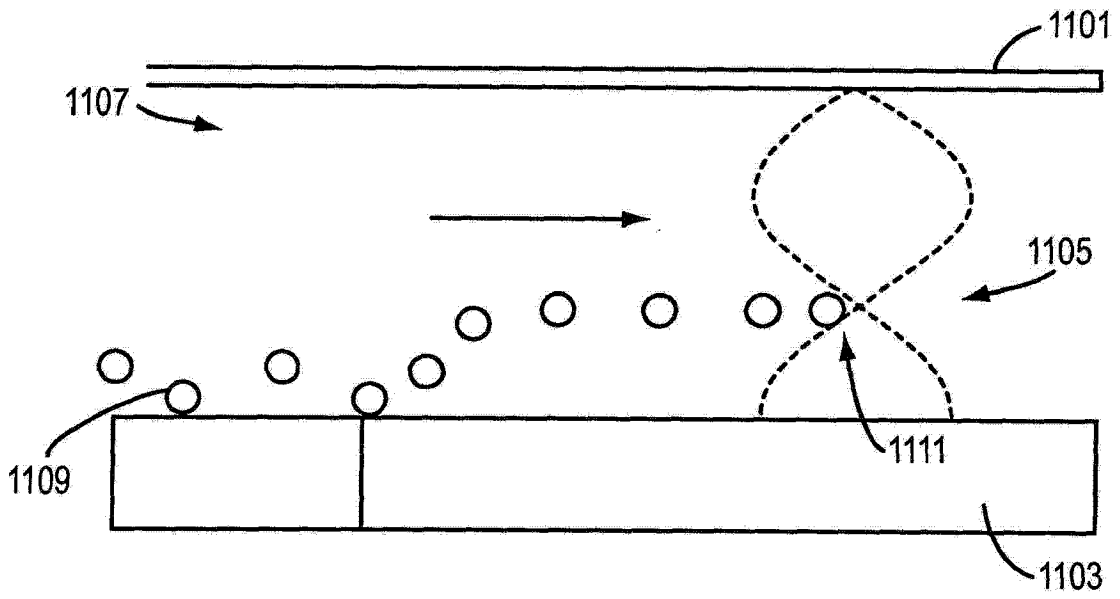


图 11

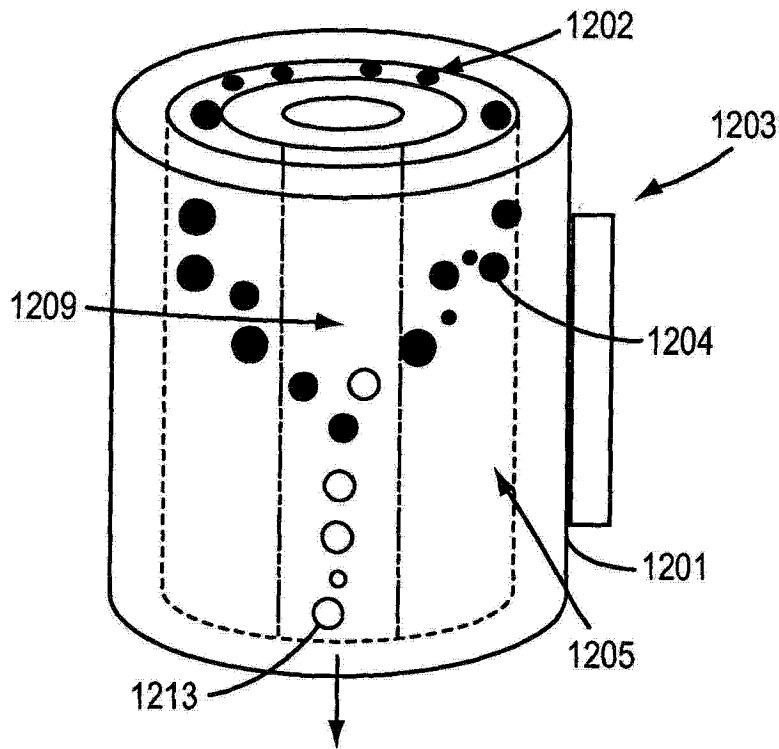


图 12

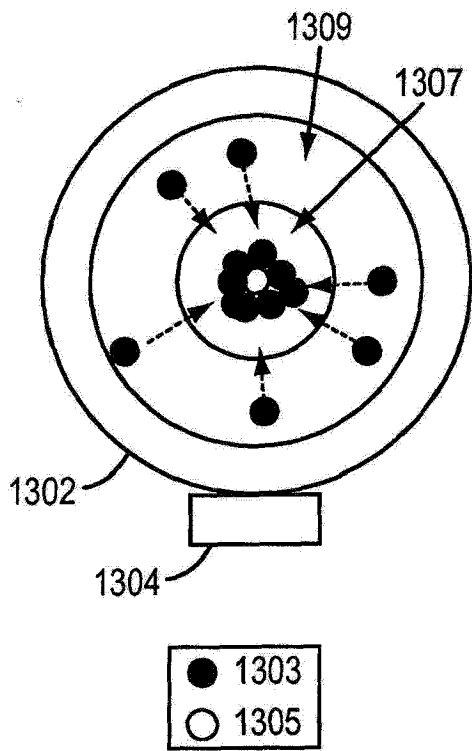


图 13A

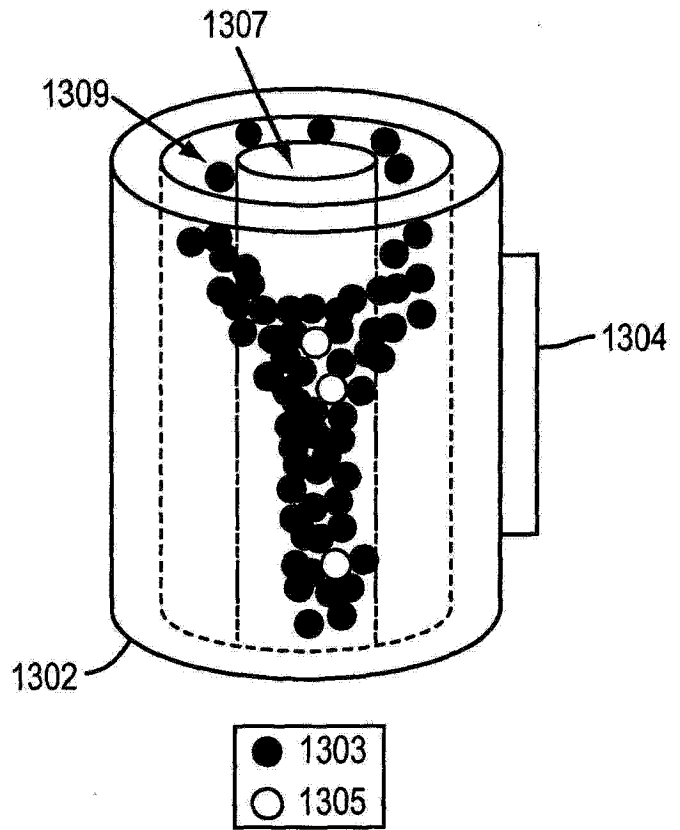


图 13B

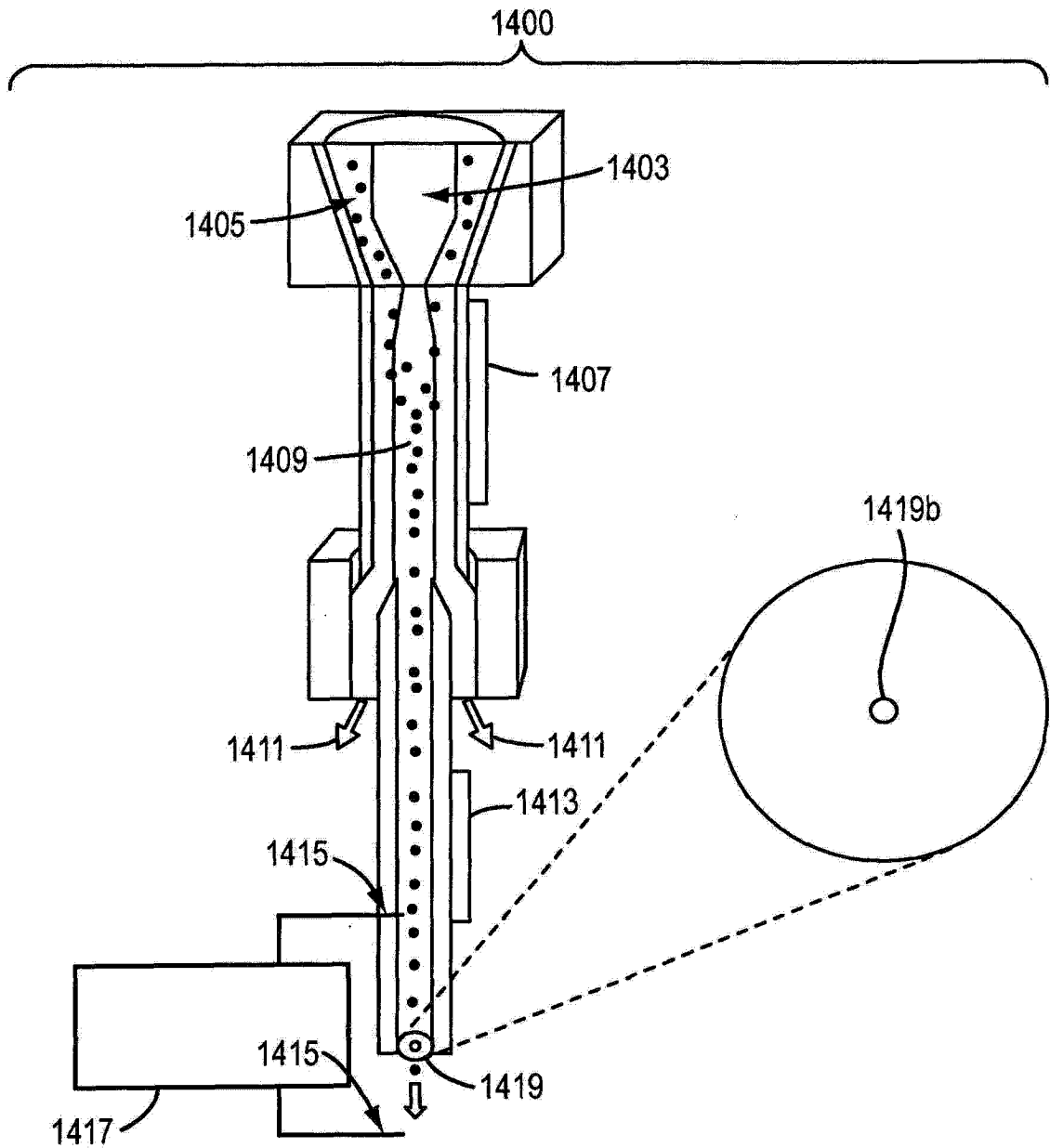


图 14

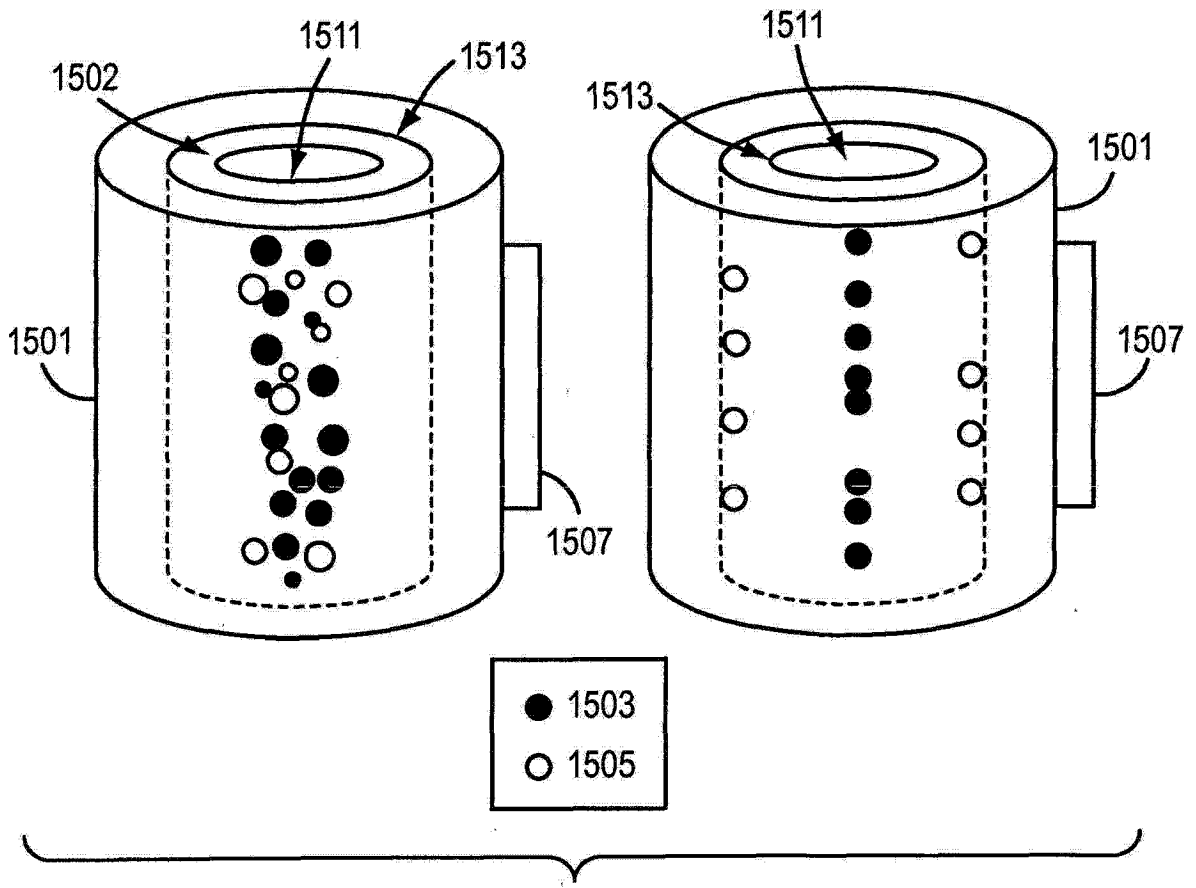


图 15

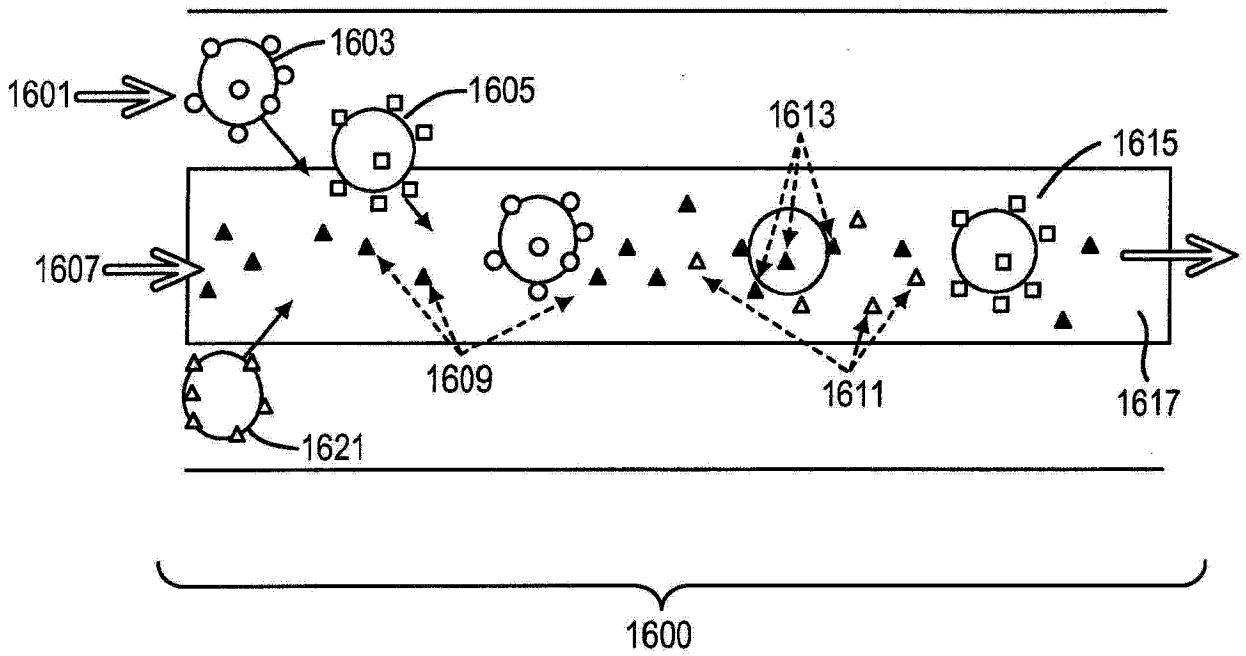


图 16

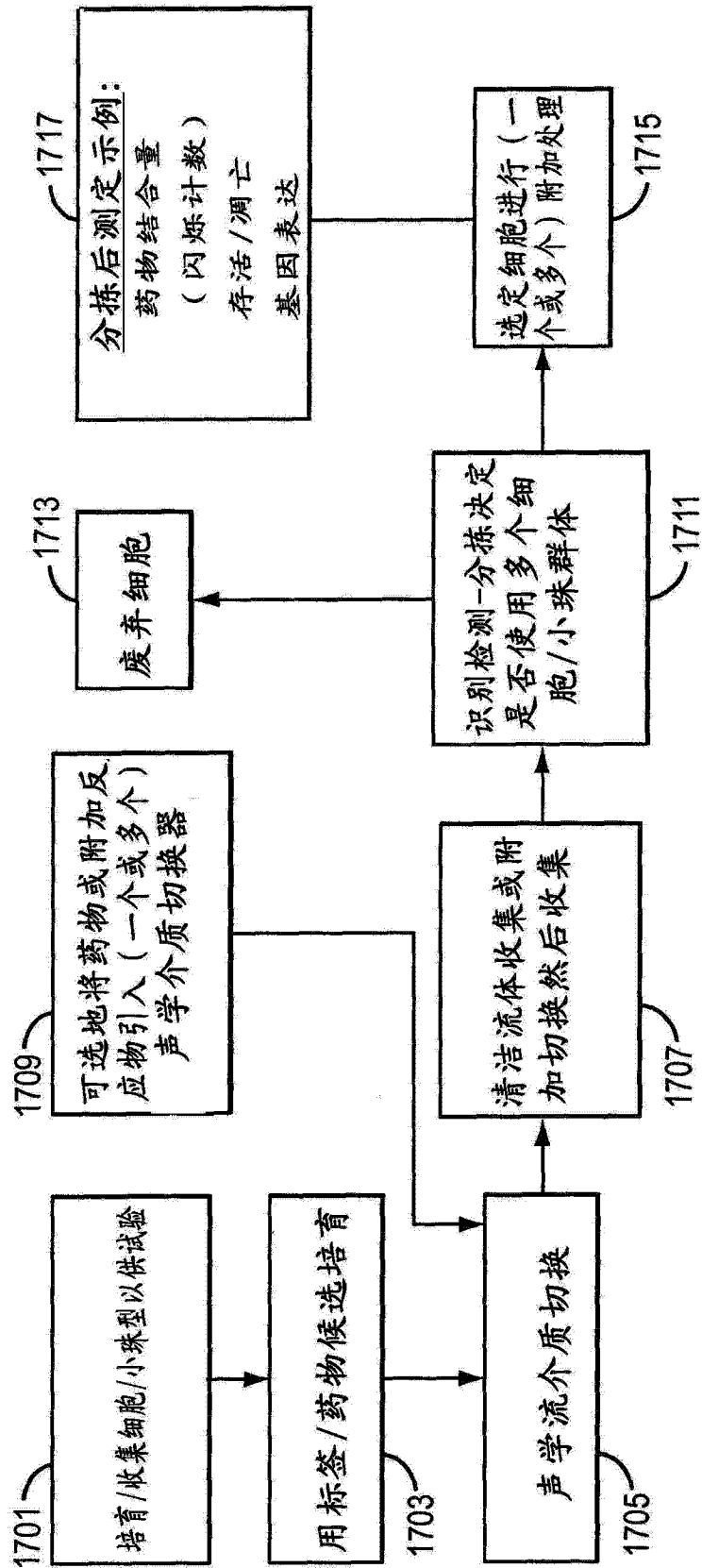


图 17

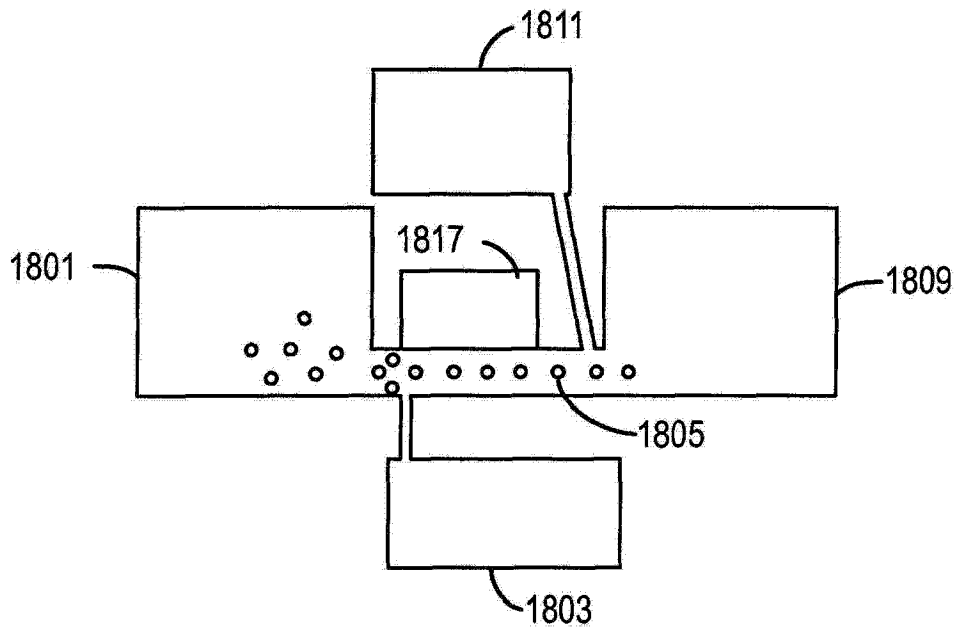


图 18

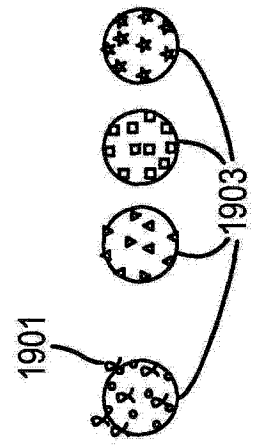


图 19A

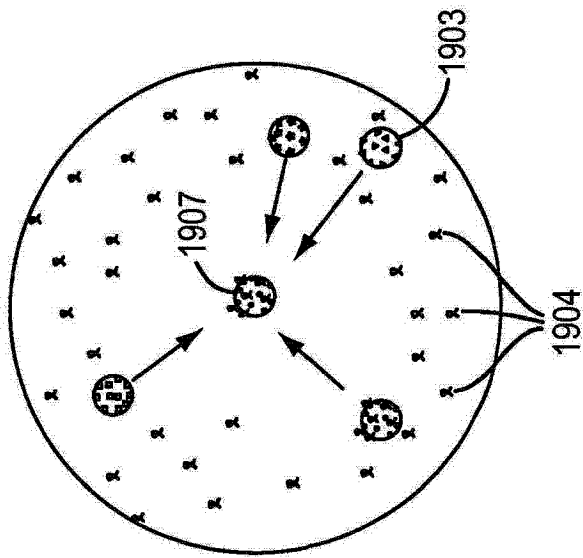


图 19B

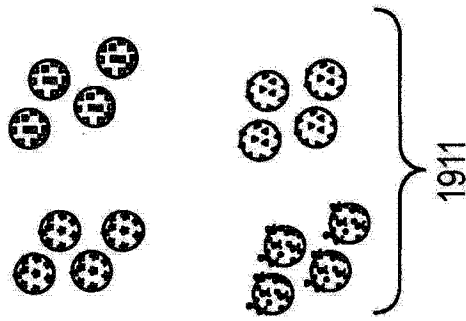


图 19C

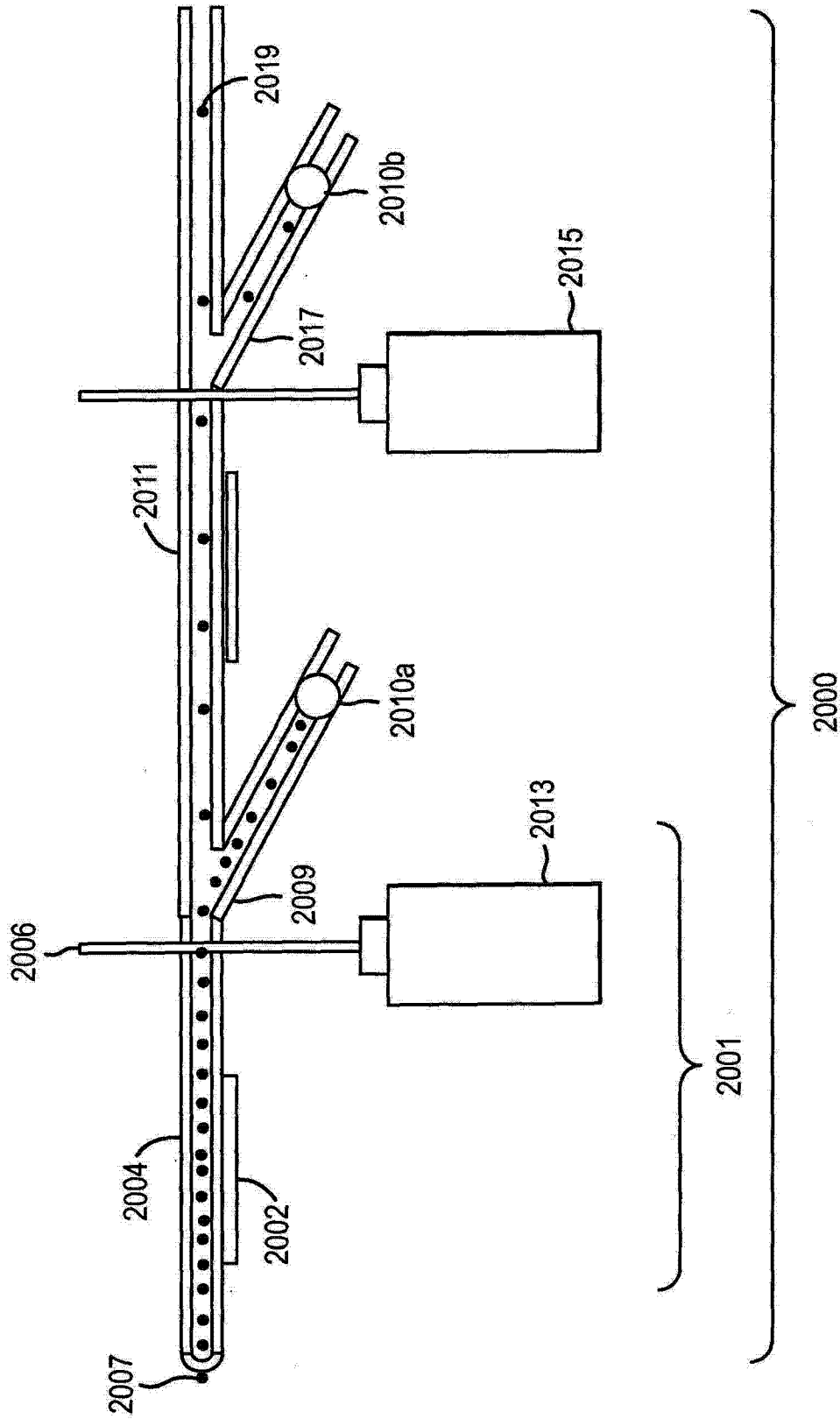


图 20

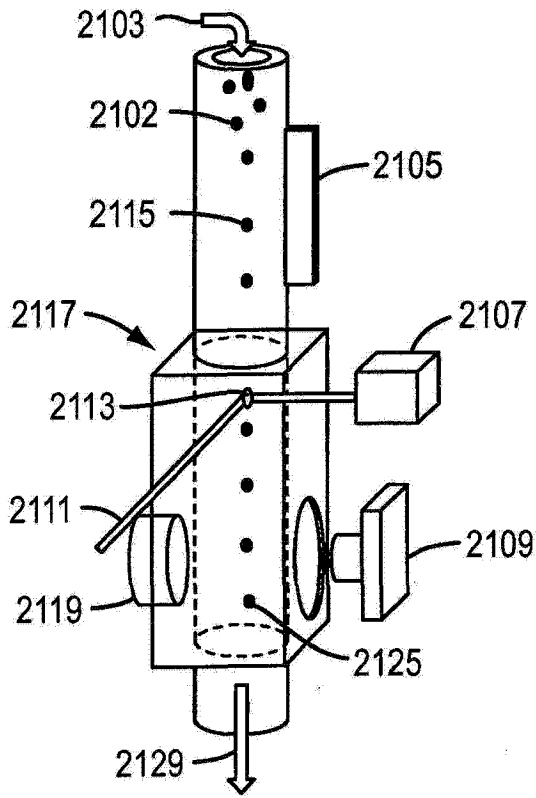


图 21A

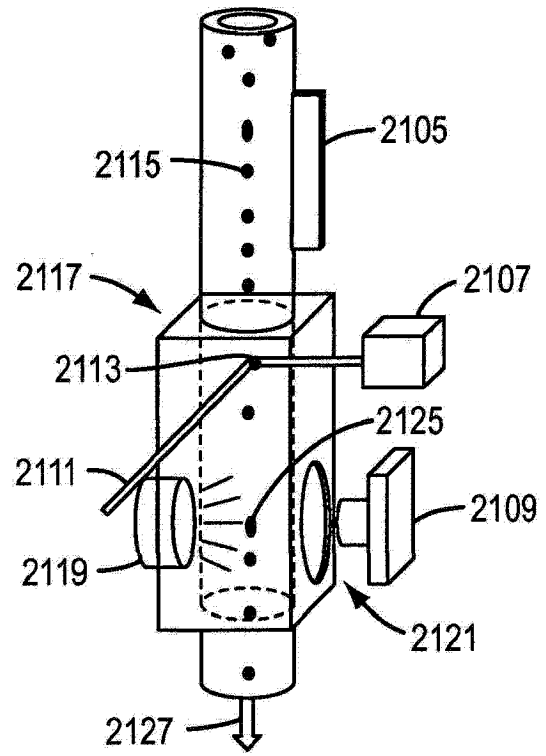


图 21B

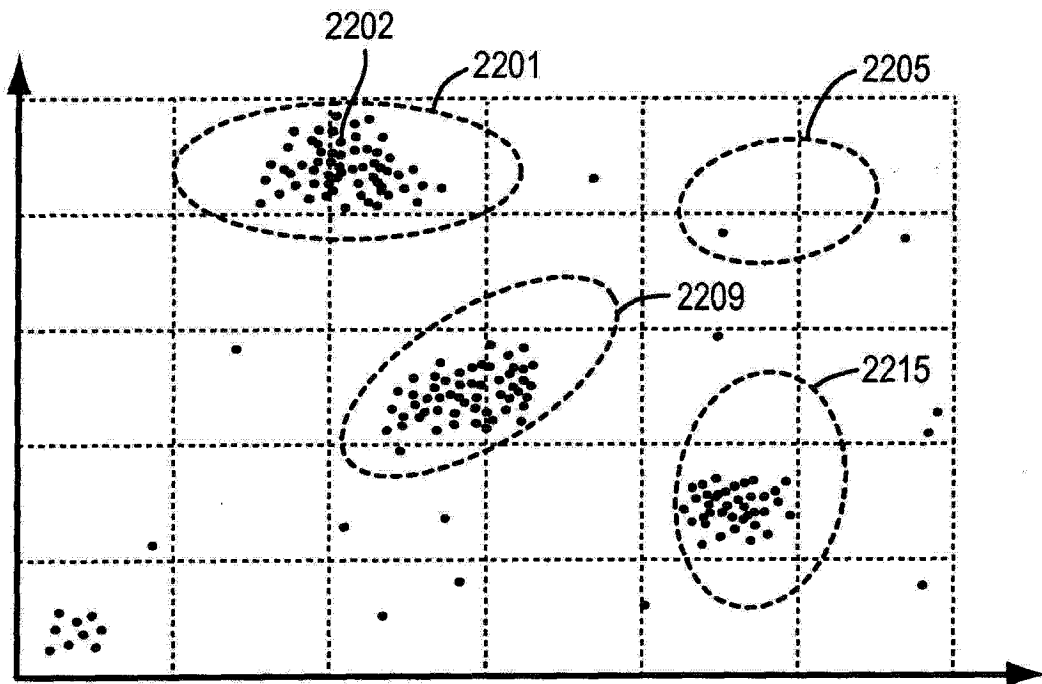


图 22

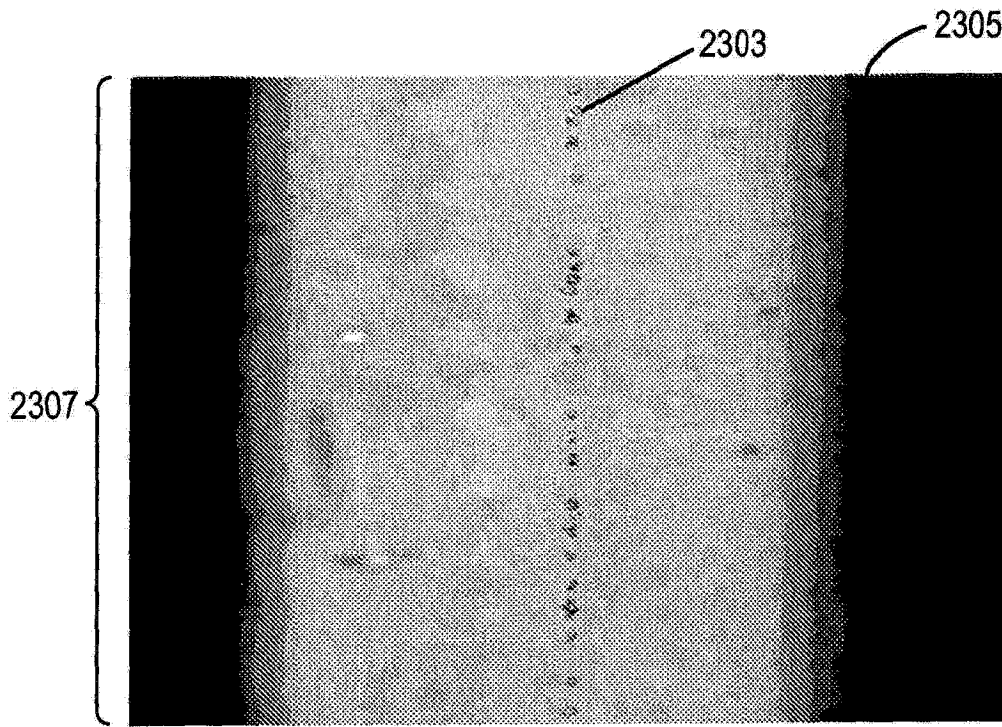


图 23

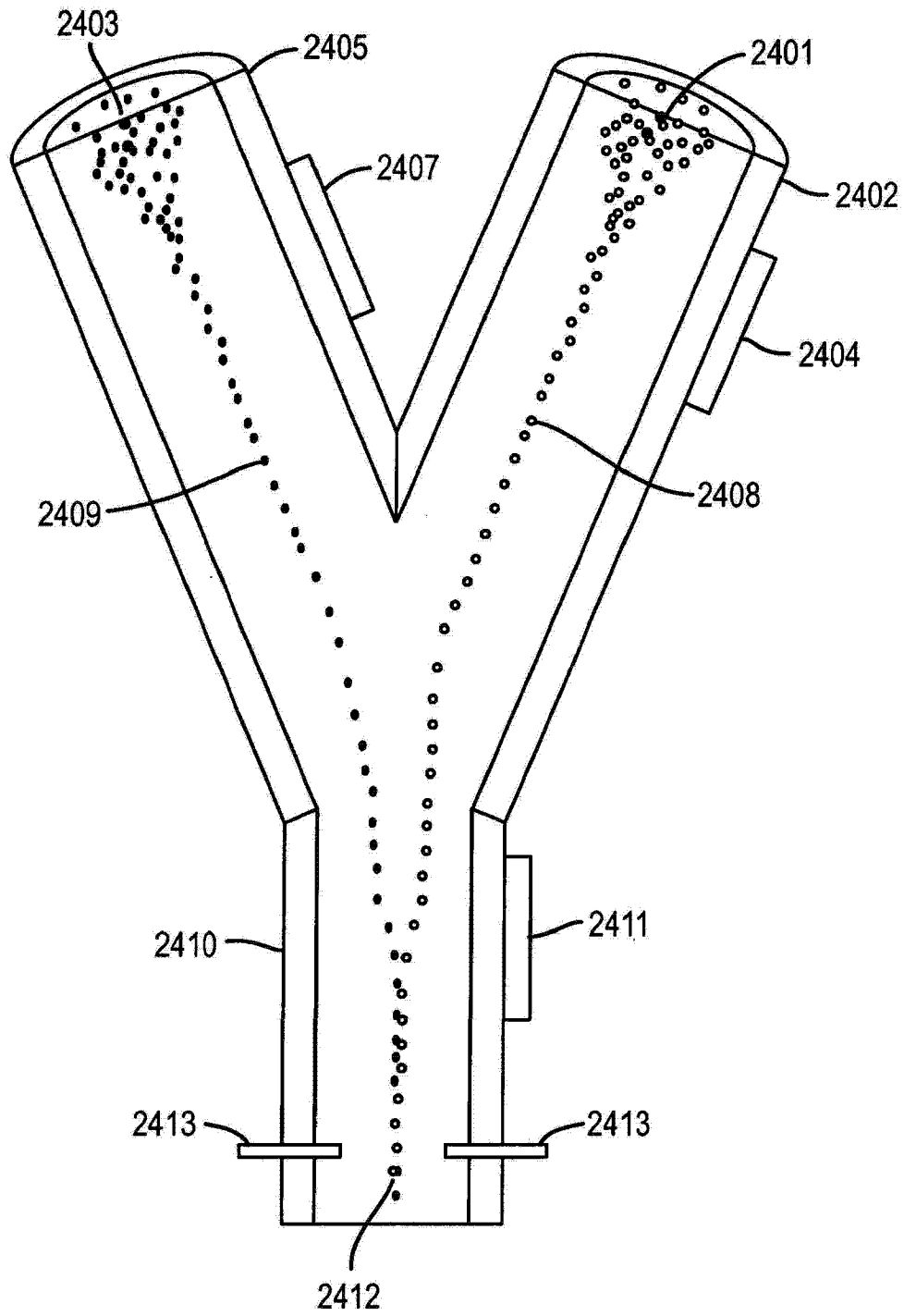


图 24

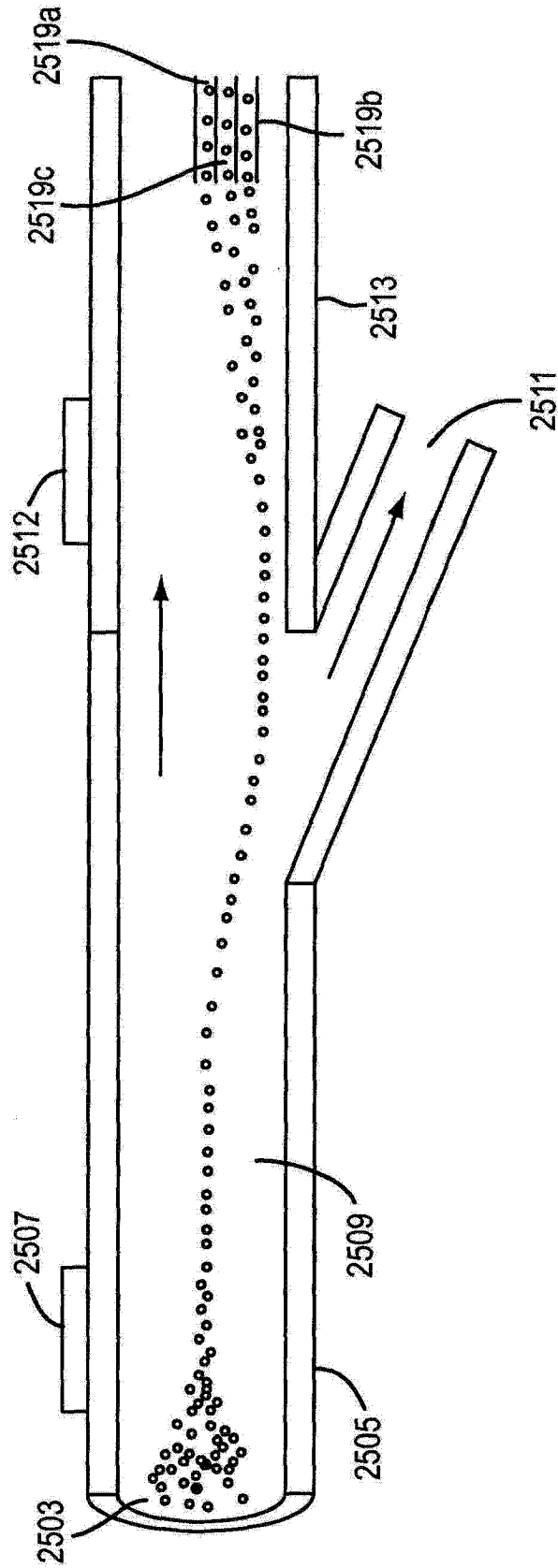


图 25

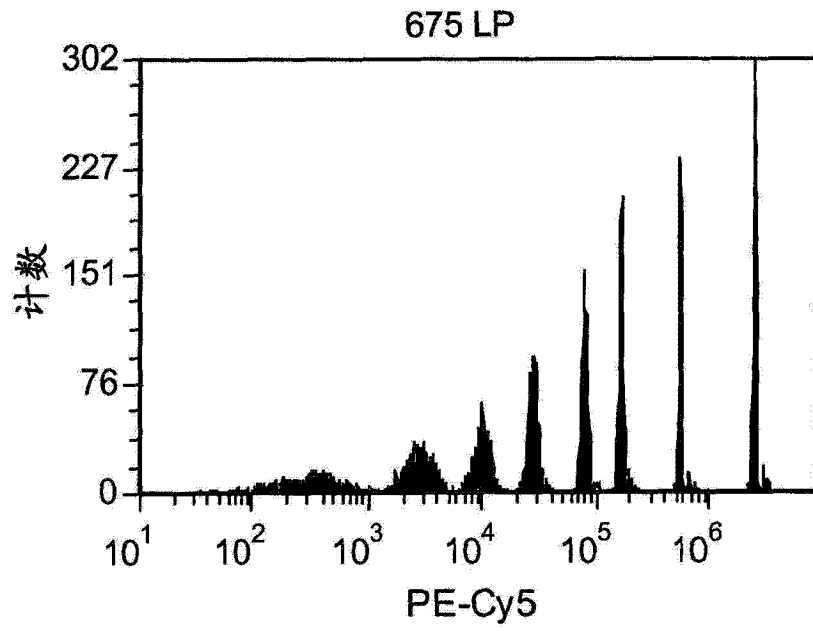


图 26A

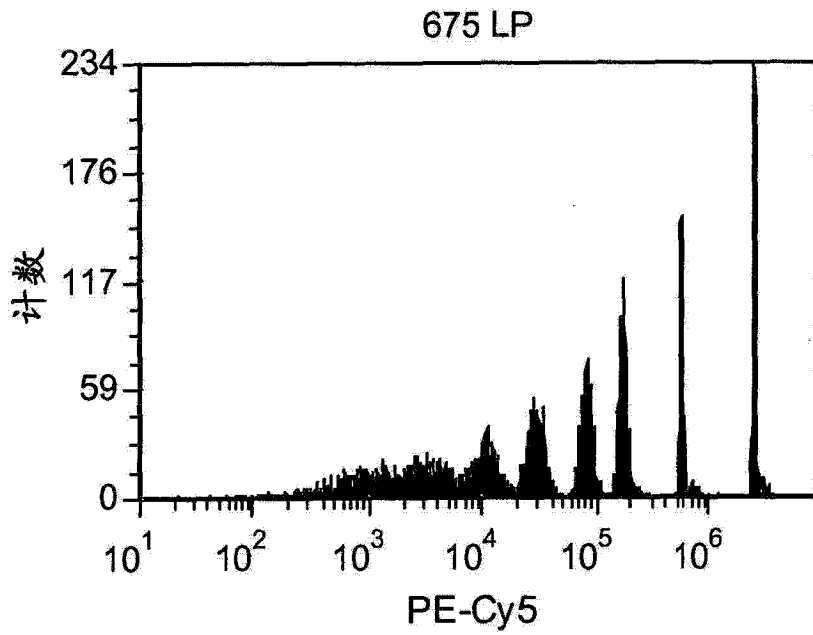


图 26B

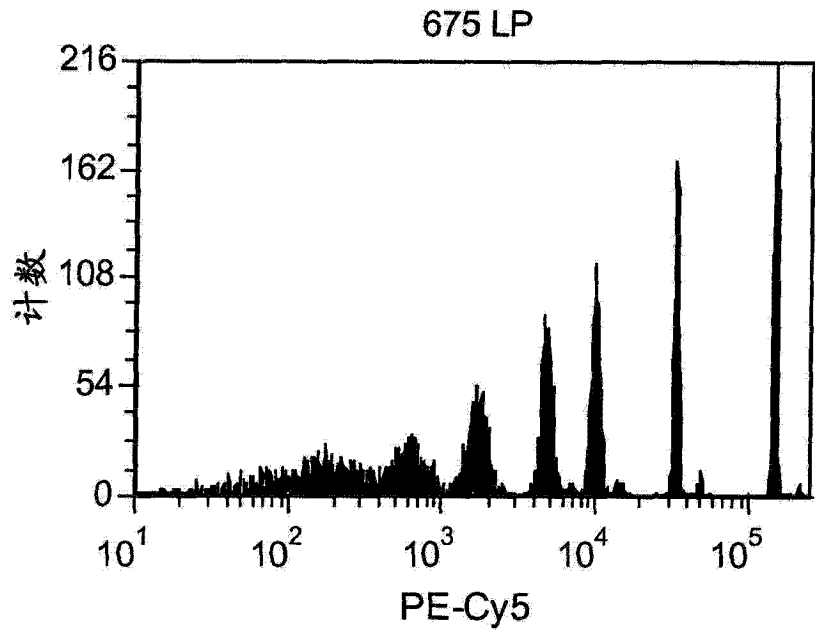


图 26C

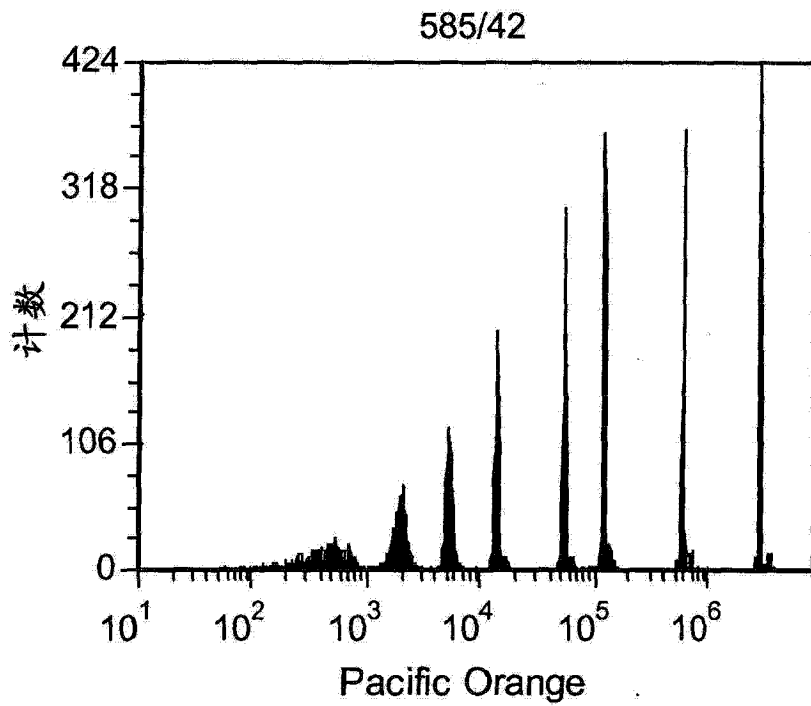


图 26D

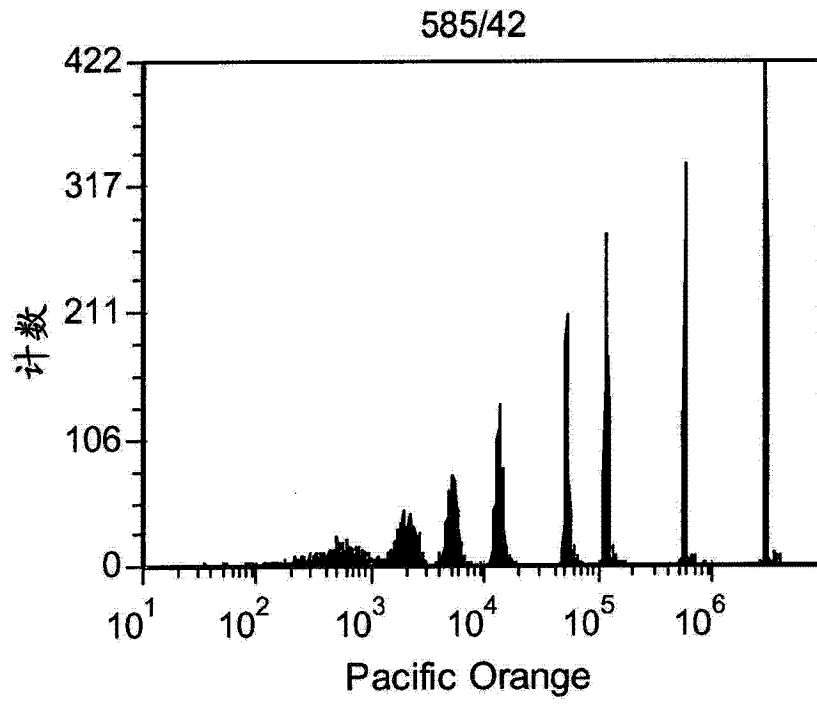


图 26E

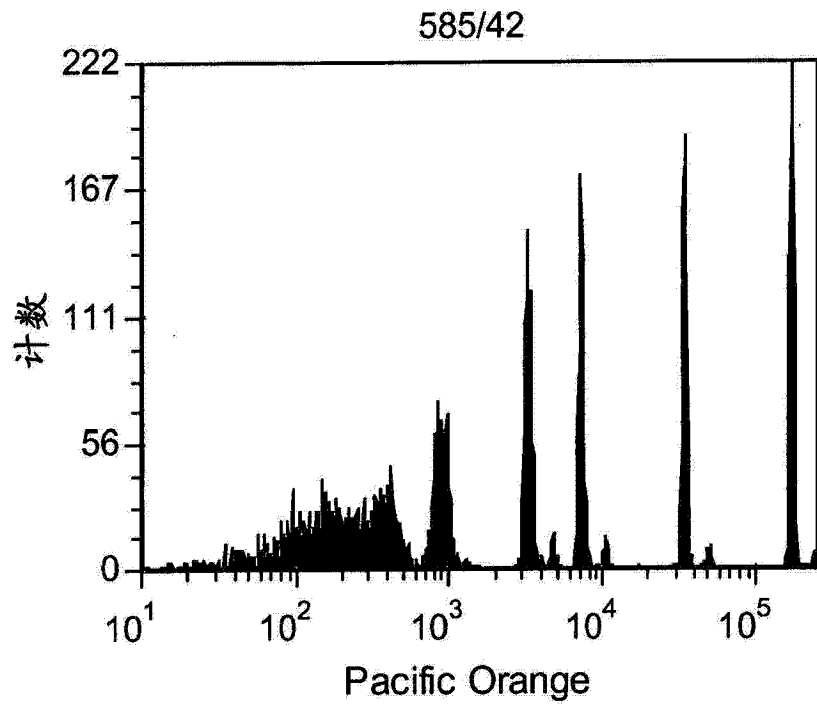


图 26F

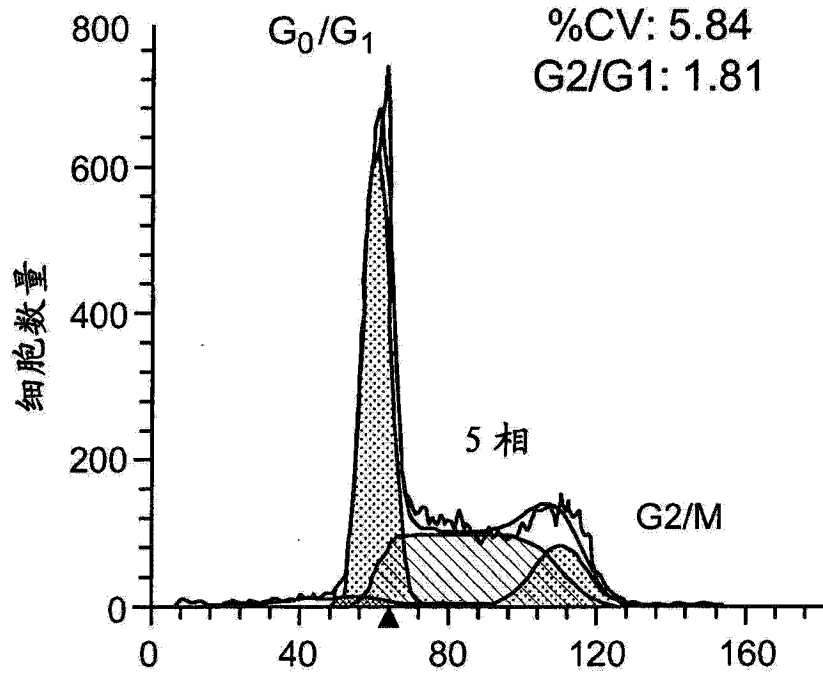


图 27A

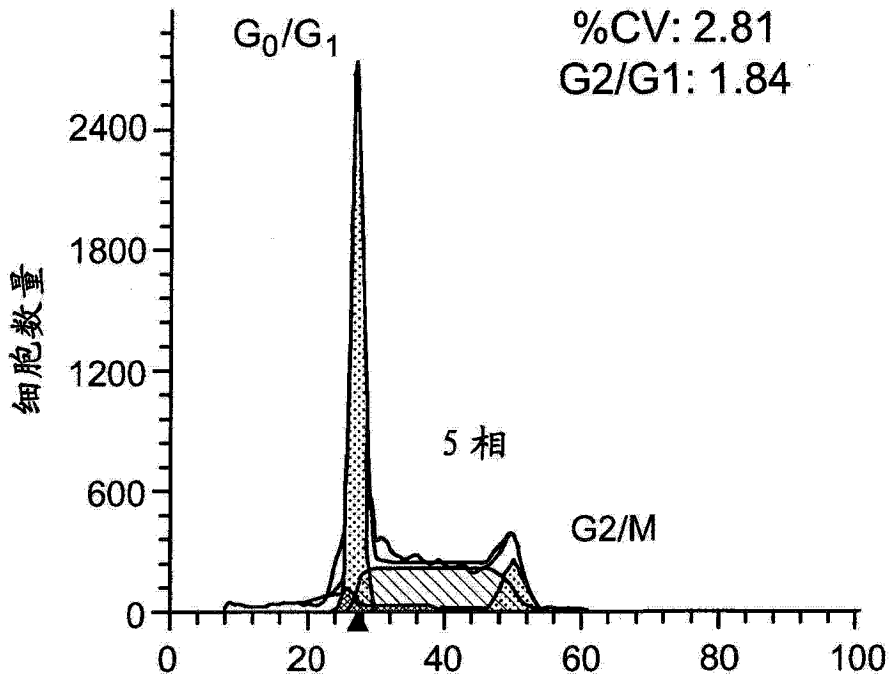


图 27B

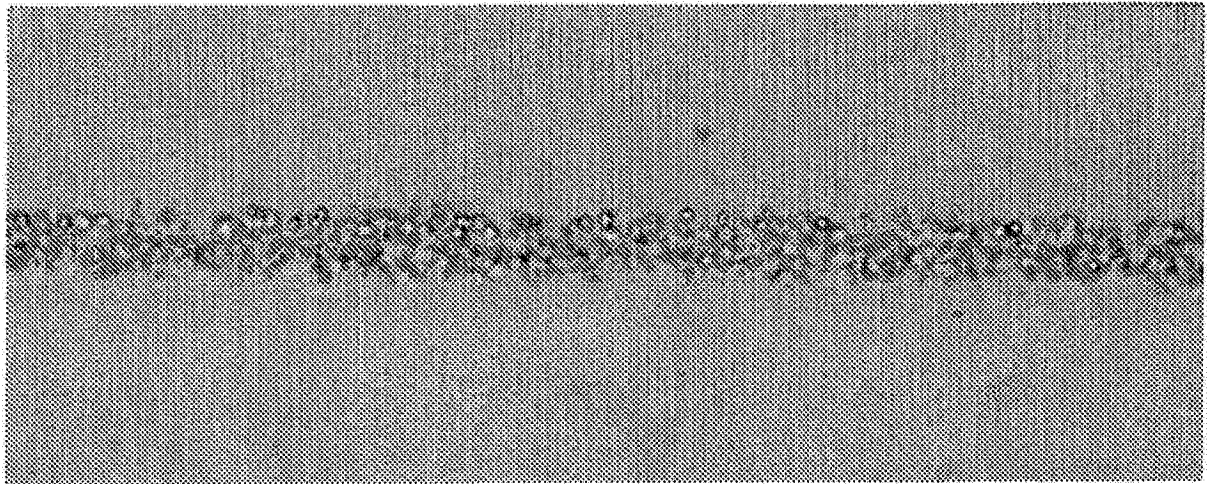


图 28A

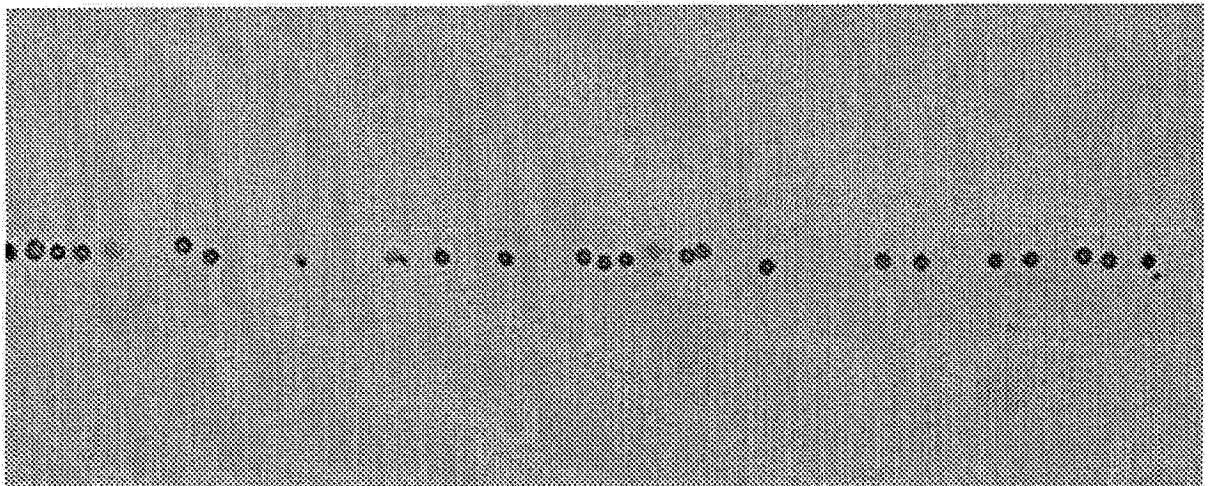


图 28B

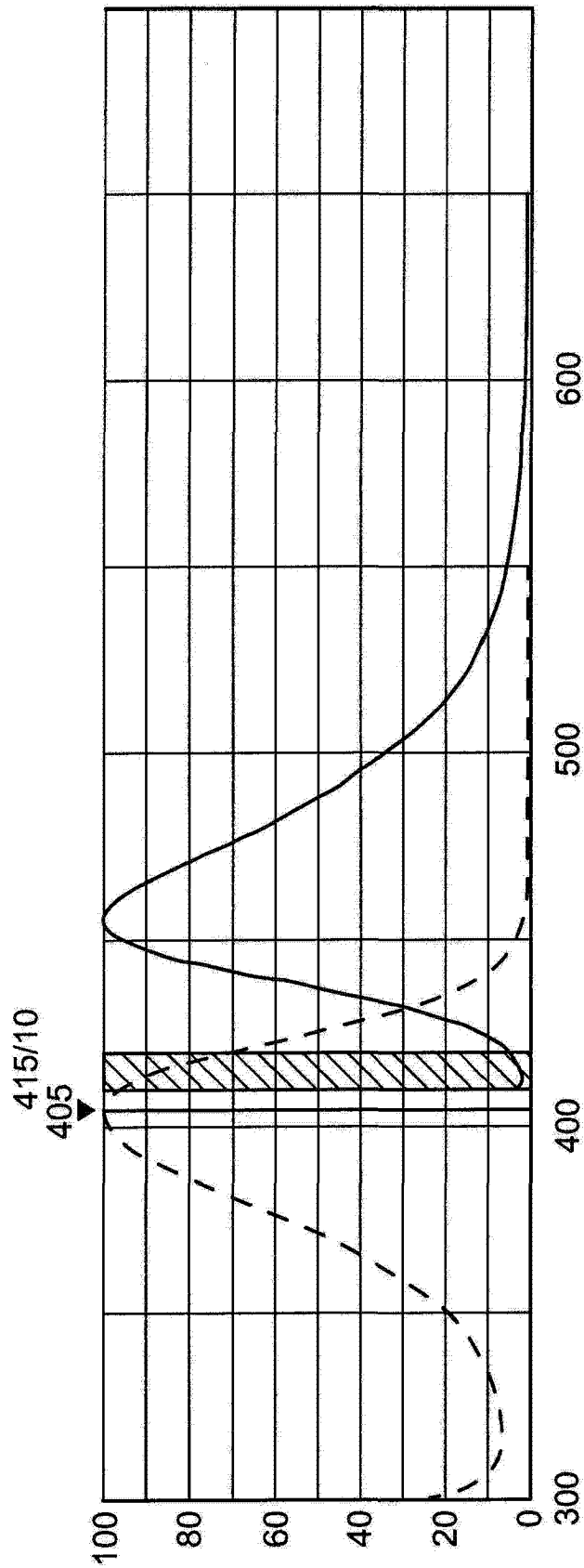


图 29

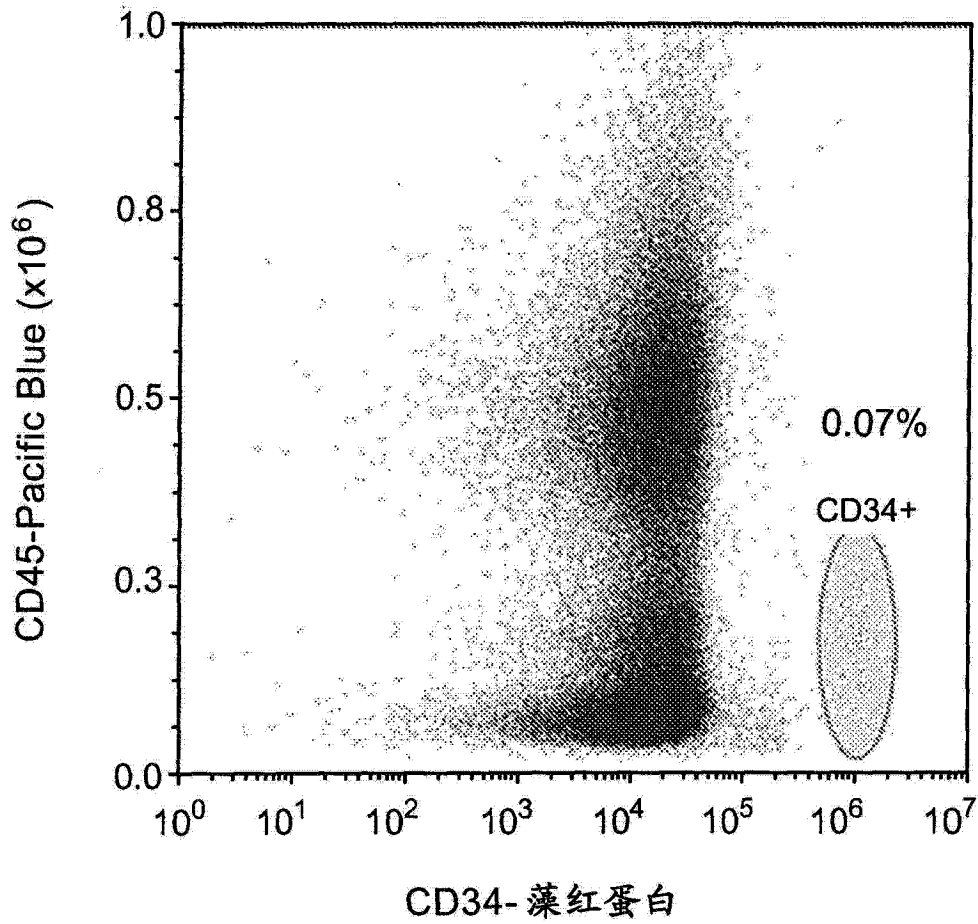


图 30

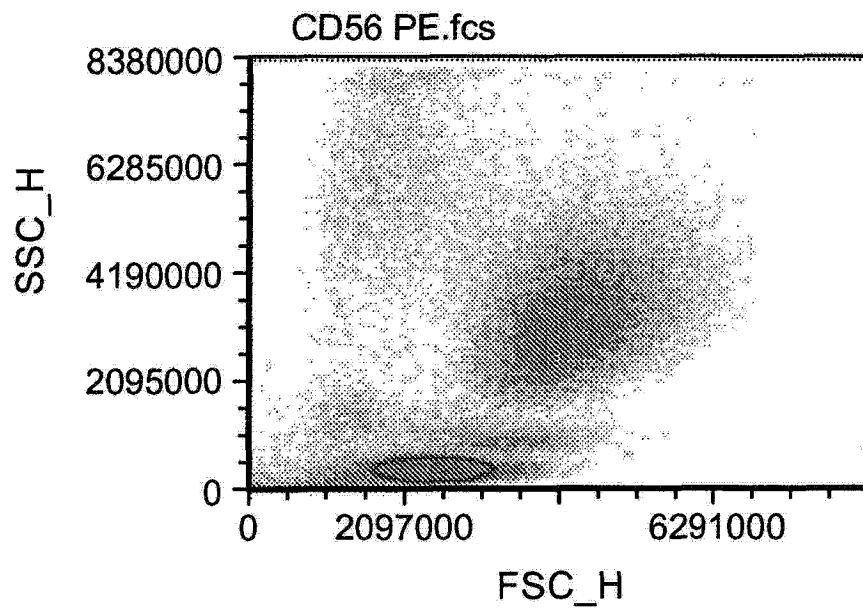


图 31A

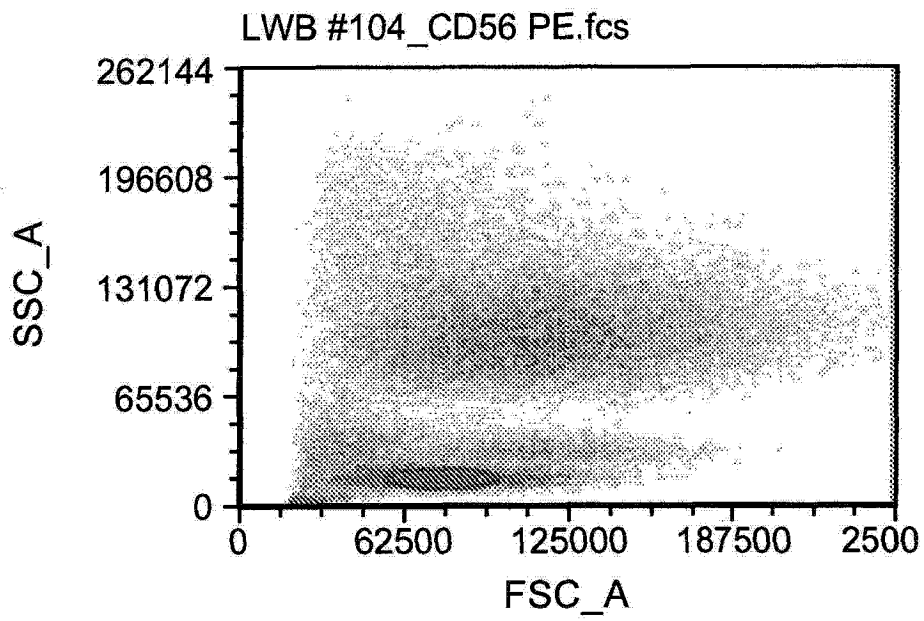


图 31B

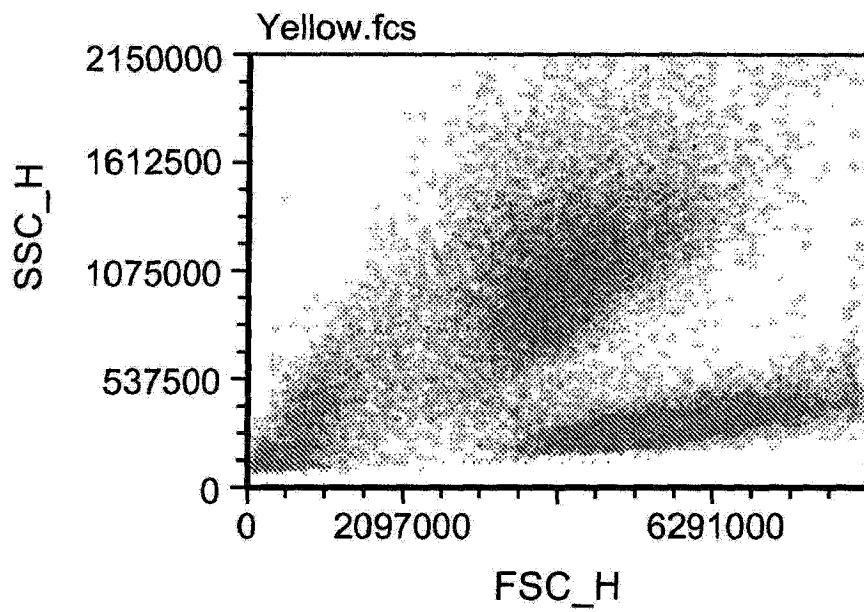


图 32A

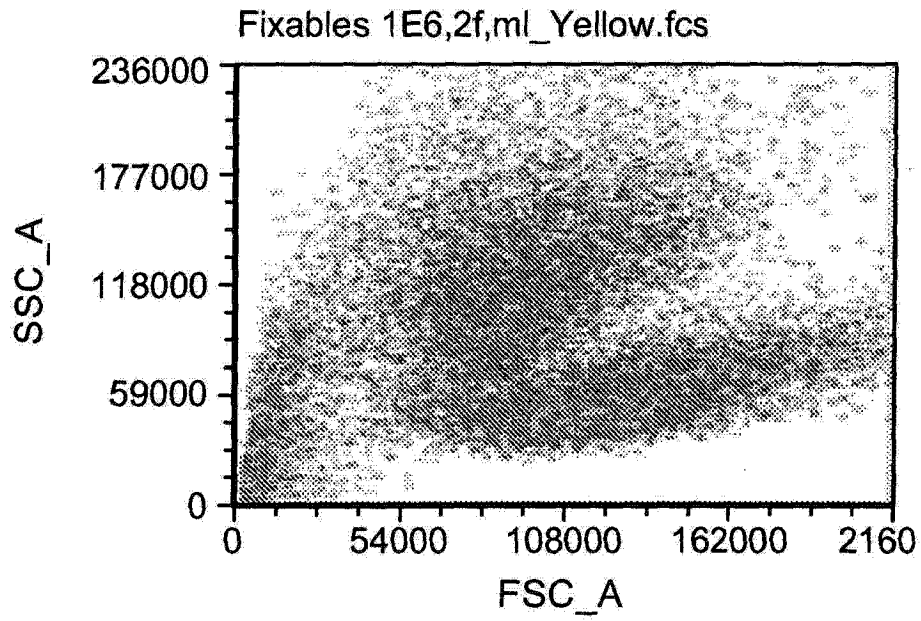


图 32B

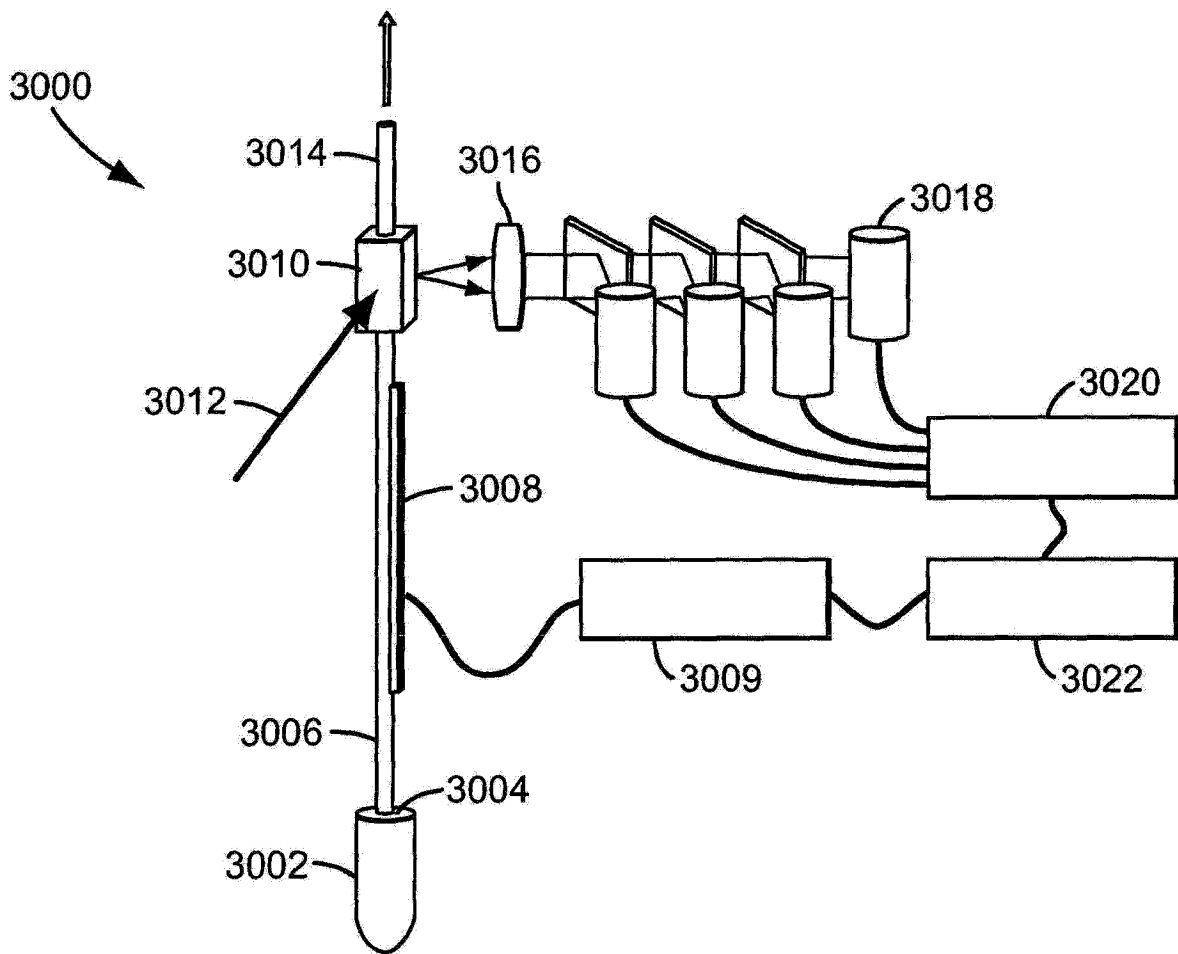


图 33

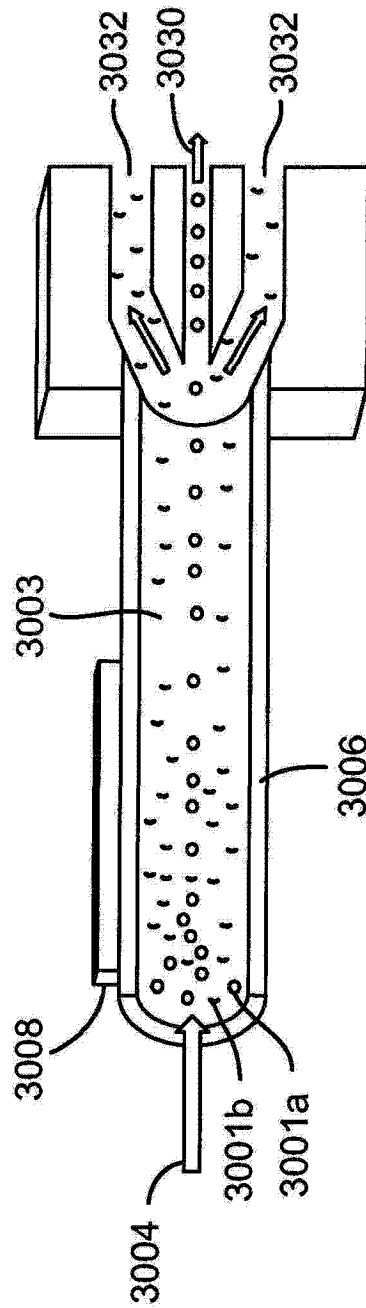


图 34

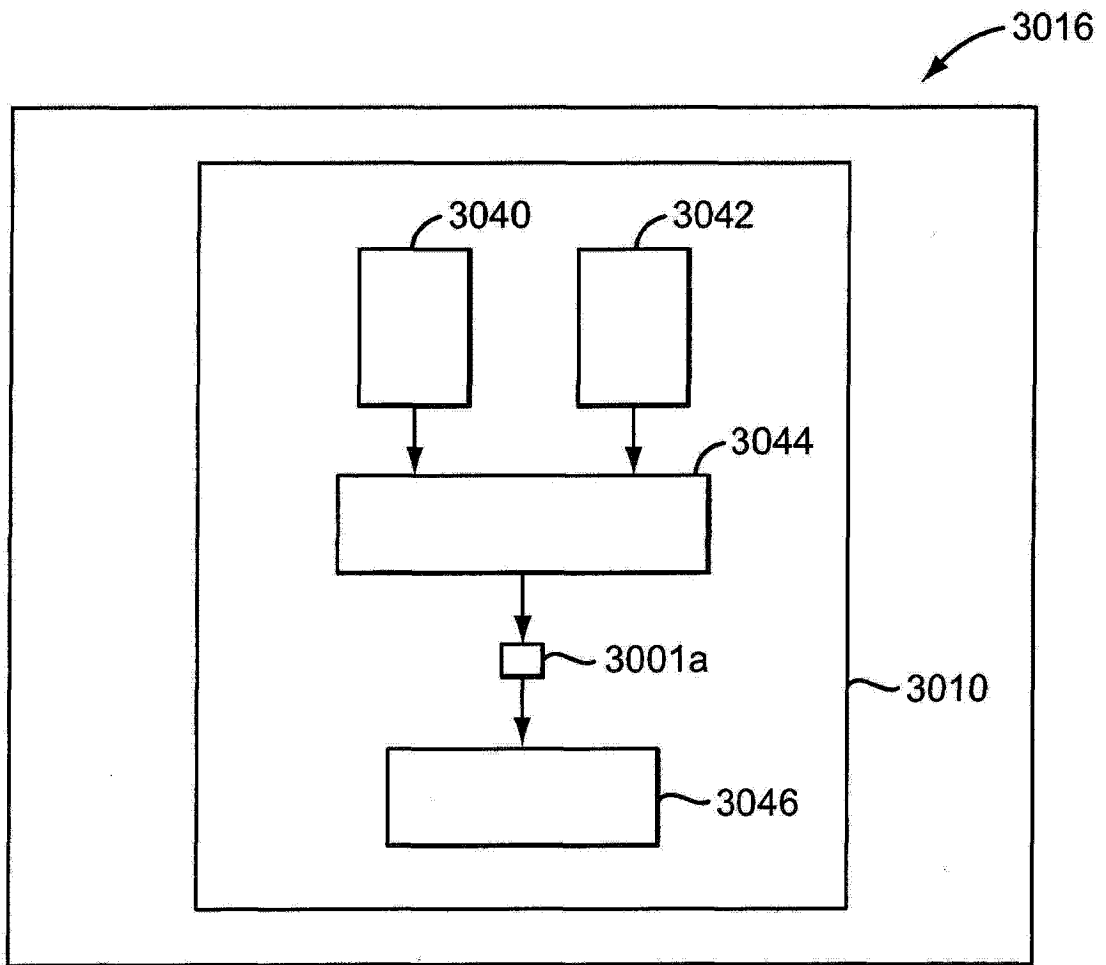


图 35



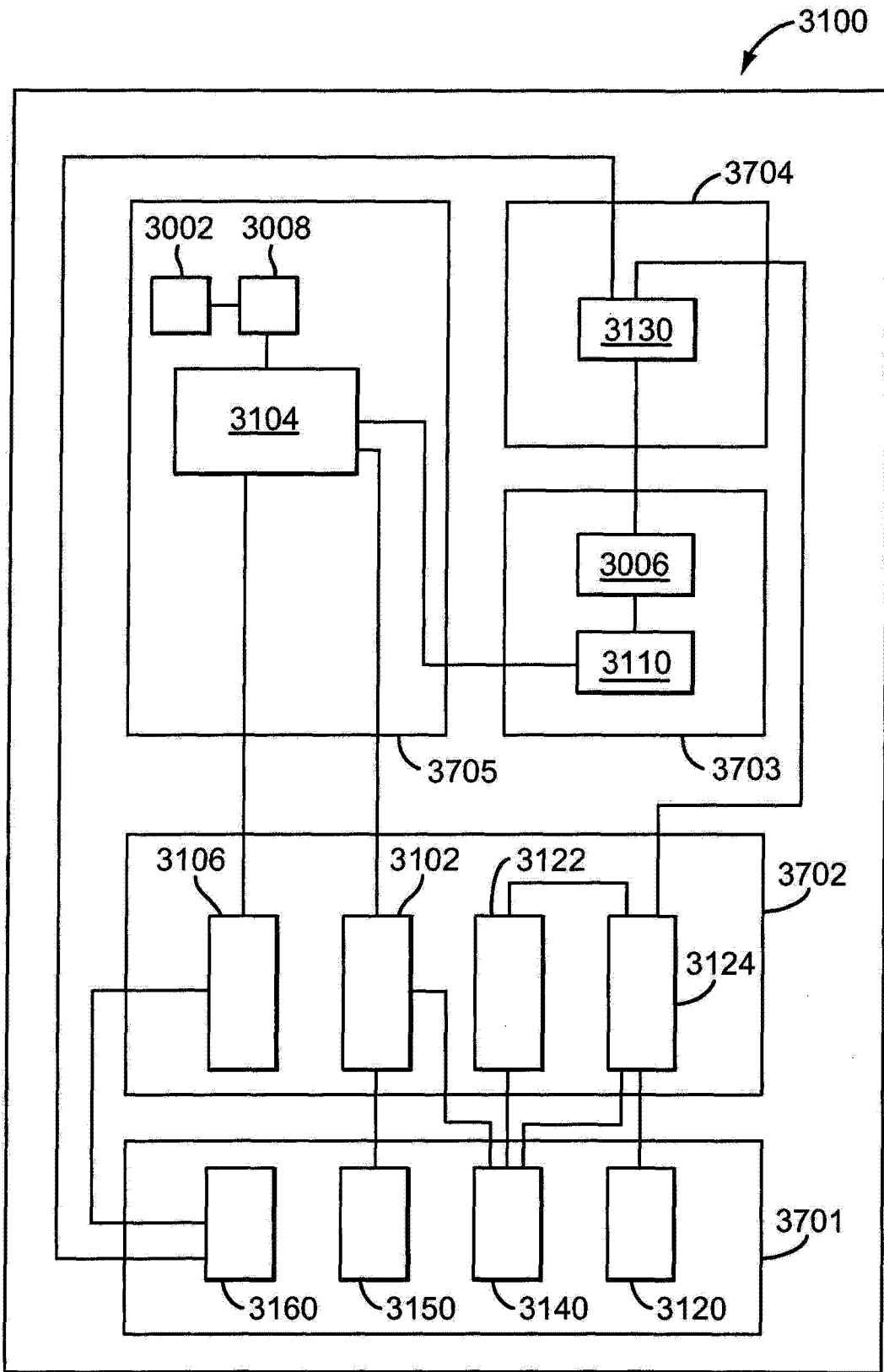


图 37

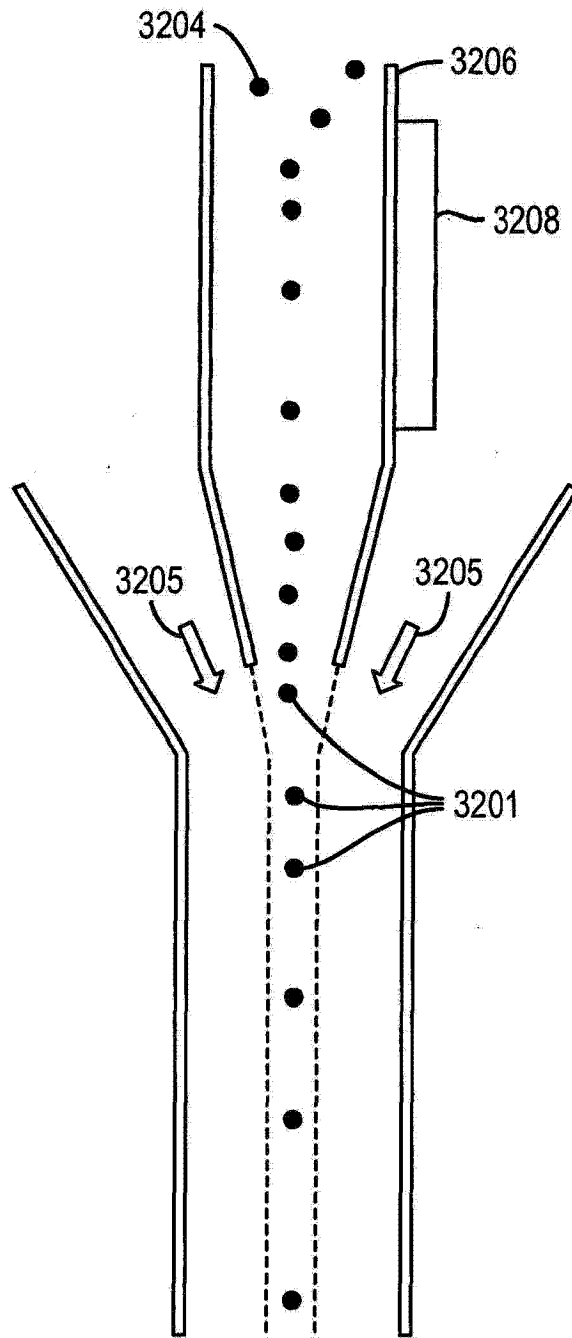


图 38

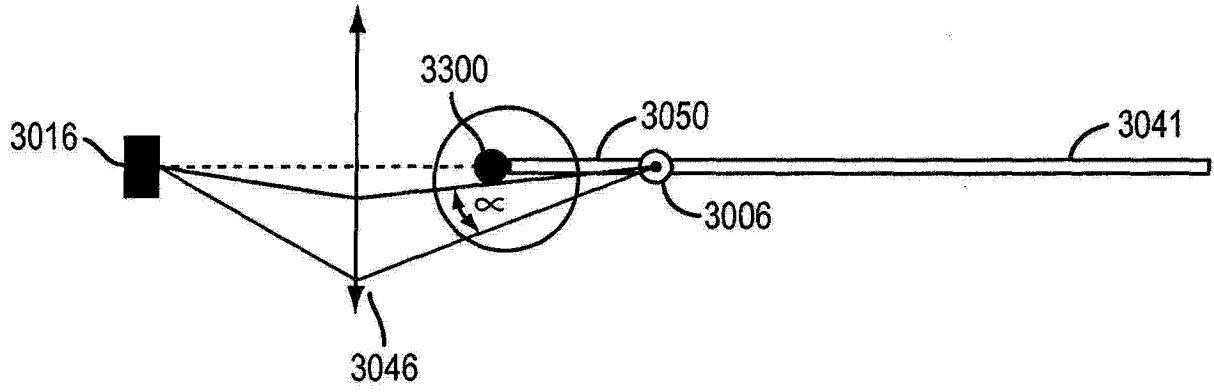


图 39

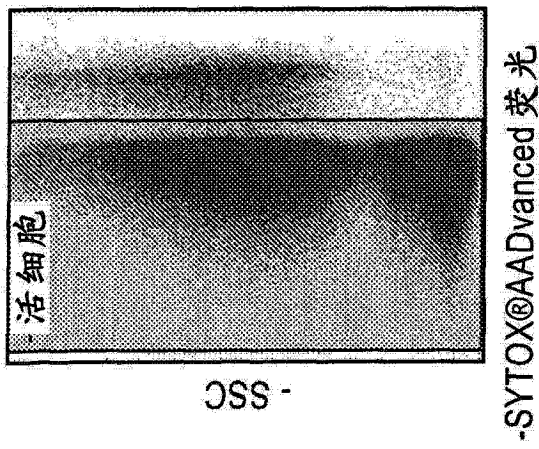


图 40A

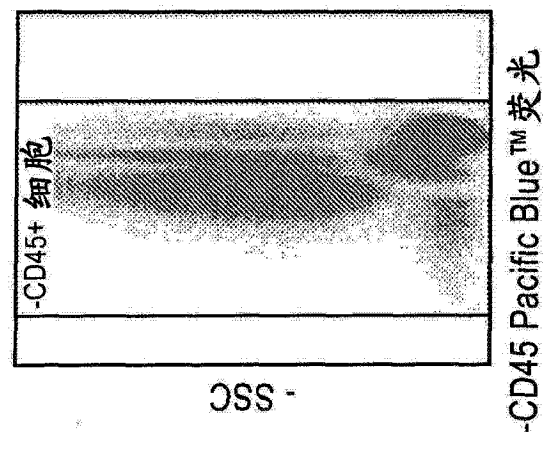


图 40B

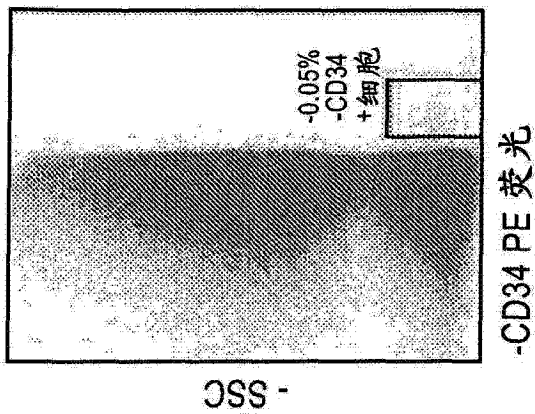


图 40C

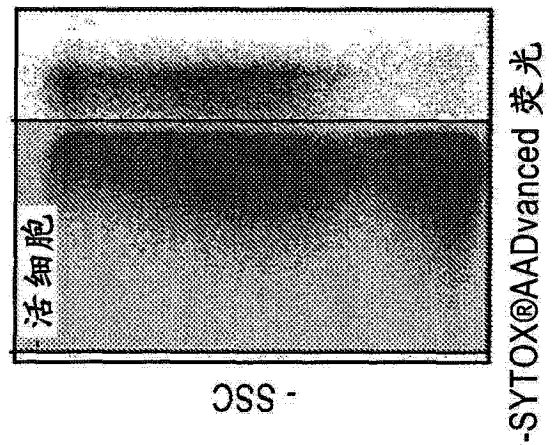


图 40D

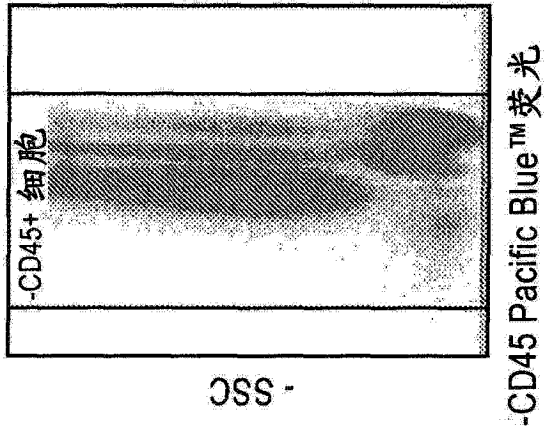


图 40E

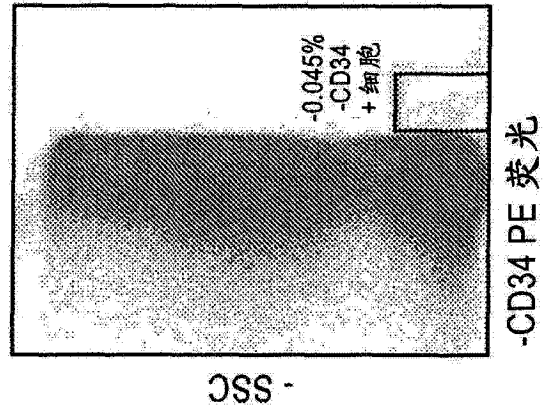


图 40F

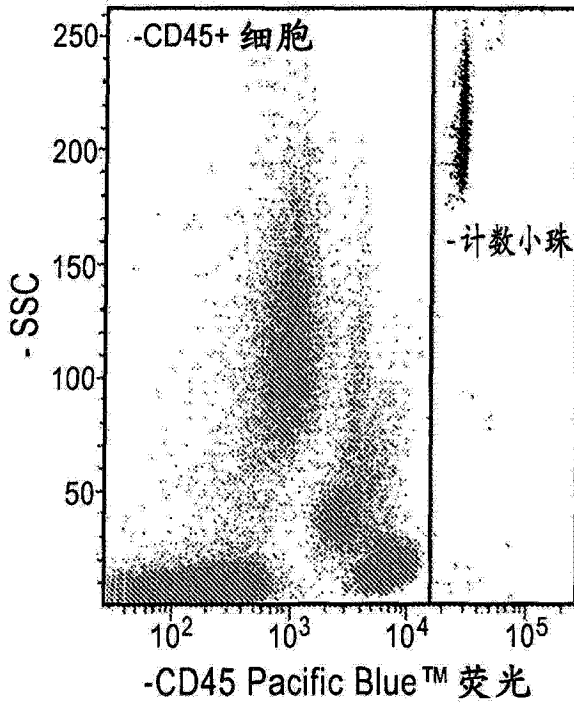


图 41A

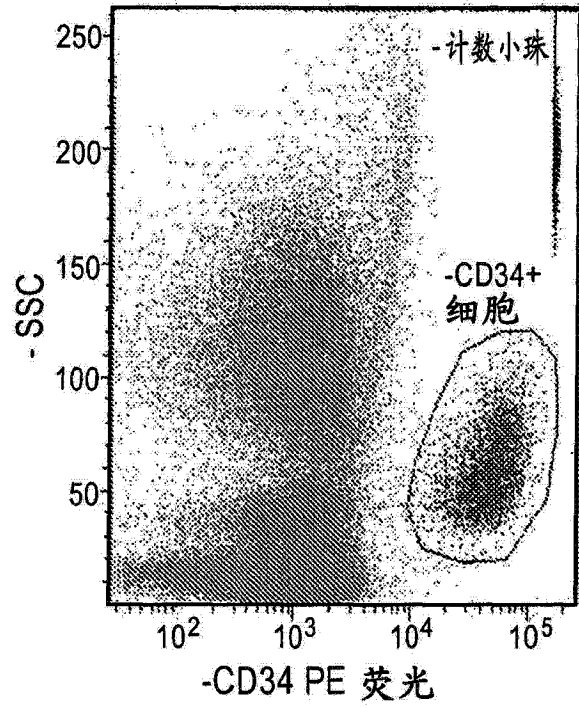
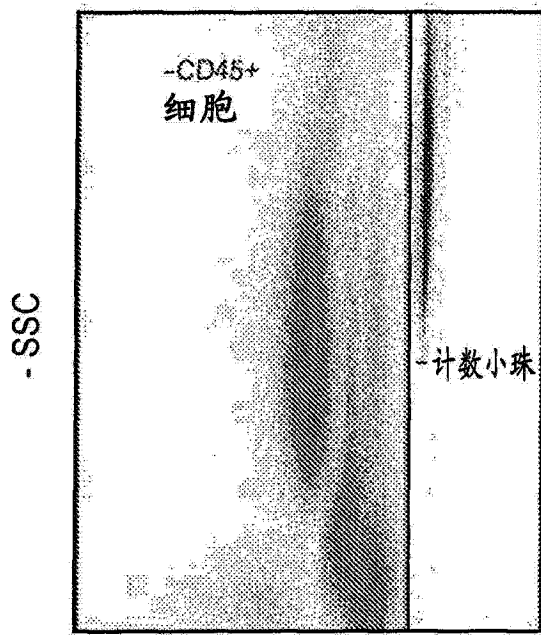
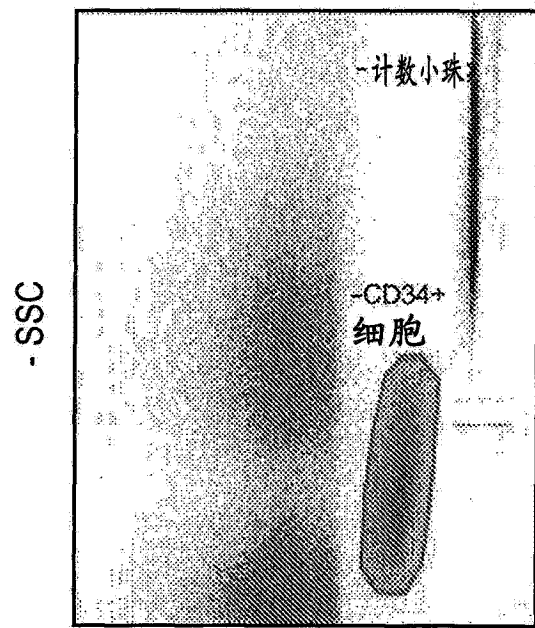


图 41B



-CD45 Pacific Blue™ 荧光

图 41C



-CD34 PE 荧光

图 41D

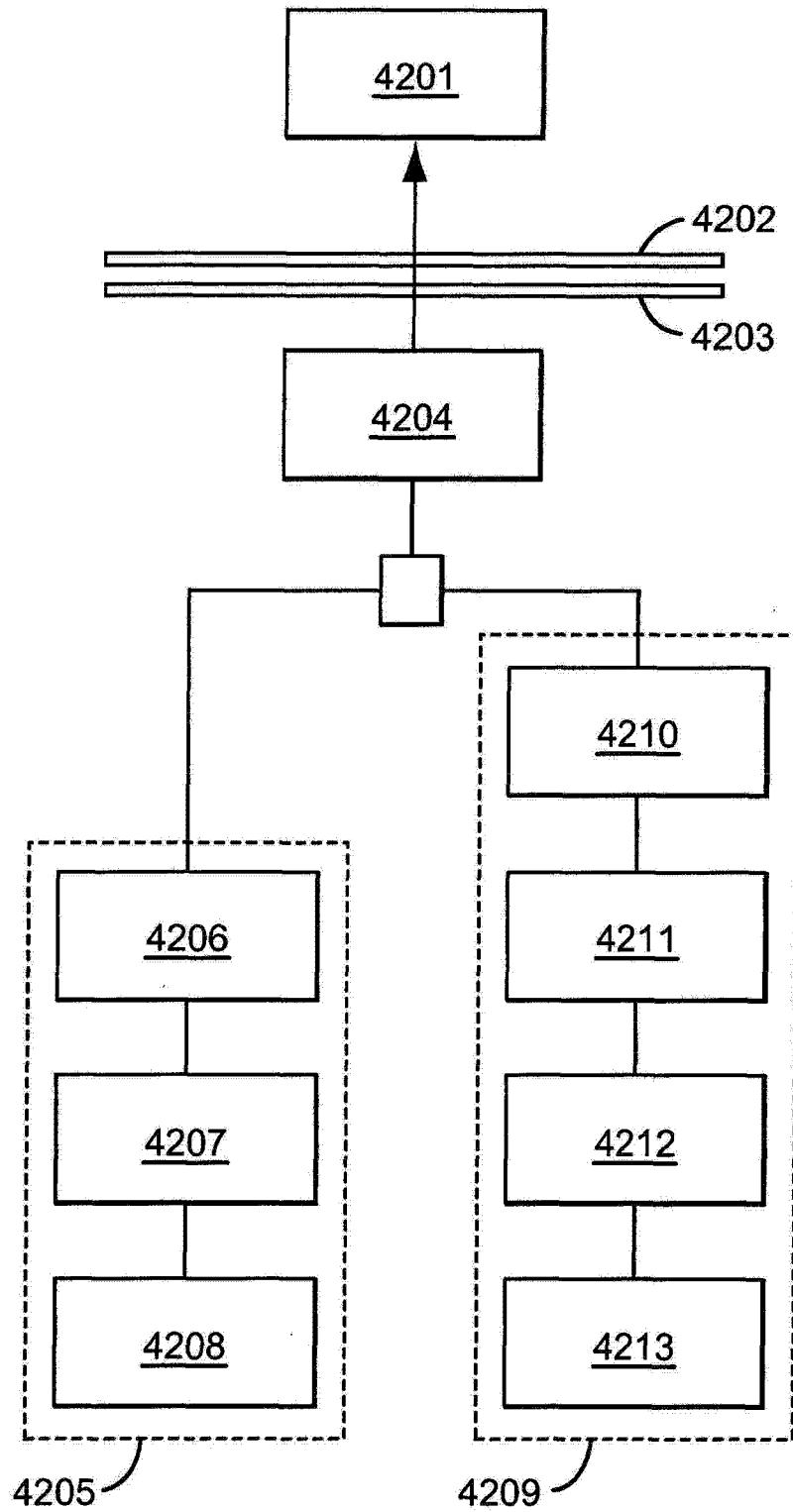


图 42