



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112557301 A

(43) 申请公布日 2021.03.26

(21) 申请号 202011409176.4

(51) Int.CI.

(22) 申请日 2013.07.25

G01N 21/03 (2006.01)

(30) 优先权数据

61/675,811 2012.07.25 US

61/676,178 2012.07.26 US

61/766,116 2013.02.18 US

61/802,194 2013.03.15 US

G01N 15/14 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

201380049210.3 2013.07.25

(71) 申请人 赛拉诺斯知识产权有限责任公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 C·潘加卡 K·莫汉 J·R·沃森

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 陶家蓉

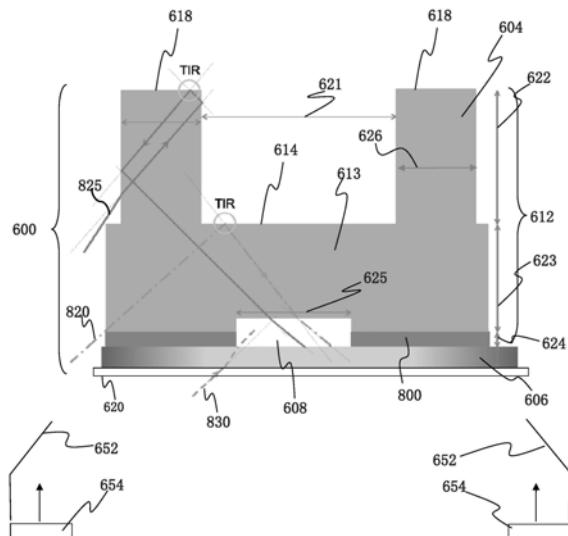
权利要求书4页 说明书62页 附图24页

(54) 发明名称

生物学样本的图像分析及测量

(57) 摘要

用于分析样本(如生物样本)的系统、比色皿(600)和方法,其中样本位于光学透射材料的样本架(600)的样本腔中。样本经照射以同时提供落射照明和透射照明,其中透射照明包括来自单个照明源(660)的光线,其经过从光学透射材料的至少一个表面(614,618)进行反射后进入样本。该相同的单个照明源还提供落射照明。优选使与样本相互作用的光线成像以进行分析。



1. 用于分析一个样本的一个系统,该系统含有:

一个含有一个用来盛接所述样本样本腔的样本架,所述样本架的至少一个部分含有一种光学透射材料,所述光学透射材料含有一个光学透射表面和一个反射表面;

一个提供光线的照明源,该光线照射并通过所述光学透射表面;

这里所述样本架被设计,其效果是来自所述照明源的所述光线对该样本架中的一个样本同时提供落射照明和透射照明,其中构成落射照明的光线从所述照射光源直接照射到所述样本上,不必在该样本架光学透射材料的一个表面进行反射;而构成透射照明的光线在该光学透射材料内走行,经过从所述光学透射材料的至少一个表面进行的至少一次反射后才到达该样本。

2. 如权利要求1所述的系统,其中该样本架含有一个具备一个加长管道用于盛接一个样本的比色皿。

3. 如权利要求1或2所述的系统,其中该样本架含有一个或多个光学非透射性表面。

4. 如权利要求1或2所述的系统,其中所述透射照明至少一部分是由一个表面的全内反射光所提供。

5. 如权利要求2所述的系统,其中所述透射照明至少一部分是由该比色皿内的全内反射光所提供。

6. 如权利要求1所述的系统,其中该样本架含有两个或多个样本腔用于盛接样本。

7. 如权利要求2所述的系统,其中该比色皿具有一个矩形水平横截面。

8. 如权利要求2所述的系统,其中该比色皿具有一个圆形水平横截面。

9. 如权利要求2所述的系统,其中该比色皿具有一个锯齿形的垂直横截面。

10. 如权利要求2所述的系统,其中该比色皿具有一个阶梯形的垂直横截面。

11. 如权利要求1所述的系统,其中所述样本架相对与所述照明光源是可活动的,而且可以活动到多个位点,其中该样本架的所述光学透射表面在每一个所述位点都可能被该照明光源照射。

12. 如权利要求1所述的系统,其中所述照明源含有一个环形光。

13. 如权利要求12所述的系统,其中所述环形光从一个基于发光二极管(LED)的环形光和一个基于激光的环形光中进行选择。

14. 如权利要求1所述的系统,进一步含有一个含有一种光学透射表面的支持结构,并被塑形与该样本架的一个光学透射表面相衔接。

15. 如权利要求1所述的系统,进一步含有一个加压设备设计用于将该样本架保持在一个理想的位置,通过该照明光源进行照明。

16. 如权利要求1所述的系统,进一步含有一个探测器设计用于对该样本架内一个管道的至少一个部分进行成像。

17. 如权利要求16所述的系统,其中所述样本架含有一个加长管道设计用来盛接该样本的至少一个部分,而且其中所述探测器被设计用于对该样本架内的整个加长管道进行成像。

18. 如权利要求16所述的系统,其中成像期间,该样本架被设计用于保持该样本处于一种稳定的、非流动状态。

19. 如权利要求16所述的系统,其中成像期间,该样本架被设计用于保持该样本的一部

分处于一种稳定的、非流动状态,而另一部分则处于一种流动状态。

20. 如权利要求16所述的系统,其中所述照明源相对于该样本架是可活动的。

21. 如前面任何一个权利要求所述的系统,其中在成像期间,该样本架被设计用于保持该样本处于一种流动状态。

22. 如权利要求16所述的系统,其中所述样本架进一步包含一个完全限制在该样本架内的液体回路,其中该样本位于所述液体回路内,其效果是将该样本与所述探测器保持分开。

23. 如权利要求22所述的系统,其中所述样本架相对于该探测器是可活动的。

24. 如权利要求22所述的系统,其中所述探测器相对于该样本架是可活动的。

25. 如权利要求1所述的系统,其中所述样本架和所述照明光源包含至少部分光学分析单元,而且所述系统进一步包含一个临床分析单元对所述样本进行临床分析。

26. 如权利要求25所述的系统,其中所述系统被设计用来为每一个所述光学分析单元和所述临床分析单元提供一份来自单一样本的分装样本,其有效性是使所述临床分析单元和所述光学分析单元能够在同一时间对一个样本部分实施光学分析和临床分析。

27. 如权利要求25所述的系统,其中所述临床分析是从普通化学分析、核酸分析、以及酶联结合分析中进行选择。

28. 如权利要求25所述的系统,含有多个临床分析单元,其中所述多个临床分析单元中的每一个临床分析单元都被设计用来提供从普通化学分析、核酸分析、以及酶联结合分析中选择出的一种临床分析。

29. 一个比色皿含有一个样本腔用来盛接一个样本;所述比色皿至少有一个部分含有一种光学透射材料;所述光学透射材料含有一个光学透射表面和一个反射表面;其中所述光学透射表面和所述光学反射表面被有效设计,这样透过光学透射表面的光线对样本腔中的所述样本同时提供落射照明和透射照明,其中构成落射照明的光线从所述照射光源直接照射到所述样本,不必在样本架光学透射材料的一个表面进行反射;而构成透射照明的光线在光学透射材料内运行,经过从所述光学透射材料的至少一个表面进行的至少一次反射后才到达样本。

30. 如权利要求29所述的比色皿,其中该样本腔含有一个加长管道。

31. 如权利要求29所述的比色皿,进一步含有一个或多个光学非透射性表面。

32. 如权利要求29所述的比色皿,其中所述透射照明至少一部分是由一个表面的部分内反射光所提供。

33. 如权利要求29所述的比色皿,其中所述透射照明至少一部分是由一个表面的全内反射光所提供。

34. 如权利要求29所述的比色皿,其中该样本架含有两个或多个样本腔用于盛接样本。

35. 如权利要求29所述的比色皿,含有一个横截面形状,从一个长方形水平横截面形状和一个圆形水平横截面形状中进行选择。

36. 如权利要求29所述的比色皿,含有一个横截面形状,从一个锯齿样垂直横截面形状和一个阶梯样垂直横截面形状中进行选择。

37. 一个比色皿含有一个具有一个光学透射底部的样本腔,所述比色皿有一个外表面含有至少一个凸面或一个凹面结构为该比色皿提供机械性支持。

38. 如权利要求37所述的比色皿,其中所述的至少一个凸面或凹面结构含有一个横截面形状,从长方形、三角形、圆形和半圆形中进行选择。

39. 如权利要求37所述的比色皿,其中所述的至少一个凸面或凹面结构被设计用于为该比色皿内的内反射光线提供一个通路。

40. 如权利要求37所述的比色皿,其中所述的至少一个凸面或凹面结构含有一个表面,其中所述表面被设计用于在该比色皿内进行光反射。

41. 从一份含有多种细胞样本中辨别一种细胞的方法,它含有:

(a) 将所述样本置于一个含有一个样本腔用来盛接该样本的样本架内;所述样本架至少有一个部分含有一种光学透射材料;所述光学透射材料含有一个光学透射表面和一个反射表面;其中所述光学透射表面和所述光学反射表面被有效设计,这样透过光学透射表面的光线对样本腔中的样本同时提供落射照明和透射照明,其中构成落射照明的光线从所述照射光源直接照射到所述样本,不必在样本架光学透射材料的一个表面进行反射;而构成透射照明的光线在光学透射材料内运行,经过从所述光学透射材料的至少一个表面进行的至少一次反射后才到达样本;

(b) 对所述样本架进行照明可以有效地对该样本同时提供落射照明和透射照明;

(c) 确认该样本内的一种细胞。

42. 如权利要求41所述的方法,其中所述的确认含有用一种探测器辨别所述细胞,这种探测器被设计为对所述样本腔的至少一个部分进行成像。

43. 如权利要求43所述的方法,其中该样本腔含有一个加长管道。

44. 对一个样本内一个细胞群细胞中感兴趣成分进行测量的一种方法,含有:

a) 对该样本内该细胞群细胞中表达的一种标记物获得一个定量测量值;

b) 在一台电脑的辅助下,根据a)部分的测量值,对该样本内该细胞群细胞的一个大概数量进行确定;

c) 向该样本中添加一定数量的一种细胞标记物,其中添加的所述细胞标记物的数量基于b)部分所得结果,而且该细胞标记物特异性地与细胞群细胞中的感兴趣成分相结合,而且随时可被检测;

d) 通过结合于感兴趣成分的标记物对该样本中的细胞进行检测;

e) 根据结合于感兴趣成分的标记物数量确定该样本内该细胞群细胞中感兴趣成分的数量。

45. 如权利要求44所述的方法,其中所述样本架含有一个从权利要求29所述的样本架和权利要求37所述的样本架中选择的样本架。

46. 一个对一台显微镜进行对焦的方法,含有:

a) 将一个含有需要进行显微分析目标的样本与一种已知大小的参照粒子混合,有效地生成一种含有该样本和参照粒子的混合物;

b) 将a)步骤中该混合物置于一台显微镜的一个光路;

c) 将a)步骤中的该混合物暴露在一种设计用于观察该参照粒子的光波之下;

d) 根据该混合物中该参照粒子的位置,或者根据该参照粒子图像的清晰度,对该显微镜进行对焦。

47. 如权利要求46所述的方法,其中所述含有该样本和一种参照粒子的混合物被置于

一个从权利要求29所述的样本架和权利要求37所述的样本架中选择的样本架内。

48. 从一份含有多种细胞样本中辨别一种细胞的方法,它含有:

(a) 分析多种细胞中的一种细胞至少用于以下一种目的: (i) 细胞表面抗原的表达; (ii) 一种细胞表面抗原的数量; (iii) 细胞大小;

(b) 对 (a) 中的细胞进行检测,用于至少一个目的: (i) 细胞核大小; 或者 (ii) 细胞核形状;

(c) 对 (a) 和 (b) 中的细胞进行检测,定量分析细胞的光散射,

其中来自步骤 (a)、(b)、和 (c) 的联合信息被用来确认含有多种细胞样本中的该细胞。

49. 如权利要求48所述的方法,其中所述多种细胞被置于一个从权利要求29所述的样本架和权利要求37所述的样本架中选择的样本架内。

50. 对一个样本进行成像的一个系统,含有:

一个样本架,

一个对置于所述样本架内的一个目标进行照明的光源,

一个物镜镜头设计用于收集并聚焦所述样本架内一个目标所散射的光线,其中所述散射光线含有以多个散射角度散射的光线,

一个光学光圈让来自所述物镜镜头的光线通过,

一个额外镜头用于将来自所述物镜镜头的光线聚焦到所述光学光圈上,其中所述光学光圈被设计只允许被所述物镜镜头聚焦的一部分光线通过,而允许通过所述光圈的所述部分光线由仅处于所述多个散射角度中一部分的散射光线组成。

51. 对一个样本进行成像的一个系统,该系统含有:

一个含有所述样本的样本容器,

一个载物台含有一个带有一个光学透光表面的样本容器,

一个通过该载物台对该样本内有型成分进行照明的光源,

其中该样本容器有一个交界表面用来与该样本容器接收器的光学透光表面衔接,而该交界表面与该光学透光表面相符合,当光线穿透该交界表面时不会产生明显的变形。

52. 如权利要求51所述的系统,其中该样本容器的交界表面由一种高分子聚合物材料形成。

53. 如权利要求51所述的系统,其中形成该样本容器交界表面的材料可能比该样本容器接收器光学透光表面使用的材料更柔软。

54. 如权利要求51所述的系统,进一步含有一个加压单元用来向该交界表面施压,以符合该样本容器接收器光学透光表面所设计的形状。

55. 如权利要求51所述的系统,进一步含有一个处理单元被设计用来与该样本容器耦合,帮助运输样本容器上下载物台,并增加该样本容器的机械强度。

56. 如权利要求51所述的系统,进一步含有一个不透光处理单元设计用来与该样本容器耦合。

57. 如权利要求51所述的系统,其中不用通过大致直线的光线穿透一个表面然后从对侧表面穿出照射到一个探测器上这样的过程,该样本的所有成像即可能被完成。

58. 如权利要求51所述的系统,其中该光源不用位于该样本容器的一侧而将光线传输到样本容器对侧的一个探测器上。

生物学样本的图像分析及测量

[0001] 背景资料

[0002] 对一个研究对象的生物学样本分析对与该研究对象健康相关的诊断、监测和(或)治疗可能是非常重要的。有大量已知的方法可用于生物学样本的分析。然而,为了给研究对象提供更好的诊断、监测、和(或)治疗,还需要在生物学样本的分析方面获得提高。

[0003] 引置条款

[0004] 本说明中提及的所有出版物、专利和专利应用都是以同等程度的引用方式并入本文,就像每一个单独的出版物、专利或专利应用被特定地和单独地指示作为引用方式并入本文一样。

发明内容

[0005] 此处描述的方法、设备、系统、和装置被用于生物学样本的光学和图像分析和(或)测量。

[0006] 此处的发明实例包括适合于盛接样本,包括生物学样本的样本架,用于光学检查、光学测量以及其他检查和测量。在实例中,一个样本架被提供,其中具有一个光学透射部分和一个设计用来在该样本架内提供内部光反射的部分。在实例中,内反射可能包括部分内反射,还可能包括完全内光反射。来自一个外部光源以及从该样本架一侧射入的入射光可以有效地从多个方向对该样本架内的一个样本进行照明。在实例中,一个置于该样本架一侧的外部光源可能为该样本架内的一个样本提供落射照明;可能为该样本架内的一个样本提供透射照明;或者可能为该样本架内的一个样本既提供落射照明又提供透射照明。

[0007] 此处发明的实例包括一些系统,其中含有适合盛接样本的样本架。这种系统适用于通过诸如光学检查、光学测量的方法检查和测量样本,包括生物学样本,而且也用于其他的检查和测量。在实例中,此处显示的一个系统含有一个样本架,其中含有一个光学透射部分和一个设计用来在该样本架内提供内部光反射的部分。在实例中,此处显示的一个系统的样本架内的内部反射可能包括部分内反射,还可能包括光线的全内反射。此处显示的系统可能包括光源。来自一个样本架外部的一个光源以及从样本架一侧射入的入射光可以有效地从多个方向对该样本架内的一个样本进行照明。在实例中,一个置于该样本架外部一侧的光源可能为该样本架内的一个样本提供落射照明;可能为该样本架内的一个样本提供透射照明;以及(或者)可能为该样本架内的一个样本既提供落射照明又提供透射照明。此处显示的系统可能包括一个探测器或几个探测器;这些探测器可能包括光学探测器,还可能包括其他探测器。这些探测器适用于,并且设计用于对一个样本架内的一个样本、一个样本的研究对象和特征、以及一个样本内的物体进行测量;这些测量可能包括定性测量和定量测量。在此显示的系统实例可能包括滤光器、光圈、格栅、镜头以及其他光学元件。在此显示的系统实例可能包括机械性装置用于定位、移动、以及调节一个样本架、一个光源、一个镜头、一个滤光器、或者此处显示的一个系统的其他元件或组成部分。在此显示的系统实例可能包括一些组成部分或元件用于传送、分装、盛接、加热、混合、染色、状态调节,或者准备、处理、改变一个样本。在此显示的系统实例可能包括一些组成成分和元件用于运输、保

护、填充、或者操纵一个样本架。在此显示的系统实例可能包括一些组成部分和元件物理性地操作和处理一个样本,以及物理性地操作一个样本架;而这些组成部分和元件可能包括但不限于,一个移液管、一个泵、一个离心机、其他用于移动和操作一个样本、一个样本架、移液管吸头、的容器机械装置,以及与一个样本或其他部分一起使用的试剂。在此显示的系统实例可能包括一些组成部分和元件用于化学分析,包括核酸分析、蛋白分析、普通化学分析、电化学分析和一个样本或样本部分的其他分析。

[0008] 此处显示的样本架和系统可能在任何地方被使用;此处显示的方法可能在任何地方被实施,包括一个临床实验室、一个研究实验室、一个诊所、一个医院、一个医生办公室、一个定点服务站以及其他任何适合的地点。此处显示的样本架盛接的样本,以及使用此处显示的系统和方法进行检测的样本包括任何生物学样本,而且可能是小容量的生物学样本。在实例中,一个样本可能是一个小容量的血液或尿液样本,而且容量可能小于大约250 μ L、或者小于大约150 μ L、或者小于大约100 μ L、或者小于大约50 μ L、或者小于大约25 μ L、或者小于大约15 μ L、或者可能等于或小于一次指尖采血所获得的血液容量。

[0009] 一个实例中,一种方法被提供用于对一份样本内细胞群细胞中感兴趣的一种成分进行测量,包括:a)对样本内细胞群细胞中表达的一种标记物进行定量测量;b)根据a)部分的测量结果,在计算机辅助下确定该样本内细胞群中含有的该细胞大致数量;c)根据b)部分中的结果,选择一个试剂剂量加入到该样本中,该试剂特异性地与该细胞群细胞中感兴趣的成分结合,并随时可被检测;d)根据c)部分的结果,向该样本中添加所选择的试剂剂量;e)检测该样本内的细胞用于了解试剂与感兴趣成分结合情况;并且f)根据与感兴趣成分结合的试剂数量,确定该样本内细胞群细胞中感兴趣成分的数量。在该方法的一个实例中,c)部分中的试剂是一种抗体。

[0010] 本申请在此处进一步显示了一种测量一份样本内细胞群细胞中感兴趣成分的方法,含有:a)对该样本内细胞群细胞中表达的一种标记物,或一种细胞特性进行定量测量;b)根据a)部分的测量结果,在计算机辅助下确定该样本内细胞群中含有的该细胞大致数量;c)向该样本中添加一定量的细胞标记物,所述的细胞标记物剂量根据b)部分中的结果而定,而且该细胞标记物特异性地与细胞群细胞中感兴趣的成分结合,并随时可被检测;d)检测该样本内的细胞用于了解该标记物与感兴趣成分结合情况;并且e)根据与感兴趣成分结合的标记物数量,确定该样本内细胞群细胞中感兴趣成分的数量。

[0011] 另一个实例中,一种用于聚焦显微镜的方法被提供,包括:a)将一种含有显微镜分析标的物的样本与一种已知大小的参照粒子混合,生成一种含有该样本和参照粒子的混合物;b)将步骤a)中获得的混合物暴露在显微镜光照路径内;c)将步骤a)中获得的混合物暴露在用于观察该参照粒子的光束下;并且d)根据混合物内参照粒子的位置,或根据参照粒子图像的清晰度聚焦显微镜。

[0012] 还是在另一个实例中,此处提供的是一种从含有多种细胞的样本中辨别其中一种细胞方法,包括:a)对多种细胞中的一种细胞进行检测,至少用于以下一个目的:(i)一种细胞表面抗原的表达;(ii)一种细胞表面抗原的数量;(iii)细胞大小;b)对a)中的细胞进行检测,至少用于以下一个目的:(i)细胞核大小;(ii)细胞核形态;c)检测a)和b)中的细胞用于定量的细胞光散射,其中来自a),b)和c)的结合信息被用来对含有多种细胞的该样本中的细胞进行辨别。

[0013] 还是在另一个实例中,此处提供的是一个系统,含有一个与盛接被检测样本的样本架一起使用的探测器组合。一个非限制性示范中,该样本架是一个比色皿,其内的一些结构和(或)材料使该比色皿能够被接合并从一个位置移动到该探测器组合配件处。在一些实例中,该探测器组合配件具有一个第一表面用来与该样本架的一个表面相衔接,在这样一种方式下,二者之间的交界面对从该探测器组合配件到该样本架内样本之间的光学路径不产生光学干扰。在一个实例中,该探测器组合配件可能具有一个以上的位置对应一个或多个样本架。一些实例可能具有同一个样本架对应每一个位置。可选择地,一些实例可能具有不同的样本架对应至少是其中的一些与探测器组合有关的位置。

[0014] 此处显示的一个实例中提供一个样本架,例如但不限于一个具备光学特性、尺寸、材料、和(或)物理特性的比色皿,以允许其盛接该样本通过探测器组合配件进行分析,同时保持该样本与该探测器组合配件物理性地分开且不直接接触。这对于含有有形成分的液体样本可以是非常有用的。

[0015] 此处显示的一个实例中,该探测器组合配件可能是一个多道显微镜单元,被设计用来探测、获取、或测量样本内一种细胞或多种细胞的形状、以及物理、光学和生物化学特性,所有这些都位于同一个设备内。它既可以提供定量信息也可以描述性信息。该探测器组合配件的一个实例可能使用同一种颜色和波长的多个标记物,而该探测器组合配件被设计用来对源自该样本内这些标记物(例如与样本内的细胞结合)的信号进行解旋,从而减少组合配件内所需的频谱轨道和光源的数量。

[0016] 应该理解的是,此处的一些实例可能包括一个样本架,例如但不限于一个比色皿,其材料具有增加暗视野照明的物理特征,而其中的一些结构被设计用于提供光反射(包括但不限于比色皿内的光反射),而且一些结构可能被选择性地设计用于机械性支持;实例中一些结构可能既提供机械支持也提供光反射。在实例中,一个样本架被设计成通过该样本架内光反射为一个样本提供透射照明。在实例中,一个样本架被设计成通过该样本架内光反射为一个样本提供透射照明;这个反射可能包括部分内反射(PIR),而且这种反射可能包括全内反射(TIR)。在实例中,一个样本架被设计成通过该样本架内光反射为一个样本提供透射照明,其中反射光光源与用于检测和测量光线的光学系统置于样本架的同一侧(例如,光源是一个落射照明光源)。

[0017] 此处的系统可以同时在暗视野成像中使用落射(直接)和透射(反射)照明。这与传统的暗视野成像有区别,后者使用落射照明或者透射照明,而不会同时使用两种类型的照明,而且不会从一个单一光源或单一方向或位置进行两种类型的照明。因此,此处显示的落射和透射照明结合体有别于已知系统,其中透射照明与落射照明产生自同一个光源。可选择地,一个塑形样本架,例如比色皿可以被用来提供透射照明。在实例中,一个样本架被设计成通过光反射提供透射照明。在实例中,一个样本架被设计成通过样本架内光反射提供透射照明。在实例中,一个塑形样本架的一个或多个尺寸、形状、表面、材料、或其他结构可以在该塑形样本架内有效地提供内反射光。在实例中,一个塑形样本架的一个或多个尺寸、形状、表面、材料、或其他结构可以在该塑形样本架内有效地提供部分内反射(PIR)光。在实例中,一个塑形样本架的一个或多个尺寸、形状、表面、材料、或其他结构可以在该塑形样本架内有效地提供全内反射(TIR)光。可选择地,透射照明的强度是不可忽略的。在实例中,一个塑形样本架可能包括一个有效增加透射照明强度的反射表面。暗视野光源可能是一个发

光二极管(LED)、激光、或其他可以提供所需照明和(或)激发波长的其他照明源。

[0018] 在一个实例中,显微镜物镜和光源,例如但不限于一个环形光(用于暗视野显微镜),的联合体之间存在一个物理距离,形成一个压缩空间用于该探测器组合配件。在一个实例中,只有在一个所需波长下或所需波长范围内的光线才能被射向样本。在一个实例中,该光线是非偏振光。在另一个实例中,该光线是偏振光。

[0019] 还是在另一个实例中,从流式细胞检测获得的信息,无论是源自样本准备阶段还是分析阶段,都会被用来指示和(或)触发一个继发操作。在实例中,这种继发操作可能是提醒我们直接进行人工审核。在实例中,这样的一个继发操作可能是使用一个估计的细胞计数或样本准备步骤中获得的其他信息来指导实施一个检测,这项检测可能是操作过程中稍后的一个步骤,或者可能是其他操作过程的一个检测。

[0020] 用来计数细胞的技术还可以提供一些方法处理带有非对称形状和(或)腔室表面的样本架。一种方法含有使用:a)一种容量计量的管道技术将一个样本的已知容量引入一个分析区域,例如样本架内的一个管道。该方法可能包括在样本架内计数细胞。因为我们知道样本的容量,所以我们也会知道容量中细胞的浓度(该操作可能在疏水性容器或比色皿或腔室有类似表面的样本架中执行)。另一个方法含有:b)一种基于比例的度量技术,将样本与一种已知数量的滚珠混合,根据观察到的滚珠数量计算样本中的细胞浓度。

[0021] 还是在此处描述的另一个实例中,被提供的一种方法含有测量有形血液成分,例如但不限于测量一份血液样本中的红细胞(RBC)容积,将RBC大致假设为球形并使用暗视野显微镜测量RBC容积。

[0022] 还是在此处描述的另一个实例中,被提供的一种方法含有测量血小板容积。该方法可能包括用一种荧光染料标记血小板并测量观察到的血小板大小;将已知尺寸的滚珠加入样本中;将观察到的滚珠图像大小与血小板图像相比较,用滚珠作为校准来确定血小板的大小,并确定样本中血小板的容积。

[0023] 还是在此处描述的进一步实例中,一些方法被提供用于一份样本的细胞形态学检测和测量;细胞数量的测量;粒子检测;粒子数量的测量;晶体检测;晶体数目的测量;细胞聚集的检测;细胞聚集数量的测量,以及一份样本中的其他特性和定量分析。

[0024] 鉴于此,本专利申请显示了:

[0025] 用于分析一份样本的一个系统,该系统包含:一个样本架,含有盛接所述样本的样本腔;所述样本架至少有一个部分含有一种光学透射材料;所述光学透射材料含有一个光学透射表面和一个反射表面;一个照明光源提供用于照明并穿透所述光学透射表面的光线;源自所述照明光源的光线对该样本架内的一个样本同时提供落射照明和透射照明,其中构成落射照明的光线从所述照射光源直接照射到所述样本,不必在该样本架光学透射材料的一个表面进行反射;而构成透射照明的光线在光学透射材料内走行,经过所述光学透射材料的至少一个表面进行的至少一次反射后才到达样本。在实例中,含有此处显示结构的一个系统的一个样本架可能具有一个加长管道用于盛接一个样本的比色皿。在实例中,该样本架可能具有一个或多个非光学透射表面。

[0026] 在此处所示的系统实例中,所述透射照明至少部分是由一个表面的内反射光所提供,而且可能至少部分是由比色皿内的全内反射光所提供。在此处所示的系统实例中,所述透射照明至少部分是由一个表面的内反射光所提供,而且可能至少部分是由比色皿内的部

分内反射光所提供。

[0027] 一个实例中,一个样本架可能含有两个或多个样本腔用于盛接样本。一个样本架,例如含有此处显示结构的一个比色皿,可能具有一个矩形水平横截面形状;可能具有一个圆形水平横截面形状;可能具有一个锯齿样垂直横截面形状;可能具有一个阶梯样垂直横截面形状;或者可能具有其他形状。

[0028] 在实例中,一个样本架可能相对一个照明光源是可活动的,而且可以活动到多个位点,其中该样本架的一个光学透射表面在每一个位点都可能被该照明光源照射。

[0029] 在实例中,一个照明光源可能包括一个环形光。在实例中,一个环形光可能从一个基于发光二极管(LED)的环形光和一个基于激光的环形光中进行选择。

[0030] 在实例中,作为此处显示的一个系统可能包括一个具有一种光学透射表面的支持结构,与该样本架的光学透射表面塑形衔接。

[0031] 在实例中,作为此处显示的一个系统可能含有一个加压设备设计用于将该样本架保持在一个所需位置通过照明光源进行照明。

[0032] 在实例中,作为此处显示的一个系统可能包含一个探测器设计用于对该样本架内一个管道的至少一个部分进行成像。

[0033] 在实例中,作为此处显示的一个样本架可能包括一个加长管道设计用来盛接至少一部分样本。

[0034] 在实例中,作为此处显示的一个样本架可能设计为成像期间将样本保持在一种静止、非流动状态;在实例中,一个样本架可能被设计为将样本的一部分保持在一种静止、非流动状态,而另一部分处于流动状态。

[0035] 在实例中,作为此处所显示的一个照明光源可能相对该样本架是可活动的。

[0036] 在实例中,作为此处所显示的一个样本架可能被设计为成像期间将该样本保持在一种流动状态。

[0037] 在实例中,作为此处所显示的一个样本架可能包括一个完全限制在该样本架内的液体回路,其中该样本位于所述液体回路内,有效地使该样本与所述探测器保持分开。

[0038] 在实例中,作为此处所显示的一个样本架可能相对该探测器是可活动的。在实例中,作为此处所显示的一个探测器可能相对该样本架是可活动的。

[0039] 在实例中,作为此处所显示的一个样本架和一个照明光源含有至少部分光学分析单元,而且该系统进一步包括一个临床分析单元对一份样本执行临床分析。

[0040] 在实例中,作为此处所显示的一个系统被设计用来将一个样本分装到一个光学分析单元和一个临床分析单元中,有效地使该临床分析单元和光学分析单元能够在同一时间对一份样本的一部分进行光学分析和临床分析。在实例中,这样一种临床分析可能从普通化学分析、核酸分析和酶联分析中进行选择。

[0041] 在实例中,作为此处所显示的一个系统可能包括多个临床分析单元,其中每一个这种临床分析单元都用来提供一种从普通化学分析、核酸分析和酶联分析中选择出的临床分析。

[0042] 本申请进一步提供一个比色皿,含有一个样本腔用来盛接一个样本,所述比色皿至少有一个部分含有一种光学透射材料;所述光学透射材料含有一个光学透射表面和一个反射表面;其中所述光学透射表面和所述光学反射表面被有效设计,使透过光学透射表面

的光线对样本腔中的所述样本同时提供落射照明和透射照明,其中构成落射照明的光线从所述照射光源直接照射到所述样本,不必在该样本架光学透射材料的一个表面进行反射;而构成透射照明的光线在光学透射材料内走行,经过所述光学透射材料的至少一个表面进行的至少一次反射后才到达样本。

[0043] 在实例中,此处所显示的一个比色皿具备一个含有一个加长管道的样本腔。在实例中,此处所显示的一个比色皿含有两个或多个样本腔用于盛接样本。

[0044] 在实例中,此处所显示的一个比色皿可能具有一个或多个非光学透射表面。

[0045] 在实例中,此处所显示的一个比色皿内可能提供的透射照明,至少一部分是该比色皿内的内反射光。在实例中,此处所显示的一个比色皿内可能提供的透射照明,至少一部分是该比色皿一个表面的部分内反射光。在实例中,此处所显示的一个比色皿内可能提供的透射照明,至少一部分是该比色皿一个表面的全内反射光。

[0046] 在实例中,此处所显示的一个比色皿可能具有一个矩形水平横截面形状;在实例中,此处所显示的一个比色皿可能具有一个圆形水平横截面形状。在实例中,此处所显示的一个比色皿可能具有一个锯齿样垂直横截面形状;在实例中,此处所显示的一个比色皿可能具有一个阶梯样垂直横截面形状。

[0047] 本发明申请在此处显示的方法:例如,本发明申请显示了一种方法用来从一份含有多种细胞的样本中辨别一种细胞:(a)将所述样本放入一个样本腔中用来盛接样本的样本架内,所述样本架至少有一个部分具有一种光学透射材料;所述光学透射材料具有一个光学透射表面和一个反射表面;其中所述光学透射表面和所述光学反射表面被有效设计,使透过光学透射表面的光线对样本腔中的所述样本同时提供落射照明和透射照明,其中构成落射照明的光线从所述照射光源直接照射到所述样本,不必在该样本架光学透射材料的一个表面进行反射;而构成透射照明的光线在光学透射材料内走行,经过所述光学透射材料的至少一个表面进行的至少一次反射后才到达样本;(b)所述样本架照明可以有效地同时提供对样本的落射照明和透射照明;(c)识别该样本内的一种细胞。在实例中,此处显示几种方法,包括所述鉴别方法在内,含有通过一个探测器识别所述细胞,该探测器被设计为对所述样本腔的至少一个部分进行成像。在此处显示的实例中,这种方法中使用的一个样本腔可能含有一个加长管道。

[0048] 本申请进一步显示了一种聚焦显微镜的方法,含有:a)将一种含有显微分析标的物的样本与一种已知大小的参照粒子混合,有效地生成一种含有该样本和该参照粒子的混合物;b)将步骤a)中获得的混合物置于显微镜光照路径内;c)将步骤a)中获得的混合物置于用来观察该参照粒子的光束下;d)根据混合物内该参照粒子的位置,或根据该参照粒子图像的清晰度聚焦显微镜。

[0049] 本申请显示一种从一份含有多种细胞的样本中识别一种细胞的方法,含有:(a)对多种细胞中的一种细胞进行检测至少用于以下一种目的:(i)一种细胞表面抗原的表达;(ii)一种细胞表面抗原的数量;(iii)细胞大小;b)对a)中的细胞进行检测,用于以下至少一个目的:(i)细胞核大小;(ii)细胞核形态;c)检测a)和b)中的细胞用于定量细胞光散射,使用来自a),b)和c)的联合信息对多种细胞样本中的该细胞进行识别。

[0050] 此处描述的至少一个实例中,一个系统用来对一个样本进行成像,该系统含有:包含所述样本的一个样本容器,一个平台含有一个具有一个光学透射表面的样本容器接受

器；一个光源用来通过该平台对该样本内的有形成分进行照明，其中该样本容器有一个交界表面用来与该样本容器接收器的光学透射表面向衔接，而该交界表面与该光学透射表面相符合，当光线穿透该交界表面时不会产生明显的变形。

[0051] 应该理解的是此处的实例可能被设计包括以下一项或多项结构。例如，该样本容器的交界表面可能由一种高分子聚合物材料形成。可选择地，这可能是一种透光材料。可选择地，形成该样本容器交界表面的材料可能使用比该样本容器接收器光学透射表面更柔软的材料。可选择地，一个加压单元被提供用来向该交界表面施压，以符合该样本容器接收器光学透射表面所设计的形状。可选择地，一个处理单元可能被设计用来与该样本容器耦合，帮助运输该样本容器上下平台，并增加该样本容器的机械强度。可选择地，该处理单元可能是一个不透光单元设计用来与该样本容器耦合。可选择地，该处理单元可能形成一些物理性的结构，突起或类似物，有助于与一个自动操纵器、移液管单元，或其他机械性搬运器相衔接。可选择地，该处理单元可能由磁性、电磁性、或其他特性形成，有助于衔接和(或)脱离。可选择地，不必通过大致直线的光线穿透一个表面然后从对侧表面穿出照射到一个探测器上这样的过程，该样本的所有图像即可能被完成。可选择地，该光源不必位于该样本容器的一侧而将光线传输到该样本容器对侧的一个探测器上。

[0052] 应该理解本发明的实例可能适合本发明中所描述的一项或多项结构。

[0053] 所提供的这个摘要以简化形式介绍了一个概念的选择，这些概念将在以后的详细描述章节做进一步介绍。本摘要的意图不是对所权利要求的标的的关键结构或必要结构进行识别，也不是用来对所权利要求的标的进行限制。

[0054] 附图简要说明

[0055] 图1显示：(A)侧向散射强度(X轴)与一种混合细胞荧光强度的制图，该混合细胞含有荧光标记的自然杀伤细胞和中性粒细胞，该荧光标记物可以识别CD16；(B)条形图显示了细胞核区域与自然杀伤细胞(NK)和中性粒细胞(Neu)所有细胞区域的比例；(C)经抗-CD16抗体染色(左侧柱)和细胞核染色(右侧柱)的自然杀伤细胞；(D)经抗-CD16抗体染色(左侧柱)和抗核染色(右侧柱)的中性粒细胞。

[0056] 图2显示：(A)荧光共轭抗CD41和CD61抗体标记的血小板(亮点)；(B)荧光标记的血小板在10倍(左)和20倍(右)放大镜下的强度分布图像；(C)荧光标记的血小板强度分布图像显示了测量强度(浅灰色)和该测量强度的拟合曲线(深灰色)。

[0057] 图3显示：曲线图显示标准粒子公称直径m(x-轴)与基于荧光强度的尺寸测量a.u.(Y轴)之间的关系。(y-轴)。该图还显示了沿曲线不同点所表现的滚珠数量。

[0058] 图4显示：比色皿内经暗视野显微成像的球形红细胞，(A)比色皿仅接受落射照明；(B)比色皿接受落射和透射混合照明。

[0059] 图5显示：(A)抗-CD16抗体染色和细胞核染色的杆状中性粒细胞(B)抗-CD16抗体染色和细胞核染色的分叶核中性白细胞。

[0060] 图6A显示的一个光学系统实例，该系统适合作为此处所示设备或系统的一部分，并适合按此处所示方法使用，包含典型的光学系统(例如一个显示为环形光的光源和一个物镜)、比色皿、和一个支持结构，用于盛接和定位一个比色皿以进行成像。在这个实例中，该比色皿具有一个矩形水平横截面。

[0061] 图6B显示的一个光学系统实例，该系统适合作为此处所示设备或系统的一部分，

并适合按此处所示方法使用,包括示范性的光学系统(例如一个显示为一个环形光的光源和一个物镜)、比色皿、和一个支持结构用于盛接和定位一个比色皿以进行成像。在这个实例中,该比色皿具有一个圆形水平横截面。

[0062] 图7A显示的一个光学系统元件的实例,这些元件适合作为此处所示设备或系统的一部分,并适合按此处所示方法使用。

[0063] 图7B显示的一个光学系统元件的实例,这些元件适合作为此处所示设备或系统的一部分,并适合按此处所示方法使用,含有一个远镜头和一个光圈适合限制到达一个探测器的散射光角度范围。

[0064] 图8A提供了一个光学系统实例视图,包括一个支持结构盛接一个比色皿以对一个样本进行成像,其中源自一个环形光照明系统的光线直接落在该样本上(落射照明);而且光线还可以经过比色皿的一些结构进行反射,从而提供透射照明。在这个实例中,该比色皿具有一个阶梯形的垂直横截面。

[0065] 图8B提供了一个光学系统实例视图,包括一个支持结构盛接一个比色皿以对一个样本进行成像,其中源自一个环形光照明系统的光线直接落在该样本上(落射照明);而且光线还可以经过比色皿的一些结构进行反射,从而提供透射照明。如图所示,入射光线可能被一个表面完全反射(全内反射,TIR),或者入射光线的一部分可能被一个表面反射(部分内反射,PIR)。在这个实例中,该比色皿具有一个锯齿形的垂直横截面。

[0066] 图8C显示的一个光学系统实例,该系统适合作为此处所示设备或系统的一部分,并适合按此处所示方法使用,包括示范性的光学系统(例如一个显示为环形光的光源和一个物镜)、比色皿、和一个支持结构用于盛接和定位一个比色皿以进行成像。在这个实例中,该比色皿包括一些结构对照射到该比色皿和比色皿内样本的光线路产生影响。

[0067] 图8D显示的一个光学系统实例,该系统适合作为此处所示设备或系统的一部分,并适合按此处所示方法使用,包括示范性的光学系统(例如一个横向照射的光源)、比色皿、和一个支持结构用于盛接和定位一个比色皿以进行成像。在这个实例中,该比色皿包括一些结构对照射到该比色皿和比色皿内样本的光线路产生影响。

[0068] 图8E提供了一个流程图显示了一个比色皿从一个样本准备部位到一个接近一个光学探测器(标记为D)的样本观察位置的传送过程。

[0069] 图8F提供了一个进一步的、详细的流程图显示了包括一个传送机制的系统,该传送机制用来将一个比色皿从一个样本准备部位传送到一个接近一个光学探测器的样本观察位置。

[0070] 图9是一个混合图像,显示了由全血中获得的血细胞图像,使用了不同的成像技术和染色。图9A是一个暗视野图像;图9B是一幅显示了附着在单核细胞上的荧光标记的抗-CD14抗体图像;图9C是一幅显示了附着在嗜碱细胞上的荧光标记的抗-CD123抗体图像;图9D是一幅显示了附着在中性粒细胞上的荧光标记的抗-CD16抗体图像;图9E是一幅显示了附着在白细胞上的荧光标记的抗-CD45抗体图像;图9F是一幅显示了细胞核DRAQ5[®]染色的白细胞和血小板细胞图像(红细胞缺乏细胞核,不能被DRAQ5[®]染色)。

[0071] 图10是一个混合图像,显示了从全血中获得的血细胞图像,显示了一个单核细胞、一个淋巴细胞、一个嗜酸粒细胞、一个嗜碱粒细胞、和一个中性粒细胞。

[0072] 图11显示了从不同标记物标记的细胞上探测到的荧光图表(标记的抗体定向不同

的细胞表面标记物或其他标记物) ; 这种多标记方法对识别细胞很有用。图11A显示通过绘制标记的CD14强度 (FL-17) 和散射强度图对单核细胞进行识别。图11B显示通过绘制标记的CD123强度 (FL-19) 和CD16强度 (FL-15) 图对嗜碱性细胞进行识别。图11C显示通过绘制标记的CD16强度 (FL-15) 和CD45强度 (FL-11) 图对淋巴细胞进行识别。图11D显示通过绘制标记的CD16强度 (FL-15) 和散射强度 (FL-9) 图对中性粒细胞进行识别。

[0073] 图12显示了使用目前的方法和使用其他方法(使用商用全血分析仪)获得的细胞计数(对同一个血液标本的分装样本进行测量)结果比较。图12A绘图显示了从目前方法中获得的白细胞计数和使用商业化全血计数仪获得的白细胞计数。图12B绘图显示了从目前方法中获得的红细胞计数和使用商业化全血计数仪获得的红细胞计数。图12C绘图显示了从目前方法中获得的血小板计数和使用商业化全血计数仪获得的血小板计数。图12D绘图显示了从目前方法中获得的中性粒细胞计数和使用商业化全血计数仪获得的中性粒细胞计数。图12E绘图显示了从目前方法中获得的单核细胞计数和使用商业化全血计数仪获得的单核细胞计数。图12F绘图显示了从目前方法中获得的淋巴细胞计数和使用商业化全血计数仪获得的淋巴细胞计数。

[0074] 详细描述

[0075] 可能有助于理解本发明设备、系统和方法所有涵盖范围和优势可能在以下专利中有所描述和显示说明,例如美国专利7,888,125;美国专利8,088,593;美国专利8,158,430;美国专利8,380,541;美国专利申请序列号13/769,798,申请日期2013年2月18日;美国专利申请序列号61/802,194,申请日期2013年3月15日;美国专利申请序列号13/769,779,申请日期2013年2月18日;美国专利申请序列号13/244,947,提交日期2011年9月26日;PCT/US 2012/57155,提交日期2012年9月25日;美国申请序列号13/244,946,提交日期2011年9月26日;美国专利申请13/244,949,提交日期2011年9月26日;以及美国申请序列号61/673,245,提交日期2011年9月26日,所有这些专利和专利申请都以引用的方式并入本文。

[0076] 应该理解的是,无论前面的一般描述还是后面的具体描述都仅仅是示范和解释,对所权利要求的标的没有限制性。应该注意的是,除非上下文明确指明,用在规范和附加权利要求中的单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“这个,该(the)”包括复数概念。因此,诸如参照“一种材料”的概念可能包括几种材料的混合;“一种成分”的概念可能包括多种成分,以此类推。此处引用的参考文献已被完全纳入本文,除非其覆盖范围与规范中事先明确指出部分相抵触。

[0077] 在接下来的规范和权利要求中将会涉及到一些术语,这些术语被定义为以下含义:

[0078] “可选择的”或“可选择地”意味着后面描述的情形可能发生也可能不发生,所以其描述包括情形发生的情况和不发生的情况。例如,如果一种设备“可选择地”含有一种结构用于一个样本收集单元,这意味着该样本收集单元可能存在或可能不存在,因此该描述既包括具有该样本收集单元的设备结构,也包括不具有该样本收集单元的设备结构。

[0079] 像此处使用的,名词“可观的,大量的”意味着大于一个最小的或微不足道的数量;而“可观地”意味着大于一个最低限度或轻微地。因此,例如用于此处的词组“极大的差异”指出在两个数值之间存在着明显的高度差异,因此该领域的技术人员应该考虑这两个数值之间的差异在被所述数值所测量的特征范围内是有统计学意义的。因此,这两个相互之间

有极大不同的数值之间的差异通常大于大约10%，而且作为一个参考值或比较值函数，可能大于大约20%；大于大约30%、大于大约40%、或大于大约50%。

[0080] 像此处使用的，“内反射”指在一种材料（第一种材料）内的光反射，发生在第一种材料和其他材料（第二种材料）之间的一个分界线上。例如，第一种材料可能是一个固体，例如一种玻璃或塑料，而第二种材料可能是空气。内部反射的光线被反射之前在第一种材料内走行。内反射可能是部分性的（部分内反射：PIR）或者是全部的（全内反射：TIR）。因此，所有的入射光线在一个表面被反射回第一种材料内的内反射是TIR；不是所有的入射光线在一个表面被反射回第一种材料内的内反射是PIR。（对于PIR，一些光线可能穿过该交界线，而一些光线在该表面被反射回该材料内。）入射角度是决定内反射程度的一个重要因素；它是测量一条入射光线与垂直于该交界面的一条直线之间的角度。是否发生TIR有赖于相对于第一种材料和第二种材料交界表面的入射光角度、第一种材料的折射指数、第二种材料的折射指数以及其他因素（例如光线的波长可能影响TIR，因为折射指数通常会随着波长而变化）。光线被完全内反射的角度称为临界角；入射角度大于临界角的入射光线将被完全地内反射（被保留在该材料内：TIR）。然而，对于PIR，入射角度小于临界角的入射光线中的一部分会被内反射（剩余的光线被折射并穿出第一种材料进入第二种材料）。

[0081] 像此处使用的，一个“样本”可能是，但不限于一个血液样本，或者一个尿液样本，或者其他生物学样本。一个样本可能是，举例来说，一个血液样本（例如，一个样本来自于一个指尖穿刺、或静脉穿刺、或一个动脉血液样本，以及可能是全血、血清、血浆、或其他血液标本）、一个尿液样本、一个病理标本、一张组织切片、粪便标本、或其他生物学标本；一个水样本、一个土壤样本、一个食物样本、一份空气样本；或其他样本（例如鼻拭子或鼻咽冲洗液、唾液、尿液、泪液、消化液、脊髓液、粘液、汗液、耳垢、油脂、腺体分泌物、脑脊液、组织、精液、宫颈分泌物、阴道分泌物、滑囊液、咽拭子、呼吸物、头发、指甲、皮肤、病理标本、胎盘液、羊水、脐带血、淋巴液、体腔液、痰液、粘液、脓液、一种微生物样本、胎便、乳汁和（或）其他分泌物）。

[0082] 这样，像此处使用的，一个“样本”包括一个血液、尿液、或其他生物学样本的一部分，可能是任何合适的尺寸或容量，而且首先倾向于小的尺寸或容积。在该系统的一些实例中，此处显示的检测和方法，其测量可能是通过使用一种小容量的血液样本，或者不多于一个血液样本的一小部分容量来进行，这里的小容量含有不多于大约5mL；或含有不多于大约3mL；或含有不多于大约2mL；或含有不多于大约1mL；或含有不多于大约500μL；或含有不多于大约250μL；或含有不多于大约100μL；或含有不多于大约75μL；或含有不多于大约50μL；或含有不多于大约35μL；或含有不多于大约25μL；或含有不多于大约20μL；或含有不多于大约15μL；或含有不多于大约10μL；或含有不多于大约8μL；或含有不多于大约6μL；或含有不多于大约5μL；或含有不多于大约4μL；或含有不多于大约3μL；或含有不多于大约2μL；或含有不多于大约1μL；或含有不多于大约0.8μL；或含有不多于大约0.5μL；或含有不多于大约0.3μL；或含有不多于大约0.2μL；或含有不多于大约0.1μL；或含有不多于大约0.05μL；或含有不多于大约0.01μL。

[0083] 在实例中，通过指尖穿刺采集的样本容量可能是诸如大约250μL或以下、或大约200μL或以下、或大约150μL或以下、或大约100μL或以下、或大约50μL或以下、或大约25μL或以下、或大约15μL或以下、或大约10μL或以下、或大约5μL或以下、或大约3μL或以下、或大约

1 μ L或以下。

[0084] 像此处所使用的,术语“定点服务地点”可能包括一个实验对象可能接受一项服务的地点(例如检查、监护、治疗、诊断、指导、样本采集、ID确认、医疗服务、非医疗服务等等);以及可能包括但不限于,一个实验对象的家里、一个实验对象的工作地点、一个医疗服务提供人员(例如医生)的地点、医院、急诊室、手术室、诊所、医疗服务专业人员的办公室、实验室、零售店【例如药店(例如零售药店、临床药店、医院药店)、药房、超市、食品店等等】、交通工具(例如轿车、船、卡车、公共汽车、飞机、摩托车、救护车、活动专门设备车、消防车、急救车、执法车辆、警车、或用于将一个实验对象从一个地点运送到另一个地点的其他车辆等等)、旅游医疗服务单元、移动单元、学校、育儿中心、安检地点、比赛场所、医疗辅助生活住宅、政府办公室、写字楼、帐篷、体液样本获取站点(例如采血中心)、位于或临近一个实验对象可能希望进入的一个地点的入口处、位于或临近一个研究对象可能希望使用的一个设备地点(例如一台计算机所处的地点,如果该研究对象希望使用这台计算机)、一个样本处理设备接收一个样本的地点、或者此文其他地方描述的任何其他定点服务地点。

[0085] 作为生物学样本上下文中所使用的专有名词“细胞”,包含通常与个体细胞大小相近似的样本,包括但不限于小囊泡(像脂质体)、细胞、病毒颗粒、以及与小粒子诸如滚珠、纳米颗粒或微球结合的物质。

[0086] 像此处所使用的,专有名词“结合”指的是两种材料之间的一种反应或相互作用,它导致两种物质的紧密结合,例如一个配体和一个受体之间的一种反应提供了一个结合的例子,其中该配体变得牢固地与受体相连接,一种抗体与其目标抗原间的结合,以及一种载体蛋白与其负载物结合,例如内因子与维生素B,都是一种物质与其他物质反应的进一步示范。

[0087] 像在此处所使用的,专有名词“结合剂”通常指的是任何复合物或高分子,例如一种抗体,它可以牢固地或特异性地与一个目标相连接。这些结合剂包括但不限于抗体(多克隆或者是单克隆、抗体片段、免疫黏附剂、以及其他类似的抗体变体和复制品)、自然结合蛋白(例如特定针对维生素B12的内在因子蛋白)、与其目标受体结合的配体、与特殊酶相结合的作用底物、结合配对例如亲和素和生物素、与目标分子牢固且特定结合的小分子、以及类似物质。细菌、病毒、合成支架、以及其他结合或黏附于特定目标的物质或材料可能被用作结合剂。一个结合剂可能是、或者可能包括、或者可能连接于一个标记物诸如一种染料、或荧光团、或其他可探测到的另一半。

[0088] 像此处所使用的,一个“标记物”是一种可探测到的物质,它的表达使一个目标变为可见或可被探测到;或者它在一个位置或地方的出现指示了一个目标在那个位置或地方的表达。一种标记物可能被用来标记一种细胞、结构、粒子、或其他标的物,而且可能有助于发现、确定表达、定位、确认、定量、或测量一个样本内的一种标的物或特性。标记物可能包括但不限于染色剂、染料、配体、抗体、粒子、以及其他可能结合或定位于某些特定标的物或地点的物质;可能生长或定位某些特定标的物或地点的细菌、病毒、或细胞液也可能被用作标记物;可探测到的细胞或其他标的物的属性或特性也可能被用作标记物。

[0089] 像此处所使用的,专有名词“着色”和“染色”可能被相互替换,指的是一些元素、复合物和大分子,它们可以使一个样本中的物质或成分变得比没有经过着色或染色处理时更容易被探测到。例如,经过一种DNA染料诸如碘化丙啶处理的一份血液样本可以使有核细胞

的核仁更容易见到,而且使这种细胞的探测或定量分析变得比不染色时更容易,它甚至还可以在非有核细胞(如红细胞)中表达。

[0090] 像此处所使用的,一个“探测器”可能是任何一种设备、装置或系统,它可以提供来自一个信号、图像的信息或其他与标的物,诸如一个样本,相关的信息。可探测信号或信息可能包括诸如光学、电子、机械性、化学、物理、或其他信号。一个探测器可能是诸如一个光学探测器、或一个电子探测器、或一个化学探测器、或一个电化学探测器、或一个声学探测器、或一个温度探测器、或一个机械性探测器、或其他探测器。

[0091] 像此处所使用的,一个“光学探测器”探测电磁辐射(例如光线)。一个光学探测器可能探测到一幅图像或与一副图像一同使用;或者可能探测到光束强度而不考虑图像;或者二者兼有。一个光学探测器可能探测或测量光线的强度。一些光学探测器可能敏感于,或限制于探测或测量一种特殊波长或一个范围内的波长。例如,光学探测器可能包括光电二极管探测器、光电子增倍管、电荷耦合设备、激光二极管、分光光度计、照相机、显微镜、或其他设备,它们能够测量光线强度(一种单一波长、多个波长、或一个范围内、或几个范围内的波长)、形成图像,或二者兼有。

[0092] 这里所用的专有名词“倍数性”指的是一个细胞内的DNA数量,以及对一个样本内细胞的DNA含量进行检测和测。倍数性测量提供了一种测量方法,它不必考虑一个细胞或一群细胞是含有一个正常数量的DNA还是异常数量的DNA;或者,DNA在细胞分裂和增值期间被复制时,在增值细胞群中其DNA数量是否正常。倍数性测量可能在对一个样本内的有核细胞用一种DNA特定染料进行染色后通过成像技术来完成。

[0093] 定量分析显微技术

[0094] 在一些实例中,此处的一些方法、系统、和设备被提供用于显微定量分析技术。显微定量分析技术可能涉及一个或多个荧光定量分析显微法、暗视野定量分析显微法、亮视野定量分析显微法、以及定量分析时相对比显微技术的方法来测量一种或多种细胞属性。这其中的任何一种方法都可能提供有关细胞的形态学信息。这种信息可能被定量测量。在一个实例中,作为显微定量分析技术,一个样本会被一个或多个荧光定量分析显微法、暗视野定量分析显微法、亮视野定量分析显微法、以及定量分析时相对比显微技术所分析。显微定量分析技术可能包括使用成像分析技术和(或)统计学学习和分类方法去处理经显微技术获得的图像。

[0095] 在显微定量分析技术中多种不同的细胞属性可能被测量。可能被测量的细胞属性包括但不限于:

[0096] 物理属性:例如:细胞大小、体积、传导性、低角度或高角度散射、以及密度。其他可能被测量和(或)定量分析的物理属性包括但不限于一个细胞或粒子的圆度、一个细胞或粒子的宽高比、一个细胞或粒子的周长、一个细胞或粒子的凸度、一个细胞或粒子的粒度、一个细胞或粒子的图像密度、一个细胞或粒子的高度(例如穿过几个聚焦平面的大小)、一个细胞或粒子的平度以及其他物理属性。

[0097] 形态学属性:例如细胞形状、面积、大小和分叶性;细胞核形状、面积、大小和分叶性;线粒体形状、面积、大小和分叶性;以及细胞核体积与细胞体积比。

[0098] 细胞内属性:例如细胞核质心/细胞质心的距离(即细胞核中心与细胞中心的距离);细胞核核叶质心的距离(即细胞核不同核叶中心的距离);细胞内的蛋白质分布(即肌

动蛋白、微管蛋白等等) ; 细胞内细胞器的分布 (即溶酶体、线粒体等等) ; 蛋白与其他蛋白和细胞器的共定位以及其他属性。

[0099] 生物化学属性: 例如细胞蛋白的表达水平、细胞表面蛋白、胞浆蛋白、核蛋白、细胞核酸、细胞表面核酸、胞浆核酸、细胞核核酸、细胞碳水化合物、细胞表面碳水化合物、胞浆碳水化合物和细胞核碳水化合物。

[0100] 在一些实例中,一些方法、系统和设备被提供用于一个样本内两个、三个、四个、五个或多个细胞属性的定量测量,其中这些属性选自物理属性、形态学属性、细胞内属性以及生物化学属性。在一些实例中,一些方法、系统和设备被提供用于一个样本内两个、三个、四个、五个或多个细胞属性的定量测量,其中这些属性选自: 细胞大小、细胞体积、细胞传导性、细胞低角度光散射、细胞高角度光散射、细胞密度、细胞形状、细胞面积、细胞分叶性; 细胞核形状、细胞核面积、细胞核大小、细胞核分叶性; 线粒体形状、线粒体面积、线粒体大小、线粒体分叶性; 细胞核体积与细胞体积比、细胞核质心/细胞质心的距离、细胞核核质心的距离、细胞内的蛋白质分布 (即肌动蛋白、微管蛋白等等) ; 细胞内细胞器的分布 (即溶酶体、线粒体等等) ; 一种细胞蛋白的表达水平、一种细胞表面蛋白表达水平、一种胞浆蛋白表达水平、一种核蛋白表达水平、一种细胞核酸表达水平、一种细胞表面核酸表达水平、一种胞浆核酸表达水平、一种细胞核核酸表达水平、一种细胞碳水化合物表达水平、一种细胞表面碳水化合物表达水平、一种胞浆碳水化合物表达水平和一种细胞核碳水化合物表达水平。

[0101] 在一些实例中,一些方法被提供通过显微镜对一个生物样本内两个、三个、四个、五个或多个细胞属性的定量测量,其中该方法可能包括一个或多个以下步骤或元素: 被定量测量的细胞属性可能选自上面紧邻段落所列举的属性。生物学样本可能在显微分析之前被预处理。预处理可能包括任何辅助显微镜对样本进行分析的操作,包括: 处理样本使感兴趣细胞浓缩以用于显微分析、处理样本以减少样本中可能干扰显微分析的成分、向样本中加入一些物质以辅助显微镜下对样本进行分析 (例如稀释、阻断分子以减少染料非特异性地与细胞结合等等) 。可选择地,在显微分析之前,一个样本可能与一个或多个与一种细胞成分特异性结合的结合剂相接触。结合剂可能直接与一种染料或其他粒子相连接以显示该结合剂。一个样本还可能与一个第二结合剂相接触,它与和细胞成分相结合的结合剂相结合。第二种结合剂可能直接与一种染料或其他粒子相连接以显示该结合剂。在显微分析之前,一个样本可能在一个分光光度计内被检测。进行显微分析时,一个含有或怀疑含有显微分析目标的生物学样本可能被放置到一个样本架中,例如一张幻灯片或一个比色皿。含有一个样本的该样本架可能被放置到一个拟对该样本进行显微定量分析的设备中。该显微镜可能与一个图像传感器耦合在一起,用来拍摄通过物镜生成的图像。在该设备中,样本的多幅图像可能被显微镜获取。任意一种或几种荧光定量分析显微法、暗视野定量分析显微法、亮视野定量分析显微法、以及定量分析时相对比显微技术可能被用来获取样本图像。可选择地,该样本架中的整个样本图像可能被显微镜获去。可能需要显微镜的多个视野视图以拍摄该样本架内的整个样本的图像。该样本架可相对于显微镜移动,或者该显微镜相对于样本架移动以便生成不同的视野来检查该样本架内样本的不同部分。该样本架内样本在同一个视野内可能被获取多幅图像。可选择地,多个滤光镜可能使用在同一种类型的显微镜以及该样本的同一个视野下,以便对同一个样本获取不同的图像,这些图像含有与该样本

有关的不同信息。可能被使用的滤光镜包括但不限于带通滤光镜和长通滤光镜。滤光镜可能允许一定波长的光线透过,但阻断其他光线通过。可选择地,多种类型的显微镜(例如荧光、暗视野、亮视野等等)可能被用于获取该样本同一个视野下的图像,以便对同一个样本获取不同的图像,这些图像含有与该样本有关的不同信息。可选择地,摄像技术可能被用于显微镜图像采集。可选择地,显微镜图像可能以3维形式被收集。作为这里所描述的显微镜实施方法,该设备或系统可能被设计将该样本一副图像中一种细胞的相关信息与该样本中同一种细胞的不同图像相连接。根据同一个样本和(或)同一种细胞的不同图像,样本中细胞的多个属性即可能被探测到。在一些方面,将一个样本内细胞的多个属性/多个信息片段相结合可能被用来完成一项临床决定和(或)对该类细胞做出某种结论,这些如果仅依靠该细胞的一个单一属性信息是不可能获得的。

[0102] 一些实例中,一些设备和系统被提供用于显微镜下对一个生物样本中的两个、三个、四个五个或多个细胞属性进行定量测量。在一些实例中,该设备或系统同时含有一个显微镜或细胞计数仪和一个分光光度计。该设备或系统可能进一步含有一个液体处理装置,设计用来在一个分光光度计和一个显微镜或细胞计数仪之间移动样本。在一些实例中,用于执行此发明方法的设备和系统在美国专利申请号13/244,947,和美国专利申请序列号13/769,779中有所描述,这些都以引用的方法纳入本文中。尽管在前面有关细胞的上下文中已经被描述,我们还是应该理解,前面所述的部分或全部也可能被应用于晶体、粒子、微丝、或其他可能在一份样本中发现的细胞大小的物体。

[0103] 动态稀释

[0104] 一些实例中,一些方法、系统、和设备在此处被提供用于对含有细胞的样本进行动态稀释。

[0105] 按非限制性示范所示,一种用于样本动态稀释的方法可能包括以下一个或多个步骤或元素,以确定该样本内细胞或标的物的一个所需数量或浓度,该信息作为一个因素被用来对其后的样本处理过程进行调整。在这个非限制性示范中,一种或多种染色剂或染料被添加至一个含有细胞的生物样本中。该染色剂和样本的混合物可能被孵育。染色剂和样本混合物中的该种细胞可能被洗涤以除去多余(未结合)的染色剂。这种被染色、洗涤的细胞可能被稀释至一个所需容量以备进一步分析。这种被染色、洗涤的细胞可能被分析以确定该样本或一部分样本内细胞的大概数量或浓度。根据该样本或一部分样本内被染色细胞的数量或浓度,可能会获得一个样本的容量已备进一步分析,也就是说获得了一个进一步分析所需的细胞数量或浓度。在一些实例中,该样本可以按照美国专利申请号13/355,458中所述进行稀释,该描述以引用的方式完全并入本说明。

[0106] 此处所述的一个实例中,需要提供另一项探测技术,例如但不限于使用基于荧光的方法来计数细胞,并取代细胞计数估计细胞的浓度。这种估计之所以被具体描述,是因为为了对患者的样本进行准确和重复染色,经常需要将染色剂(DNA染料/抗体/结合剂等等)选择性地对一个特定数量/浓度的细胞进行滴定。例如,将一种已知浓度的染色剂应用到一种特定数量的细胞中(例如,0.2微克染色剂/千个白细胞(WBC))。孵育一段时间以后,该样本被洗涤以除去多余(未结合)染料,置备成适当的细胞密度,并进行成像。

[0107] 在这个非限制性示范中,为了对一种目标类型细胞的浓度级进行估计,一个样本会使用一种与细胞计数不同的方法,例如但不限于一个分光光度计,进行非破坏性测量,以

便对其进行细胞计数检测。该方法可能含有选择另一种感兴趣细胞群特异性的标记物。在一个非限制性示范中,针对B细胞,我们可能选择CD20。处理过程含有用与CD5不同颜色的一种荧光共轭抗CD20结合剂标记样本。然后使用一种设备,例如但不限于一个荧光分光光度计非破坏性地对该样本中的荧光信号进行快速测量。使用校准,有可能准确性有限地预测B细胞浓度来提供估计数值。在一个非限制性示范中,这种校准可能将信号强度与反应此种信号的细胞数量联系起来。建立这些校准曲线可以用来估计细胞或标的物的数量。根据一个整体信号强度,例如但不限于光学、电子、声学或类似信号估计细胞数量的其他技术不被除外。根据B细胞的大致浓度,可以估计出抗CD5结合体的正确数量和浓度,从而保持CD5的表达与CD5荧光之间的比例关系。在这种方法中,该染色剂和染色过程可以针对一个特殊的细胞数目被优化/标准化。

[0108] 为了最大限度地使用所获得的病人样本(该样本可能是小容量样本,例如从之间采血获得的全血,其容量小于等于120 μ L),需要研究出一些方法可以用来计数一个给定容量血液中所含有的WBCs数量(例如确定其浓度WBCs/ μ L)。这允许我们在添加染色剂以前确定,至少是估计WBCs的数量。数目一旦确定,所需的细胞数量即可被分装用来与一个已知浓度的染色剂进行孵育,从而产生该细胞亚群的理想分辨率。

[0109] 在一个需要测量细胞倍体数的应用中,一个样本内的细胞可能被一种DNA染料染色,然后对该染色密度进行定量分析(这里的“染色密度”是指染料的光学信号密度)。这种染色剂的染料信号密度有赖于DNA/染料的比例(就是说,被染料染色的DNA数量与添加的染料总量比值)。如果将一个预先设定数量的染料添加到每一个样本中,无论样本的特性如何,高细胞浓度的样本将比低细胞浓度的样本亮度低。这种情况将会混淆对每个细胞中DNA含量的定量分析。正像此处所显示的,在添加染料之前,对一个样本内的有核细胞数量进行估计能够允许我们调整染色剂用量,以便对样本内每个细胞的DNA和DNA含量进行定量分析。因此,举个例子,一个样本或一个分装的样本可能被一种染色剂或染料处理,而这种染料直接指向代表被定量测量细胞的一种细胞表面标记物,而这种表面标记物被用来对该样本内的细胞浓度进行非破坏性的估计。这个估计的浓度可能被用于计算需要添加到该样本中的染料数量,以便始终维持一个恒定的DNA-染料比率(摩尔:摩尔)进行以后的测量。

[0110] 在一个采用基于荧光的方法计数细胞的第一个示范中,一种方法可能包括对细胞的倍体数进行确定(例如通过荧光共轭抗体染色计数细胞)。在这个非限制性示范中,需要计数一份血液样本中的WBCs,这样一个指定数量的WBCs可以被预先确定好的DNA染料浓度染色(例如,4'-6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI),或者1,5-二氨基-4,8-二羟基-9,10-蒽二酮(DRAQ5[®]),或者碘化丙啶,或者其他DNA染料)。这个示范中的方法含有使用一种荧光共轭抗体和一个分光光度计计数WBCs。应该理解的是,当使用一种DNA染料染色细胞并确定倍体数时,这种方法可能是有帮助的,此时需要一个细胞数量与DNA染料浓度的比值(细胞#: [DNA染料])来生成可比较的以及稳定的数据。鉴于健康人群中每毫升全血的细胞数量有变异,因此明显需要在试图进行倍体数染色之前确定每毫升血中的WBCs数量。

[0111] 在一个实例中,该操作含有首先使用一种荧光共轭抗体(首选一种抗体定向广泛表达的抗原,例如CD45;或一种细胞亚群的特异性抗体,例如针对T细胞的CD3),或者可以标记所有细胞的荧光染料(例如,一种细胞膜或胞浆染色诸如伊红,或一种血凝素或其他染色剂或染料)染色的细胞,此时来自荧光团的荧光波长与DNA染料的辐射波长被光谱性地区

别开来(首选其间有一定距离的波长)。孵育一段时间以后,该样本被洗涤以除去多余(未结合)的抗体,制备成适当的容量并通过一台分光光度计进行分析。随之而产生的数据允许对一个血液样本中的WBCs数量进行确定,以至于一个特定容量的血液标本可以被分装(生成一个特殊/所需数量WBCs)并被DNA染料染色。随之而产生的数据在计算并调整用于染色一个标本的DNA染料数量时是非常有用的,根据所确定WBCs数量使用所描述的荧光团共轭抗体。

[0112] 一个进一步的实例含有在细胞表面染色之前确定细胞的数量(通过DNA染色)。额外的描述也可能会在下面的细胞计数部分被找到。有时需要对一个血液样本内的WBCs进行计数以使一个指定数量的WBCs可以被最佳浓度的抗体所染色。在一个实例中,该方法含有使用DNA染料和一个分光光度计计数WBCs,如上所述。

[0113] 或者,如果染色前每毫升的细胞数量已经被确定,那么一个已知数量的细胞可以被分装并且对分装的每一个样本进行染色,而不用考虑(i)健康人群中的变异和(ii)疾病状态。为了决定每毫升血中的细胞数量,可能需要使用DNA染料,诸如DAPI、DRAQ5®或碘化丙啶。可选择地,未结合的染料可能被洗脱。一个分光光度计可以被用来确定每毫升血中的有核细胞(例如DRAQ5®阳性)数量。

[0114] 等量分装的血液样本中白细胞(WBCs)的数量和浓度可能因研究对象的不同而有所变异。然而,为了正确地分析一份血液样本中的WBCs,可能需要加入足够量的反应剂(例如标的特殊WBC-特异性抗原的抗体),而剂量是否足够取决于一份血液样本中的WBCs数量和浓度。一种称为“动态稀释”的过程可能被使用以保证足够的抗体反应剂被添加至一个样本中。在一个非限制性示范中,用该项操作对血细胞进行处理以获得一个临时性的细胞计数用于确定反应剂的正确剂量(例如一个用于染色白细胞(WBCs))的抗体混合物与该样本一起使用以便提供完整的细胞染色)。在该操作过程中,该细胞被一种DNA染料(例如DAPI、DRAQ5®或碘化丙啶)染色,与用于后续步骤或检验的荧光团-共轭抗体的辐射波长光谱性地区别开来。可选择地,孵育一段时间后,该样本可能被洗涤以去除多余(未结合)的DNA染料。孵育一段时间后,该样本可能被制备成适合的容量,并使用一台分光光度计进行成像或测量。随之产生的数据允许对一个已知容量样本内的WBCs数量进行计数或确定,以便一份指定容量的血液样本可以被分装(产生一个特殊/所需的WBCs数量)并被正确剂量的抗体所染色(例如,根据WBCs的估计数量确定使用的DNA染料,所需的抗体剂量可能被确定以提供理想饱和度的抗体染色)。因此,通过DNA染色提供的估计值允许我们计算并添加分装样本中WBCs数量所需的正确数量的抗体。

[0115] 动态稀释操作规范:

[0116] 在一个实例中,一个动态稀释操作规范涉及获得一份含有白细胞的血液分装样本用以估计含有标的WBCs抗体的反应剂剂量,这对样本分析是必须的。

[0117] 在这个非限制性示范中,一份已知容量的血液样本被取得。一个已知剂量的核染料(例如类似碘化丙啶、DAPI、或Draq5®的一种DNA-着色染料)被添加到这个已知容量的样本中。该混合物在一个25°C到40°C的温度下孵育2到10分钟。

[0118] 下一步,添加一种红细胞(RBC)裂解缓冲液。在这个非限制性示范中,该混合物在一个25°C到40°C的温度下(也可能使用更低的温度)孵育2到10分钟。一种适合的裂解缓冲

液可能是,诸如一种低张生理盐水溶液;一种低张蔗糖溶液;一种等张氯化铵溶液;一种包括类似皂素的温和表面活性物质的等张溶液;或者其他缓冲液,RBCs在这些液体中会出现裂解。在实例中,这种裂解缓冲液包括一种诸如多聚甲醛的固定剂以辅助稳定WBCs。一种诸如皂素的表面活性物质会造成细胞膜内形成大量的孔洞。红细胞由于其独特的膜特性,对这种孔洞形成特别敏感,并完全裂解,内容物漏到周围的液体中。加入固定剂防止白细胞不必要的裂解。血小板也保持未裂解状态。这个步骤的目的是为了从混合液中去除红细胞,因为它们以大约1000:1的比例远远超过白细胞的数量。血小板对成像没有影响,因此在这个处理中不是考虑的因素。在实例中,一种裂解缓冲液还可能含有一个已知浓度的非荧光滚珠;这些滚珠可用作大小和(或)浓度的标记物。RBCs裂解结合该操作规范后面的一些步骤,大致能够去除掉RBCs对成像或WBCs光学测量的任何干扰。

[0119] 接下来对处理过的样本进行分离,其中该分离步骤可能通过任何适合的方法来进行,例如但不限于在离心机内以1200xg的速度对该处理后的样本离心3分钟。

[0120] 分离后(例如离心)去除上清液;剩下的细胞团被再悬浮。在实例中,对该细胞团在部分或全部上清液进行再悬浮。一个含有再悬浮细胞团的已知容量的溶液来自与这一步骤。

[0121] 如果需要,可能实施一个进一步的分离步骤和一个进一步的再悬浮步骤。这些步骤提供了一个带有大约10倍浓缩细胞的浓缩样本(忽略每一步中可能的任何细胞丢失)。

[0122] 然后,测量再悬浮和浓缩后样本内的DNA染色剂剂量。例如,来自一种诸如DRAQ5[®]荧光DNA着色染料的荧光可能在一台分光光度计中被测量。在实例中,该样本可能被一个波长632nm(DRAQ5[®]的激活波长)的光线照射,由该细胞悬液发射的光波可能被一个650nm的长通滤波器滤过,然后该放射光波可能在一台分光光度计内被测量。将这个所测量的放射光波与一个以往生成的校准曲线相对应以估测出该细胞悬液内白细胞的一个大概浓度。通常情况是,细胞浓度在大约1000个细胞/毫升到100000个细胞/毫升范围内。以这种方法估测出的WBCs所含数量可能被用来计算一个正确的稀释因子,在后续定量测量中使用,可以确保样本的细胞浓度被限制在一个预先设定的目标浓度范围内(例如一个两倍或其他范围)。然后根据计算出的稀释因子稀释该样本以提供一个所需浓度范围内WBCs浓度的样本。

[0123] 这个“动态稀释”步骤的目的是为了确保样本中含有的WBCs浓度不会太高或太低。如果细胞浓度过高,图像处理运算的准确性会受到损害;而浓度太低时,样本的细胞数量会不足。此处所示的一个浓缩样本稀释可以提供一个理想范围内的WBCs浓度,并保证分析过程中来自该样本的信号处于探测和分析的一个最佳范围内。

[0124] 此外,以这种方法估计的WBCs数量允许我们计算出所需的反应剂剂量以用于样本的进一步检验和方法步骤;由于一个样本中的WBCs数量可能有变异,用于各种检验的反应剂所需剂量可能有赖于被检验样本中的WBCs数量。例如,通过动态稀释操作规程对WBC数量进行估计后所添加的反应剂包括针对不同类型WBCs特异性抗原的抗体,或者,如果这种抗原在多个WBCs类型中均可发现,这种抗原在不同类型WBCs中表达的数量会有所不同。在对一个样本中的WBCs数量缺乏这种估计的情况下,在样本的后续检验中必须加入预先确定的染料和其他反应剂剂量,这样可导致反应剂剂量不正确,以及检验结果不准确或不完整。因此,在对一份来自病人的血液样本进行全面检测时,所提供的该动态稀释操作规范是一个非常重要和有用的初始步骤,它允许我们对样本进行更为精确和准确的测量。

[0125] 动态染色

[0126] 在一些实例中,一些方法、系统、和设备在此处被提供用于含细胞样本的动态染色。

[0127] 对一个细胞群细胞中的感兴趣成分进行测量

[0128] 在一个实例中,一种对一个细胞样本动态染色的方法与一种对一个细胞群细胞中感兴趣成分进行测量的方法相关。

[0129] 像此处所使用的,一种“感兴趣的成分”指可能在一种细胞中被表达的任何类型的分子。“感兴趣的成分”包括蛋白质、碳水化合物、和核酸。通常情况是,一种“感兴趣的成分”是一种特殊的分子类型,诸如一种特别的抗原。一种细胞的非限制性“感兴趣的成分”包括:CD5蛋白、,CD3蛋白等等。

[0130] 像此处所使用的,一个“细胞群”指基于一种或几种共有特征的任何细胞组群。一个“细胞群”可以有任何程度的涵盖范围,而且可能包括一种大数量的细胞或一种小数量的细胞。“细胞群”的非限制性示范包括:红细胞 (RBCs)、白细胞 (WBCs)、B-细胞、CD34+的B-细胞,等等。

[0131] 在一些情况下,可能需要对来自一个研究对象的一份样本中一个特定细胞群细胞中的感兴趣成分进行定量测量。例如,可能需要测量一个慢性淋巴细胞性白血病患者样本中B-细胞(“细胞群”)的CD5(“感兴趣的成分”)表达程度。对一种感兴趣成分水平的探测和(或)测量可能涉及使用一种对该特殊感兴趣成分具有亲和力的结合体分子,诸如抗体或单链可变片段(“scFv”)。为了用一种涉及使用一种结合体分子的方法准确地测量细胞中一种特殊感兴趣成分的水平,将细胞暴露在一定比例或比例范围的结合体分子下对标的感兴趣成分可能是有优势的。例如,可能需要向一个细胞样本中提供一定剂量的结合体,这样细胞中感兴趣成分的剂量和与细胞中感兴趣成分结合的结合体剂量之间会形成一种线性关系。例如,可能不必要地出现结合体剂量过少(这样就没有足够的结合体与细胞中所有感兴趣成分想结合)或过多(这样结合体会非特异性地与细胞结合)。

[0132] 使用传统的方法可能很难为一个样本提供一个适当的结合体水平以准确地测量该样本中一个细胞群内的感兴趣成分的数量,基于的事实是该细胞群和(或)样本中感兴趣成分的大小在不同样本之间可能会有所不同。相反,此处提供的是用于动态染色细胞样本的一些方法、设备和系统以适应含有一个广泛细胞群和感兴趣成分范围的样本。

[0133] 一个实例中提供了一种测量一个样本中一个细胞群细胞中感兴趣成分的方法。该方法不限于,但可能包括一个或多个以下步骤:

[0134] 首先,该细胞群细胞中表达的一种标记物定量或半定量的测量可能被获得。该标记物可能是在感兴趣细胞群中表达的任何标记物,而且它可能是一种在感兴趣细胞群中独特表达的标记物(例如在样本的其他任何细胞类型中都不表达)。该标记物可能通过任何方法被测量,所提供的方法不会破坏该样本,而且可能使用任何一个系统或设备。一种识别该标记物的结合体可能会与该样本混合。该结合体可能含有一种贴附分子有助于该结合体的检测(例如一个荧光标记物)。在一个示范中,该标记物可能被荧光分光光度计探测和(或)测量。实例中该结合体有一种荧光标识,该标记物通过荧光分光光度计被测量;荧光分光光度计可能被用来测量来自该样本的大量的或部分的荧光信号,而不是测量来自单个细胞的荧光信号。

[0135] 第二,根据该细胞群细胞中所表达的定量或半定量测量结果,该样本中细胞群细胞的一个大概数量和浓度可能被确定。该样本中细胞群细胞的一个大概数量和浓度可能被确定,例如,通过应用一种校准曲线。校准曲线可能被绘制和(或)可能被提供用于不同的标记物/结合体的联合体。校准曲线可能被绘制,例如,通过测量来自已知数量细胞的信号,这种细胞含有一定的标记物并且与一定的结合体结合。一些实例中,该样本中细胞群细胞的一个大概数量和浓度可能在一台电脑的辅助下被确定。在一些方面,该样本中细胞群细胞的一个大概数量和浓度可能被确定,这个确定值不多于真实浓度的10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、400或500%。

[0136] 第三,根据所确定的该样本中细胞群细胞的数量或浓度,添加到该样本中的一种反应剂的一个数量可能被选择,其中该反应剂特异性地与细胞群细胞中的感兴趣成分相结合。该反应剂可能是,或者包括与该感兴趣成分特异性结合的任何分子。例如,该反应剂可能是一个结合体,诸如一种抗体。该反应剂可能被设计成随时可以被探测(例如通过荧光或冷光)和(或)至少在某些情况下,它会产生一种可被探测到的信号。在一些实例中,该反应剂可能贴附于一个分子以辅助该反应剂的探测。添加到该样本中的反应剂剂量可以是任何剂量。在一些实例中,一个反应剂剂量可能被添加到该样本中,这样细胞中感兴趣成分的水平和与细胞中感兴趣成分结合的结合体产生的信号之间会形成一种线性关系。

[0137] 第四,添加到该样本中的一种反应剂的剂量被选择以后,这个被选择剂量的反应剂可能被添加到该样本中。

[0138] 第五,因为反应剂与感兴趣成分结合,该样本中的细胞可能被检验。

[0139] 第六,根据与感兴趣成分结合的反应剂的剂量,该样本细胞群细胞中感兴趣成分的含量可能被确定。

[0140] 在一些实例中,第五步和第六步可能被一起执行,这样对与感兴趣成分结合的反应剂含量的测量足以确认该样本细胞群细胞中感兴趣成分的含量。

[0141] 在其他实例中,此处被提供的是用于样本动态染色的系统和设备。该系统和设备可能包含,但不限于,一台分光光度计和一台荧光显微镜。在一个实例中,用于样本动态染色的一个系统或方法可能被设计如美国专利申请号13/355,458中所描述的一样,这些都以引用的方法纳入其整体说明中。在一个实例中,根据细胞群细胞中所表达的一个标记物含量的测量结果,该系统和设备可能自动地确定添加到一个样本中的一个反应剂含量来确定该样本细胞群细胞中感兴趣成分的含量。在另一个实例中,根据一个样本细胞群细胞中一个第二种成分含量的测量结果,该系统和设备可能自动地确定添加到一个样本中的一个反应剂含量来确定该样本细胞群细胞中一个第一种成分的含量。

[0142] 基于周围环境的自动对焦

[0143] 在一些实例中,一些方法、系统、和设备在此处被提供用于基于周围环境的显微镜自动对焦。

[0144] 生物样本中的许多临床相关物质其大小(例如长度、高度或其他测量)跨越了很大的范围。例如,细菌通常大约 $1\mu\text{m}$ 长,红细胞大约 $6\text{-}8\mu\text{m}$ 长、白细胞大约 $10\text{-}12\mu\text{m}$ 长、上皮细胞可能大约 $100\mu\text{m}$ 长、而管型和晶体可能大约 $200\text{-}300\mu\text{m}$ 长。另外,还有一些无形的元素,诸如尿路粘液通常以线状或丝状存在,可能的长度范围大约 $10\text{-}400\mu\text{m}$ 。

[0145] 显微成像技术的一个挑战是获取视野的精确图像,该视野中包含一个未知且随意

组成的不同尺寸的物体,例如上面描述的那些成分。由于许多显微镜物镜的聚焦深度是有限的(典型的大约为1-10 μm),对于含有不同尺寸元素的给定视野来说,对该视野获取多个聚焦平面可能是必须的,以便获得该视野内不同元素的准确清晰的图像。许多传统自动聚焦方法的一个问题是它们被设计为对一个视野内的主要结构进行聚焦,这样那个结构的图形清晰度可以被最大化。这种方法对拍摄一个样本内不同大小的元素可能是无效的。

[0146] 一个实例中提供了一种用于基于周围环境的显微镜自动对焦方法,其中包括将一个已知大小的参照粒子与用于显微成像的样本混合。在实例中,一个以上的参照粒子被添加到样本中;首选或大体上所有的这种参照粒子具有相同的已知尺寸。在实例中,添加到一个特殊样本容量中的参照粒子数量是已知的。该参照粒子在显微成像过程中可能被探测到,而且被用来达到聚焦的效果。通过使用参照粒子达到聚焦效果时,可能会选择与整体图像构图无关的聚焦平面。一方面,该方法在对含有未知组成元素样本进行聚焦时可能是有用的。另一方面,该方法可能支持生成精确的聚焦平面,而与该显微镜或显微镜相关硬件的精确度无关。例如,当一个聚焦平面根据视野内参照粒子清晰度的反馈情况被选择后,即可能达到对一个样本内不同元素进行精确聚焦的目的,而无论对焦硬件准确度和精确度的水平如何【例如显微镜物镜、样本架的形状(例如一个比色皿或切片)、或一个具有非一致性的样本架】。

[0147] 一个实例中,一个参照粒子可能包含一种分子或被一种分子所标记以辅助显微成像过程中探测该粒子。一个示范中,一个参照粒子可能被一种荧光分子标记,或含有一种荧光分子。该荧光分子可能吸收一个第一波长的光波,然后,作为对吸收第一波长光波的反应,它可能会释放一个第二波长的光波。在一个实例中,一个混合有一种参照粒子的样本可能被暴露在一个波长的光波下,该光波能够激活一个感兴趣参照粒子中的一种荧光分子,而从该荧光分子中释放出的光波可能被测量到。来自一个参照粒子的特定荧光可能被用来探测参照粒子,而从一个样本参照粒子中探测到的信息可能用于自动对焦。

[0148] 参照粒子可以是任何形状,例如球形或立方形。参照粒子包括,但不限于滚珠和微球。参照粒子可以是任意大小,诸如其直径或长度大约为0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、20、30、40、50、60、70、80、90、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450或500 μm 。参照粒子可能由任何合适的材料制成,或含有这种材料,诸如聚苯乙烯、聚乙烯、胶乳、丙烯酸塑料、或玻璃。例如,一种参照粒子可能是一个聚苯乙烯滚珠,例如一个聚苯乙烯滚珠其直径在大约0.1 μm 到50 μm 之间;或者在大约1 μm 到20 μm 之间;或者在大约5 μm 到15 μm 之间;或者其直径在大约10 μm 左右。

[0149] 在一个实例中,一种用来聚焦一台显微镜的方法被提供,它可能包括一个或多个以下步骤。第一,一个样本含有需要进行显微分析的目标(例如细菌、红细胞,等等)可能与一种参照粒子混合。该参照粒子可能含有一种分子或被一种分子所标记以辅助显微成像过程中探测该粒子,例如一种荧光团。第二,含有该参照粒子和样本的混合物可能被置于一台显微镜的光路中,例如在一个比色皿或切片内。可选择地,该参照粒子可能沉积到比色皿或切片内样本的底部,就是说该参照粒子落在与该样本接触的比色皿或切片的最下层表面。该显微镜可以是任何类型,包括一种荧光显微镜。第三,该混合物可能被暴露在一种设计用来使该参照粒子被看见的光波之下。该光束可能是任何类型,而且可能来自相对于该参照粒子的任何一个方向。例如,该光束可能位于一个波长下,它可以激活一种位于该参照粒子

内或贴附其上的荧光团。将该参照粒子暴露在该光波下可能导致,例如,生成和释放来自该参照粒子的一种特殊波长下的光波,和(或)来自该参照粒子的散射光波。第四,来自该参照粒子的放射光波或散射光波可能被该显微镜探测到,而且该信息可能被使用以确定该混合物内参照粒子的位置和(或)被用来对该显微镜聚焦。可选择地,该显微镜可能被对焦到一个聚焦平面,该平面适合于与该参照粒子大小相同的物体。来自该显微镜的一副图像可能通过一个图像传感器被获得。该图像可能被保存并被用于图像分析。

[0150] 一些实例中,多种参照粒子可能被添加到一个样本中。该参照粒子可能是同一个尺寸,或者可能是不同的尺寸。一些实例中,不同尺寸的参照粒子含有不同的荧光团。不同的荧光团可能含有不同的吸收波长、不同的放射波长、或者二者均有。

[0151] 在一个实例中,一种用来对焦一台显微镜的方法被提供,包括将一种以上已知大小的参照粒子与一个用于显微分析的样本相混合,其中至少两种参照粒子拥有不同尺寸并含有不同荧光团。该方法可能包括以下一个或多个步骤:第一,可能将含有用于显微分析目标的一个样本与两个以上参照粒子相混合,其中至少两种参照粒子拥有不同尺寸并含有不同荧光团(例如“第一参照粒子”和“第二参照粒子”)。第二,含有该参照粒子和样本的混合物可能被置于一台显微镜的光路中。该显微镜可以是任何类型,包括一种荧光显微镜。第三,该混合物可能被暴露在一种设计用来使第一参照粒子被看见的光波之下。该光束可能是任何类型,而且可能来自相对于第一参照粒子的任何一个方向。例如,该光束可能位于一个波长下,它可以激活一种位于第一参照粒子内或贴附其上的荧光团。将第一参照粒子暴露在该光束下可能造成生成、释放、或散射来自第一参照粒子的一种特殊波长下的光波。第四,来自第一参照粒子的放射光波或散射光波可能被探测到,而且该信息可能被使用以确定该混合物内第一参照粒子的位置和(或)被用来将该显微镜对焦至第一个平面应用于与第一参照粒子大小相似的物体。可选择地,来自第一聚焦平面的一副图像可能通过一个图像传感器被获得。该图像可能被保存并被用于图像分析。第五,该混合物可能被暴露在一种设计用来使第二参照粒子被看见的光波之下。该光束可能是任何类型,而且可能来自相对于第二参照粒子的任何一个方向。将第二参照粒子暴露在该光束下可能造成生成、释放、或散射来自第二参照粒子的一种特殊波长下的光波。第六,来自第二参照粒子的放射光波或散射光波可能被探测到,而且该信息可能被使用以确定该混合物内第二参照粒子的位置和(或)被用来将该显微镜对焦至第二个平面应用于与第二参照粒子大小相似的物体。可选择地,来自第二聚焦平面的一副图像可能通过一个图像传感器被获得。该图像可能被保存并被用于图像分析。

[0152] 在其他实例中,此处被提供的是一些系统和设备用于基于周围环境的显微镜自动对焦。该系统和设备可能包含,但不限于,一台荧光显微镜。在一个实例中,该系统和设备可能自动地将一种已知尺寸大小的参照粒子添加到一个用于显微分析的样本中形成一种混合物;将混合物放置在一台显微镜的光路上;将混合物暴露在一个光束下使该参照粒子变得可见;确定混合物中该参照粒子的位置,并根据混合物中该参照粒子的位置对焦显微镜。在一个实例中,用于基于周围环境的显微镜自动对焦的一个系统或方法可能被设计如美国专利申请号13/355,458中所描述的一样,这些都以引用的方法纳入完全纳入本说明中。

[0153] 定位一个样本架

[0154] 在一些实例中,一些方法、系统、和设备在此处被提供用于确定一个样本架、一个

样本架的一部分或其上指示标志的位置。这样一种确定首选是一种精准确定,对辨认位于一个视野中样本架内的细胞、粒子或其他物质很有用处,即使一个样本架已经被移动或者一个视野已经被改变以后(例如,通过改变焦距,或通过检视一个样本架内的不同区域)。

[0155] 在实例中,基于反馈机制的一副图像可能被用来准确而精确地确定一个比色皿中的特定位置,例如在一个管道或其他含有样本的区域(参见图7和8显示的一个分析区域608)。特别是在该样本架被移动后又回复到原来的位置时,这种确定对比较这种移动前后所进行的图像和光学测量是非常重要的。源自不同来源的变异性可能会影响样本相对于成像系统枢轴的位置;例如比色皿零件的变异性、比色皿组合的变异性、比色皿在成像系统中位置的变异性、以及其他可能的变异性来源都可能影响一个样本相对于该成像系统的位置,即使是该样本在样本架内始终保持在同一个位置。用于辨别和描述一个样本架相对于一个成像系统位置的方法在此处被显示。例如,为了准确地和可重复性地对一个比色皿内的感兴趣区域进行成像,一个比色皿注册程序可能被运行。在实例中,这样一个程序从对一个样本架中预先限定位置处获得的一副图像进行分析开始,该预先限定的位置与一个注册结构或该视野内的基准标识非常接近,或者是可以被该程序探测到的位置。一个比色皿注册程序含有一个图像处理程序,其中图像处理程序用于查询图像中基准标识的存在情况,并回复一个“是/否”答案(根据该基准标识是否在特定区域内被找到)或者该标识出现在图像内的可能性。在示范中,该基准标识在该被查询的区域内没有被找到,之后使用一种查询法则,即将查询区域移动到一个不同的位置,或者在该样本架内重新成像。该操作被重复执行直到程序发现该基准标识(例如对在查询范围内是否发现该基准标识的问题得到一个“是”的答案,或者该标识在那个区域的可能性最大)。一旦该基准标识位置被确定,位于该样本架内或样本架上的所有其他位置都可以被确定,因为该样本架的尺寸和布局是已知的。这样,在基准标识位置被确定后,用于成像的任何感兴趣点都可以被找到并对其进行成像,因为这些感兴趣点的位置也是已知的(例如其与基准标识之间的距离和方位是已知的,而且,由于该基准标识的位置是已知的,所以该感兴趣点的位置也是已知的)。在实例中,一个基准标识可以是,或包括一个位于该比色皿上的特定设计的结构(例如,可能是一个孔洞、一个突起、一个被压印或铸型的模式、或者其他结构),这些结构可以被塑造在与每一个部分都有任意一个所需公差的同一个位置内。在实例中,一个基准标识可以是,或包括一个比色皿的结构(例如一个管道的边缘),它与该感兴趣点总是存在在一个固定的距离(例如,将该基准标识设置在管道边缘上,该基准标识与该管道中轴的距离总是固定的)。

[0156] 细胞计数/计数细胞

[0157] 在一些实例中,一些方法、系统、和设备在此处被提供用于计数一个样本内的细胞。

[0158] 染色含细胞样本的特定传统方法涉及对一个特定容量的样本(例如血液)进行染色,该样本中含有一定浓度或数量的染色剂。这可能参考“容量性染色”。容量性染色有许多缺点,包括:(i)它不能阐明不同研究对象之间细胞亚群的正常变异(不同的健康受试者细胞亚群之间可能会有变化很大的不同的数量,诸如CD3+T细胞(CD3+表明T细胞表达CD3标记物));(ii)与正常样本相比,它不能阐明病理性样本可能含有非常不一样的细胞组成(例如,血液样本中CD3+T细胞的百分比和数量在T细胞白血病患者较正常受试者显著升高)。

[0159] 为了对含细胞样本进行准确的和可重复的染色,可能需要向一个指定数量或浓度

的细胞内添加一个指定数量的细胞染色剂(例如DNA染料、抗体、结合体等等)。例如,可能需要向一个样本内每1000个白细胞中添加0.2微克针对白细胞的特殊染色剂。将染料与细胞孵育一段时间以后,该样本可能被洗涤以除去多余(未结合)染料,制备成一种适当的细胞密度并进行成像。在这种方法中,对于一个特殊的细胞数目,一种染色剂和染色过程可以被优化或标准化。

[0160] 在一个实例中,一种方法被提供用于计数一个样本内感兴趣细胞的数量。该方法可能包括以下一个或多个步骤或元素:与一个样本内感兴趣细胞相结合的一种第一染色剂可能被添加至该样本中。该第一染色剂和样本的混合物可能被孵育。第一染色剂和样本混合物中的该种细胞可能被洗涤以除去多余(未结合)的染色剂。这种被第一染色剂染色的细胞可能被制备成一个所需容量以备进一步的分析。这种被第一染色剂染色的洗涤细胞可能通过一台分光光度计进行分析。源自该分光光度计的数据可能被用来计数该样本内细胞的大概数量。例如,该第一染色剂可能是与细胞核相结合的一种荧光染料,而该分光光度计可能包括一个发射该荧光染料激活波长光线的光源和一个可以探测该荧光染料放射波长光线的光传感器。在该示范中,根据该染料的荧光信号,该样本内的核酸大致数量可能被计算出来;而从该样本内的核酸大致数量可以确定出该样本内细胞的大致数量。根据该样本内细胞的大致数量,一种与该样本内感兴趣细胞向结合的第二染色剂可能被添加至该样本中。在实例中,这种添加至该样本中的第二染色剂的剂量可能通过第一染色剂确定的细胞大致数量而被确定。在实例中,这种添加至该样本中的第二染色剂的剂量可能通过使用第一染色剂确定的细胞数量被计算出来,以获得一个第二染色剂与每个细胞的理想比例。该第二染色剂和样本的混合物可能被孵育。第二染色剂和样本混合物中的该种细胞可能被洗涤以除去多余(未结合)的染色剂。这种被第二染色剂染色的细胞可能被制备为一个所需容量以备进一步的分析。这种被第二染色剂染色的洗涤细胞可能通过一台显微镜进行分析。

[0161] 确定细胞倍体数之前计数一个样本内的细胞数量

[0162] 一个实例中,一种用于在确定细胞倍体数之前计数一个样本内的细胞数量的方法被提供,其中该方法包括以下一个或多个步骤或元素。与该样本内感兴趣细胞相结合的,且光谱特性不同于一种DNA染料放射波的一种第一染色剂可能被添加至该样本中。该感兴趣细胞可能是诸如白细胞。该第一染色剂可能是诸如一种荧光团共轭抗体。该荧光团共轭抗体可能与诸如一个广泛表达的抗原(例如CD45)相结合,或者可能与一种细胞特定亚群表达的一种抗原(例如T细胞的CD3)相结合。该第一染色剂和样本的混合物可能被孵育。第一染色剂和样本混合物中的该种细胞可能被洗涤以除去多余(未结合)的染色剂。这种被第一染色剂染色的细胞可能被制备为一个所需容量以被进一步的分析。这种被第一染色剂染色的洗涤细胞可能通过一台分光光度计进行分析。源自该分光光度计的数据可能被用来计数该样本内细胞的大概数量。根据该样本内细胞的大致数量,一种与一个样本内感兴趣细胞向结合的第二染色剂可能被添加至该样本中。该第二染色剂可能是一种DNA染料,诸如碘化丙啶或4',6二脒基-2-苯吲哚盐酸(“DAPI”)。在实例中,这种添加至该样本中的第二染色剂的剂量可能通过第一染色剂确定的细胞大致数量而被确定。在实例中,这种添加至该样本中的第二染色剂的剂量可能通过使用第一染色剂确定的细胞数量被计算出来,以获得一个第二染色剂与每个细胞的理想比例。该第二染色剂和样本的混合物可能被孵育。第二染色剂和样本混合物中的该种细胞可能被洗涤以除去多余(未结合)的染色剂。这种被第二染色剂

染色的细胞可能被制备为一个所需容量以被进一步的分析。这种被一种第二染色剂染色的洗涤细胞可能通过一台显微镜进行倍体数分析。

[0163] 在确定细胞倍体数的方法中,为了生成有关细胞倍体数的准确和一致的数据,将一种给定数量的用于倍体数分析的细胞与一定数量或浓度的DNA染色剂相结合可能是非常重要的。在一个示范中,一个健康人群中其每毫升血液中的白细胞数量可能会发生变化,因此在试图染色白细胞进行倍体数分析之前可能需要确定一定血液容量内的白细胞数量。

[0164] 上面所提供的用于细胞倍体数分析的方法也可能被用来作为任何需要在确定一种细胞的核酸含量相关特性之前计数样本内细胞数量的方法。例如,所述方法可能与确定细胞核的形态学、细胞核大小、细胞核面积与整个细胞面积的比值等等之前计数一份样本内细胞的方法一起使用。

[0165] 细胞表面染色之前计数一份样本内的细胞

[0166] 一个实例中,一种用于在细胞表面染色之前计数一个样本内细胞数量的方法被提供,其中该方法包括以下一个或多个步骤或元素。与该样本内感兴趣细胞向结合的,且光谱特性不同于一种用来染色该细胞表面的染料放射波的一种第一染色剂可能被添加至该样本中。该感兴趣细胞可能是诸如白细胞。这种第一染色剂可能是诸如一种DNA染料(例如碘化丙啶、DRAQ5®或DAPI)。该第一染色剂和样本的混合物可能被孵育。第一染色剂和样本混合物中的该种细胞可能被洗涤以除去多余(未结合)的染色剂。这种被第一染色剂染色的细胞可能被制备为一个所需容量以被进一步的分析。这种被第一染色剂染色的洗涤细胞可能通过一台分光光度计进行分析。源自该分光光度计的数据可能被用来计数该样本内细胞的大概数量。根据该样本内细胞的大致数量,一种与一个样本内感兴趣细胞向结合的第二染色剂可能被添加至该样本中。在实例中,这种添加至该样本中的第二染色剂的剂量可能通过第一染色剂确定的细胞大致数量而被确定。在实例中,这种添加至该样本中的第二染色剂的剂量可能通过使用第一染色剂确定的细胞数量被计算出来,以获得一个第二染色剂与每个细胞的理想比例。该第二染色剂可能是,诸如,一种荧光团共轭抗体。一种荧光团共轭抗体可能与,诸如,一个广泛表达的抗原(例如CD45)相结合,或者可能与一种细胞特定亚群表达的一种抗原(例如T细胞的CD3)相结合。该第二染色剂和样本的混合物可能被孵育。第二染色剂和样本混合物中的该种细胞可能被洗涤以除去多余(未结合)的染色剂。这种被第二染色剂染色的细胞可能被制备为一个所需容量以被进一步的分析。这种被一种第二染色剂染色的洗涤细胞可能通过一台显微镜进行一种细胞表面抗原的分析。

[0167] 在细胞表面抗原染色的方法中,为了生成有关该细胞表面抗原含量准确和一致的数据,将一种给定数量的用于分析的细胞与一定数量或浓度的细胞表面抗原染色剂相结合可能是非常重要的。在一个示范中,一个健康人群中其每毫升血液中的白细胞数量可能会发生变化(来自健康受试者的血液中每μL典型的WBC含量为3000-10000),因此在试图染色白细胞用于细胞表面抗原分析之前可能需要确定一定血液容量内的白细胞数量。在另一个示范中,健康受试者和患病个体之间每毫升血液中的白细胞数量可能发生变化(例如,淋巴瘤患者每μL血液中的WBC含量可能会达到100,000个),因此在试图染色白细胞用于细胞表面抗原分析之前可能需要确定一定血液容量内的白细胞数量。

[0168] 因此,作为一个理论上的示范,一个健康受试者每微升血液中可能含有5000个细胞,其中500个为CD3+的T细胞;而一个淋巴瘤患者每微升血液中可能含有50000个细胞,其

中45,000个为CD3+的T细胞。如果常规对100微升血液进行染色,那么一份来自健康受试者的样本将染色大约500,000个细胞,其中大约50,000个细胞为CD3+的T细胞。一份来自淋巴瘤患者的100微升血液中包含大约5,000,000个细胞,其中大约4,500,000个细胞为CD3+的T细胞。在这个理论性的示范中,该病理性样本含有的细胞总量十倍于来自一个健康受试者的样本,CD3+的T细胞数量九十倍于一个健康受试者的样本。如果该病理性样本使用常规的源自健康受试者的最佳“容量染色”方法进行染色,来自该淋巴瘤患者的样本可能会染色不充分。鉴于这个原因,举个示范,目前的方法优于传统的容量性染色方法,其中预先估计的一份样本内的细胞数量被用来调整应用于该样本中的染料数量。

[0169] 鉴于此,为了生成有关样本的准确且/或一致的数据,此处提供的方法可能被用来在细胞染色之前计数一份样本内的细胞数量。

[0170] 加速方法

[0171] 这里所提供的一些方法、系统和设备可能支持样本分析结果的快速获取。此处提供的方法从方法开始到提供分析结果的时间可能少于诸如6个小时、4个小时、3个小时、2个小时、1个小时、45分钟、30分钟、15分钟、10分钟或者5分钟。

[0172] 快速分析的结果可能被用来提供与一位患者的治疗、诊断或监测相关的实时信息。例如,快速分析的结果可能被用来指导对一位患者进行手术的外科医生的一个处理决定。手术中间,一位外科医生可能从一位患者身上获取一份生物学标本进行分析。通过此处提供的一种方法,收到该样本的快速分析后,一位外科医生可能能够在手术过程中做出一项处理决定。

[0173] 另一个示范中,由此处提供的方法、系统和设备提供的快速的分析结果可能支持一位患者收到有关该患者在同一个定点服务处、同一次看病过程中提供的一份生物学样本的信息。

[0174] 例如,应用此处所描述的一种快速检测,它可能被用来准备一份全血样本用于白细胞中多种标记物表达和细胞类型的分析。这样一种检测对准备全血样本用于成像分析也是非常有用的;用于成像的样本准备不超过20分钟,或者不超过15分钟。

[0175] 从全血样本中快速地进行白细胞检测

[0176] 这种检测准备全血样本用于白细胞的细胞分析,时间不超过15分钟,或者不超过20分钟。对这种准备完毕的细胞进行自动细胞分析可能会很快完成,因此对全血的WBC细胞分析可以在大约半个小时或更短时间内完成。而且,这种检测只使用小容量血液样本,与需要大容量血液样本的检测方法相比,其样本来源不受干扰,而且对患者来说较少不方便和不舒服。

[0177] 在这项检测中使用的反应试剂包括:磷酸缓冲生理盐水、裂解固定缓冲液、滚珠、再悬浮缓冲液和含有染料及染料共轭抗体的反应剂混合物。该抗体直接指向WBC特定标记物。

[0178] 磷酸缓冲生理盐水 (PBS) :137mM NaCl, 3mM KC1, 8mM, Na2HP04, 1.5mM KH2P04, pH 调整至pH7.2—pH 7.4 (用HCl)。

[0179] 再悬浮缓冲液 (RSB) :含有5% 小牛血清蛋白的PBS。

[0180] 裂解固定缓冲液:含有0.0266% 皂素和10% 多聚甲醛 (PFA) 的PBS,其中“%”指示为克/100mL (最终比例大约为13:1 皂素PBS:PFA)。

[0181] 反应试剂混合物1: DRAQ5[®]、与Pacific BlueTM染料共轭的抗-CD14抗体、Fc封闭抗体(例如,一种免疫球蛋白,诸如小鼠IgG)、含0.2%BSA的PBS。

[0182] 反应试剂混合物2:与PE染料共轭的抗-CD16抗体、与AlexaFluor[®] 647染料共轭的抗-CD45抗体、与PECy5染料共轭的抗-CD123抗体、Fc封闭抗体(例如,一种免疫球蛋白)、含15%BSA的PBS。

[0183] 检测步骤包括:

[0184] 从一位受试者处获得全血。

[0185] 将50 μ L全血置于试管内。如果需要,该全血样本可能直接由一个试管采集。如从该受试者处采集的全血总容量为50 μ L,那么将全部样本添加或收集到一个试管中;如从一个受试者处收集的样本大于50 μ L,则将该样本以50 μ L分装。

[0186] 将该样本在1200xg下离心3分钟。

[0187] 从试管中去除20 μ L血浆。

[0188] 将试管置于加热板上(升温至37°C),向其中添加20 μ LRSB,充分混合。

[0189] 加入混合物1(大约5 μ L)。(在实例中,混合物1可能被直接加入全血中,而且前面的离心、去除血浆以及RSB在悬浮步骤可能被省略。)

[0190] 将该样本在37°C下孵育2分钟。

[0191] 加入裂解固定缓冲液(裂解固定缓冲液与被染色血液的比例为6:1;大约300-350 μ L)。一个已知浓度的滚珠可能包含在裂解固定缓冲液中,以提供对焦目标(参照粒子),并为样本浓度提供一个校准(例如,在前面“基于周围环境的自动对焦”部分所描述的)。直径大约在1微米到30微米之间的聚苯乙烯或其他滚珠可能被使用。例如,浓度在每微升100—2000个滚珠的10微米聚苯乙烯滚珠可能被使用。

[0192] 在37°C下将该裂解固定缓冲液孵育3分钟;加入缓冲液约1.5分钟后,用移液管将该溶液上下混合五次。

[0193] 将该样本混合物在1200xg下离心3分钟。

[0194] 移除上清液(大约350 μ L)。如果需要,保存上清液,以便在后面步骤中调整容量。

[0195] 加入混合液2(大约15 μ L)以提供最终的混合物。

[0196] 将该最终混合物加至一个预热的成像比色皿内(37°C)。

[0197] 成像前将该比色皿在37°C下孵育5分钟。

[0198] 对样本进行成像。

[0199] 这样,该样本在不到15分钟内即可进行成像。在实例中,一些步骤可能被缩短(例如,在另一个实例中,一个离心步骤或一个孵育步骤可能被缩短)。由于上面提供的方法使用含有多种染料的混合液准备样本,对该样本几种细胞类型标记物表达的分析可能在一个单一的视野内进行,用最小的复制尽力提供足够的样本图像。这些同一个视野的光散射图像还提供了另一个分析,它可能在不需要获得不同样本或不同视野的情况下被有效地用于该样本的几种图像模式的分析。含有一个已知大小的参照粒子可以通过使用自动对焦进一步帮助成像;而且,因为参照粒子的浓度是已知的,它可以对每一幅图像的样本稀释和细胞浓度进行独立的测量。

[0200] 对准备好的样本进行成像也可能是非常迅速的,例如,通过具备此处所述结构的自动设备进行这种成像可能在大约10分钟内完成(通常情况是2—12分钟),例如,在美国专

利申请13/244,美国专利申请94713/769,779及其相关应用中所描述的设备。这样,实例中的整个分析过程,包括血液样本的准备以及对准备好的样本进行成像,可能在大约30分钟或更短时间内完成。

[0201] 根据上面讨论的方法(以及下面讨论的类似方法),对准备完毕的样本进行成像和图像分析适合于对全血WBC中的不同细胞群进行识别。通过不同波长光线照明样本,对同一个样本的这种识别和定量分析被迅速完成,并对成像结果和光线强度进行记录和分析。这种方法适合于提供图像和图形,例如,如图9,10和11所示,都是使用此处显示的方法进行准备(例如,上文及下文讨论的方法)。图12中所显示的比较说明这些方法是准确和可靠的,并与其它方法有着很好的一致性(例如,通过Abbott CELL-DYN Ruby系统进行的分析(Abbott Diagnostics, Lake Forest, 伊利诺伊州, 美国)),用于比较的对照分析仪显示在图12中。

[0202] 病理学样本的分析

[0203] 此处提供的任何方法都可能被用来对含有细胞的病理学样本进行分析。如果一个病理学标本是一种组织样本,该样本可能被处理,以便将组织中的细胞分离成单个细胞,然后通过此处所提供的方法进行分析。

[0204] 通过此处所提供的任何方法进行的病理样本分析都可能支持快速的病理分析,而且这种整合的快速病理分析会最终形成一个对患者的处理决定。

[0205] 对分析结果做出反应的附加操作

[0206] 在一些实例中,此处提供的这些设备和系统可能被设计触发一个附加操作作为对通过此处提供的一个分析方法所获得的一个结果所做出的反应。

[0207] 在一个示范中,一个设备或系统可能被程序化,当一个结果超出一个预计范围时可为使用者提供一种警告。这种警告可能提示一位使用者或医疗人员实施诸如对样本进行人为分析、检查该设备或系统以确保正确运行等等操作。

[0208] 在另一个示范中,一个设备或系统可能被程序化,当一个结果超出一个预计范围时自动对一个样本运行一个或多个附加检测。在一些实例中,此处提供的设备和系统能够执行多个不同的检测;而且这些设备或系统可能运行一种额外的检测以对此处提供的一种方法所生成的一个结果进行确认或进一步研究。

[0209] 使用非特异性染料进行的分析

[0210] 一种加速成像的非限制性示范是使用一种“强调标记”形式,此时细胞被浓度非常高的染料所标记。在目前的实例中,使用的是非特异性染料,可用来标记DNA、细胞膜、或细胞的其他部分。这个示范没有使用针对特异性或少见蛋白质或其他标记物的抗体染料。

[0211] 使用非特异性染料后,可能不需要一个分离步骤(例如离心分离或进行物理性分离)即可获得细胞信息。没有这种分离步骤,我们可以更快速地直接进入样本成像,例如但不限于对细胞的一个很大面积进行成像,包括a) 非目标细胞,诸如红细胞(RBCs),以及b) 目标细胞或感兴趣标的物,例如白细胞(WBCs)。因此,在对一份血液样本成像的非限制性示范中,一次可以成像五百万个RBCs和五千或其他数量的WBCs。该目标细胞还可以根据细胞内成分进行分类,例如但不限于根据一种细胞的细胞核形状分类。在一个实例中,一种细胞核染色剂被用来对一个样本内的细胞核进行染色,并且根据一种特殊细胞所含有的染色种类和数量(例如,细胞核染色的表达、或者一个被染色的细胞核的形状、或者其他特性),我们可以根据染色来确定其细胞类型,尽管该染料是非特异性的。在另一个示范中,细胞内的其

他内部形态(例如细胞浆是否有颗粒或其他物质等)可以是指示性的或特征性的,并被用来对一个样本内的细胞进行确定和定量。对于一份尿液样本,该样本内的任何表达的细胞核和结晶形状都可以被用来确认该样本并决定是否有异常发现。这样,非特异性染料的应用可以被用来对细胞进行快速成像,且需要时,在一定程度上可以用来确定细胞。

[0212] 使用多个激活和(或)探测波道进行分析

[0213] 在使用甚至更小的样本容量进行细胞分析时,更高级的细胞检测实例中,一个额外的激活和(或)探测波长可能被使用。例如,对于WBCs分类,在对一个淋巴细胞亚型进行检测时,不同的细胞,诸如T细胞、B细胞、K细胞和其他细胞均被计数。在这种情况下,我们使用两种标记物仅仅是用于确认该细胞是一种淋巴细胞。为了对一份血液样本细胞进行进一步的亚型分类,例如,我们可以再一次使用两种标记物。这样,如果我们的系统只能在同一时间内探测到两种颜色,那么用于分析的波长数量是不够的。

[0214] 在一个实例中,我们可以将样本分装为两个部分,然后使用该样本的不同分装部分在系统的一个部分进行一个组合的成像,而在另一个部分进行另一个组合的成像。遗憾的是,这可以造成时间和样本所需容量的成倍增加。一个系统中置入的独立波道越多,使用的样本部分和容量数量就越少。

[0215] 示范

[0216] 细胞处理

[0217] 在实例中,处理生物学样本用于成像、检测和分析通常是非常有用的。例如,处理含有细胞的生物学样本用于成像、检测和分析通常是非常有用的。

[0218] 一份生物学样本的处理可能包括预处理(例如为一种后续处理或测量所进行的一份样本的准备)、处理(例如改变一份样本,以便与其原始状态或以前的状态有所不同)和后处理(例如测量或使用完毕后清理所有样本或一部分样本)。一份生物学样本可以被分为几个部分,例如一份血液或尿液样本的分装、或诸如将一份组织样本切片、切碎或切开为两个或多个部分。一份生物学样本的处理,诸如血液样本,可能包括混合、搅拌、声波降解、均化、或一份样本或样本部分的其他处理。一份生物学样本的处理,诸如血液样本,可能包括一份样本或样本部分的离心处理。一份生物学样本的处理,诸如血液样本,可能包括提供时间以对该样本中的成分进行分离或沉淀,而且可能包括过滤(例如使该样本或样本的一部分流经一个过滤器)。一份生物学样本的处理,诸如血液样本,可能包括允许或造成一份血液样本的凝集。一份生物学样本的处理,诸如血液样本,可能包括对该样本或样本一部分进行浓缩(通过对一份血液样本或一种含有来自一个组织样本的组织均化溶液的沉淀或离心)提供一种沉淀物和一份上清液。一份生物学样本的处理,诸如血液样本,可能包括对该样本的一部分进行稀释处理。可能是对一份样本或样本的一部分进行稀释,包括对来自样本的一种沉淀物或一份上清液的稀释。一份生物学样本可能被水或被一种生理盐水,诸如一种缓冲盐水溶液,进行稀释。一份生物学样本可能被一种溶液稀释,其中可能包括,也可能不包括一种固定剂(例如甲醛、多聚甲醛、或与蛋白质交联的其他试剂)。一份生物学样本可能被一种溶液稀释,有效地在周围溶液和细胞内部或内侧部分产生一个渗透梯度,有效地改变了细胞容量。例如,如果稀释后最终的溶液浓度低于细胞内部或内侧部分的有效浓度时,这种细胞的容量将增加(例如细胞将出现水肿)。一种生物学样本可能被一种溶液所稀释,该溶液可以含有也可以不含有渗透剂(诸如,葡萄糖、蔗糖或其他糖类;钠、钾、铵、或其他盐

类;或其他有渗透活性的成分或组成)。在实例中,一种渗透剂可能通过诸如稳定或减少周围溶液和这种细胞内部或内侧部分之间可能的渗透梯度,有效地维持该样本内细胞的完整性。在实例中,一种渗透剂可能有效地提供或增加周围溶液和这种细胞内部或内侧部分之间的渗透梯度,有效地使该细胞至少部分地塌陷(这部分细胞内部或内侧部分较周围溶液浓度低);或者有效地使细胞水肿(这部分细胞内部或内侧部分较周围溶液更浓缩)。

[0219] 一种生物样本可能与一种含有表面活性剂的溶液相接触,这样可能破坏该样本内的细胞膜,或对细胞形态产生其他效应。例如,将RBCs与一种低浓度的表面活性剂相接触会导致RBCs失去其盘状形态而呈现出一种更类似于球形的形态。

[0220] 一种生物样本可能被染色;或者几种标记物可能被添加至该样本中;或者该样本可能被准备以便对该样本、样本的一部分、样本中的一种成分、或样本内的一部分细胞或结构进行探测、观察或定量分析。例如,一种生物样本可能与一种含有一种染料的溶液相接触。该染料可能对一种细胞、或细胞的一部分、或一种样本内与一类细胞相关的物质或分子进行染色或使其变得可见。一种染料可能与一个样本中的一种元素、化合物、或其他成分相结合或被这些物质所改变;例如一种染料可能会改变颜色,或者改变其诸多特性之一,包括其光学特性,以对其所处溶液pH改变或差异做出反应;一种染料可能会改变颜色,或者改变其诸多特性之一,包括其光学特性,以对其所处溶液中一种元素或化合物(例如钠、钙、CO₂、葡萄糖、或其他离子、元素或化合物)浓度的改变或差异做出反应。例如,一种生物样本可能与一种含有一种抗体或抗体片段的溶液相接触。例如,一种生物样本可能与一种含有粒子的溶液相接触。加入到一种生物样本中的粒子可能作为标准来使用(例如,可能作为尺寸标准,其粒径或粒径分布是已知的;或者作为浓度标准,其数量、容量或浓度是已知的);或者可能作为标记物来使用(例如,可以结合或粘附于特殊细胞或细胞类型、特殊的细胞标记物或细胞成分、或者与一份样本中的所有细胞相结合)。

[0221] 细胞计数包括对细胞进行观察和测量,例如红细胞、血小板、白细胞,包括对细胞数量、细胞类型、细胞表面标记物、细胞内标记物、和感兴趣细胞的其他特征进行定性和定量的观察与测量。当一份生物学样本包含或本身就是一份血液样本时,该样本可能会被分为几个部分,并可能被稀释(例如,为了提供较大的容量以方便处理;为了改变该样本内细胞成分的密度或浓度以提供一个理想的稀释密度、浓度、或细胞数量或其范围,等等)。该样本可能被影响凝集功能的试剂所处理;或者被处理以使样本成分浓缩或沉淀(例如,乙二胺四乙酸(EDTA)或将抗凝肝素加入到样本中;或者该样本可能被离心或允许细胞沉淀)。一个样本或样本的一部分可能被处理添加染料或其他反应试剂,以使其可能与特殊的细胞或细胞成分发生反应并对之进行标记。例如,标记细胞核的染料(如苏木精染料、花青染料、诸如Draq5[®]的Draq染料以及其他染料);标记细胞浆的染料(如伊红染料、还包括荧光染料和其他染料)可能被分别使用或一起使用来辅助细胞的观察、确认和定量分析。一些特定的标记物也可以用于细胞计数中,包括针对细胞标的物,诸如细胞表面蛋白、细胞内蛋白和成分、以及其他标的物的特定抗体和抗体片段。

[0222] 生物样本可能通过细胞计数仪使用光学方法进行测量和分析,包括例如,光电二极管探测器、光电子增倍管、电荷耦合设备、激光二极管、分光光度计、照相机、显微镜或其他设备,它们能够测量光线强度(一种单一波长、多个波长、或一个范围内、或几个范围内的波长)、形成图像,或二者兼有。包括一个样本或样本一部分的一个视野可能使用这种探测

器被成像、或被扫描、或者兼有。一份生物样本可能在进行处理、稀释、分离、离心、凝集或其他改变之前被细胞计数仪测量和分析。一份生物样本可能在进行处理、稀释、分离、离心、凝集或其他改变之间或之后被流式细胞仪测量和分析。例如，一份生物样本可能在被接收后直接由流式细胞仪进行测量和分析。另一个示范是，一份生物样本可能在进行处理、稀释、分离、离心、凝集或其他改变之间或之后由细胞计数仪进行测量和分析。

[0223] 例如，一份血液样本或其中的一部分可能为了进行细胞计数分析而进行沉淀或离心准备。这种样本的沉淀或沉积部分可能在进行细胞计数分析之前被一种选择的缓冲液再悬浮(例如通过吸取、搅拌、声波处理，或其他处理方法)。一份生物学样本可能被水或被一种生理盐水，诸如一种缓冲盐水溶液，在细胞计数分析前进行稀释或再悬浮。用于这种稀释或再悬浮的一种溶液可能包括，也可能不包括一种固定剂(例如甲醛、多聚甲醛、或与蛋白质交联的其他试剂)。用于这种稀释或再悬浮的一种溶液可能在周围溶液和样本细胞内部或内侧部分提供一个渗透梯度，使样本中的一些细胞或全部细胞的细胞容量发生改变。例如，如果稀释后最终的溶液浓度低于细胞内部或内侧部分的有效浓度时，这种细胞的容量将增加(例如细胞将出现水肿)。一种生物学样本可能被一种溶液所稀释，该溶液可以含有也可以不含有渗透剂(诸如，葡萄糖、蔗糖或其他糖类；钠、钾、铵、或其他盐类；或其他有渗透活性的成分或组成)。在实例中，一种渗透剂可能通过，例如，稳定或减少周围溶液和这种细胞内部或内侧部分之间可能的渗透梯度有效地维持该样本内细胞的完整。在实例中，一种渗透剂可能有效地提供或增加周围溶液和这种细胞内部或内侧部分之间的渗透梯度，有效地使该细胞至少部分地塌陷(这部分细胞内部或内侧部分较周围溶液浓度低)；或者有效地使细胞水肿(这部分细胞内部或内侧部分较周围溶液更浓缩)。

[0224] 例如，一份生物样本可能在其一部分被含有染料的溶液稀释之后被测量或分析。例如，一份生物样本可能在其一部分被含有抗体或抗体片段的溶液稀释之后被测量或分析。例如，一份生物样本可能在其一部分被含有粒子的溶液稀释之后被测量或分析。加入到一种生物样本中的粒子可能作为一种标准来使用(例如，可能作为尺寸标准，其粒径或粒径分布是已知的；或者作为浓度标准，其数量、容量或浓度是已知的)；或者可能作为标记物来使用(例如，可以结合或粘附于特殊细胞或细胞类型、特殊的细胞标记物或细胞成分、或者与一份样本中的所有细胞相结合)。

[0225] 例如，一份生物样本可能在一种或几种类型的细胞与其他细胞类型分离处理之后被测量或分析。这种分离可能是通过重力(例如沉淀)、离心、滤过、与一种底物(例如，一种表面，诸如含有抗体、凝集素、或可能与一种类型的细胞更容易结合或粘附的其他成分的一个侧壁或滚珠)接触或其他方法来完成。分离可能通过一种或几种类型细胞的改变被辅助进行或完成的。例如，一种溶液可能被添加至一份生物样本中，诸如一份血液样本，从而导致该样本中的一些细胞或全部细胞水肿。而其中一种类型的细胞较另一种或几种类型的细胞水肿发生快，这样在加入该溶液后通过对该样本的观察和测量可能对细胞类型进行区分。这种观察和测量可能在同一时间点，或者多个时间点进行，选择所强调的不同之处(例如，大小、容量、内部浓度、或其他被这种水肿所影响的特性)，并增加这种观察和测量的敏感性和准确性。在一些情况下，一种或几种类型的细胞可能因为这种水肿而破裂，从而允许进一步对样本中剩余的细胞类型进行观察和测量。

[0226] 通过细胞计数仪对一种生物样本进行的观察、测量和分析可能包括，诸如使用一

个光电二极管、一个光电子增倍管、一个激光二极管、一个分光光度计、一个电荷耦合设备、一个照相机、一个显微镜、或其他方法或设备进行的光电测量。细胞计数分析可能包括对一份生物样本内的细胞图像进行准备和分析(例如二维图像),其中这种细胞被标记(例如用荧光、化学发光物质、酶、或其他物质进行标记)、放置(例如允许其沉积在一种底物上)并由照相机进行成像。这种照相机可能包括一个镜头,而且可能贴附在一个显微镜上,或者与一个显微镜联合使用。细胞可能通过贴附其上的标记(例如有标记物释放的光波)在二维图像上被识别。

[0227] 此处所显示的通过一台细胞计数仪进行准备和分析的一副细胞图像可能包括零个细胞、一个细胞或多个细胞。一个细胞计数器图像内的细胞,如此处所示,可能被标记,如上所示。一个细胞计数器图像内的细胞,如此处所示,可能被标记,如上所示,以有效地对图像以及从中提取样本的物质进行鉴别。

[0228] 在一些实例中,该检测系统被设计执行细胞计数分析。细胞计数检查典型地被用来光学、电学、或声学地测量单个细胞的特性。鉴于本发明的目的,“细胞”可能环绕在通常与单个细胞尺寸相当的非细胞性样本周围,包括但不限于小囊泡(例如脂质体)、小群细胞、病毒体、细菌、原生动物、晶体、脂质和(或)蛋白质聚合体以及小粒子结合物质,诸如滚珠或微球。这些特性包括但不限于大小、形状、粒度、光散射模式(或光学指标)、细胞膜是否完整、浓度、形态学以及细胞内容物的时空分布,包括但不限于蛋白内容物、蛋白修饰、核酸内容物、核酸修饰、细胞器内容物、细胞核结构、细胞核内容物、细胞内结构、囊泡内容物(包括pH)、离子浓度、以及其他诸如激素或药物等小分子的表达、包括蛋白质、脂肪、碳水化合物及其修饰体在内细胞表面(包括细胞膜和细胞壁)标记物。通过使用正确的染料、着色剂、或其他标记分子,这些分子可以是单纯形式、与其他分子共轭或固定化的、或者结合在纳米或微米粒子上,细胞计数仪可能被用来确定指定蛋白、核酸、脂质、碳水化合物或其他分子的表达、定量分析以及/或修饰。可能被细胞计数仪测量的特性还包括细胞功能或活性的测量,包括但不限于吞噬作用、抗原表达、细胞因子分泌、内部分子和表面分子表达的改变、与其他分子、细胞或底物的结合、小分子的主动转运、有丝分裂或减数分裂、蛋白转译、基因转录、DNA复制、DNA修复、蛋白分泌、凋亡、趋化作用、移动性、粘附、抗氧化活性、RNAi、蛋白或核酸降解、药物反应、传染性、以及特定通路或酶的活性。细胞计数仪还可能被用来确定有关一种细胞群的信息,包括但不限于细胞计数、总群体百分数,以及以上提及的所有特性在样本群中的变化。此处描述的检测可能被用于测量每个细胞中的一种或几种所述特性,确定不同特性之间的先管型或其他关系可能有利的。此处描述的检测还可能被用于独立地测量多个细胞群,例如,用针对不同细胞系的特异性抗体对一个缓和细胞群进行标记。一个显微镜模块可能允许该设备执行组织学、病理学、和(或)形态学分析,而且还可以根据物理和化学特性对目标进行评估。组织可以被均化、洗涤、沉淀在一个比色皿或一个切片上、风干、染色(诸如用抗体)、孵育然后成像。当与本文其他地方提及的数据传输技术联合使用时,这些发明有助于将图像从CMOS/CDD或类似设备传输给诸如一位执业病理医生进行查看,这对传统的仅进行流式细胞计数的设备来说是不可能的。该细胞计数仪除可以测量细胞形态外,还可以测量表面抗原,与传统的血液实验室设备相比较,对表面抗原能够进行更敏感和特异性的检测。对细胞检测的解释可能通过选通一种或几种测量结果而自动进行;这种选通阈值可能由一位专家设定,或者根据来自培训数据的统计方法习得;选通原则可以是特

异性地针对单一研究对象和(或)研究群体。

[0229] 一些实例中,将一个细胞计数模块并入到一个定点服务设备内可以提供对细胞属性的测量,以提高临床决策的速度和(或)质量,而这些细胞属性典型地是由一般实验室设备或实验室进行测量,并由经过经典培训的医疗人员对结果进行解释。这样,一个定点服务设备可能被设计用于细胞计数分析。

[0230] 示范1

[0231] 获取一份含有包括自然杀伤细胞和中性粒细胞等白细胞在内的血液样本。该样本经由一种荧光标记的细胞身份结合物(抗CD16结合物)处理,可以同时结合自然杀伤细胞和中性粒细胞。该样本还同时被一种细胞核染料(DRAQ5)进行处理。该样本通过荧光显微镜和暗视野显微镜进行成像。样本内不同细胞的荧光水平和光线侧位散射水平被记录和分析。含有抗CD16结合物信号的分段图像在每个细胞荧光密度(与CD16表达水平相一致)和细胞大小方面提供了定量信息。暗视野图像在每个细胞的散射特性方面提供了定量信息。包含DNA染色信号的图像被分成几个部分以确定细胞核的荧光密度,大小和形状。

[0232] 如图1A中所示,根据不同细胞的CD16荧光信号和散射光信号的测量结果,两个主要的细胞组被得以确认。含有明亮/高CD16荧光信号和高散射信号(图1A,右侧圆圈)的细胞组为中性粒细胞。含有中等CD16荧光信号和低散射信号(图1A,左侧圆圈)的细胞组为自然杀伤细胞。虽然对不同细胞的荧光信号和散射光信号进行测量可以提供足够的信息来区分样本内的大部分细胞是自然杀伤细胞还是中性粒细胞,但是对于一些细胞来说,对这些属性的测量并不能提供足够的信息高准确度地区分这些细胞。例如,对细胞的荧光信号和散射光信号进行测量没有提供足够的信息来准确区分图1A中小圈勾画的(例如中间的圆圈)一小组细胞。为了鉴别在小圆圈内的细胞是自然杀伤细胞还是中性粒细胞,对细胞核染色(DRAQ5)和全细胞(抗CD16)染色图像进行检查。获得细胞核面积和细胞总容量的定量测量数据,并确定细胞核面积与总细胞面积的比值。如图1B所示,自然杀伤细胞(NK)和中性粒细胞(Neu)的细胞核面积与总细胞面积比值有着明显不同。因此,应用显微定量分析技术检查样本内细胞的多种属性允许我们对细胞进行明确分类。图1C显示的是源自图1A最小圆圈内的自然杀伤细胞图像。所有图像具有相同的长度比例。左图是对全部细胞面积(抗-CD16)进行染色的细胞,而右图是仅对细胞核进行染色(DRAQ5)的同样细胞。上下两幅图像是自然杀伤细胞的不同示范。图1D显示的是源自图1A最小圆圈内的中性粒细胞图像。所有图像具有相同的长度比例。左图是对全部细胞面积进行染色的细胞,而右图是仅对细胞核进行染色的同样细胞。上下两幅图像是自然杀伤细胞的不同示范。

[0233] 除此以外,一个中性粒细胞的细胞核具有一个明显的多叶形态,而一个自然杀伤细胞(以及其他淋巴细胞)的细胞核是圆形和平滑的。根据细胞核本身的形状,图像分段法则可能被用来对细胞进行确认和分类。

[0234] 示范2

[0235] 获取一份含有血小板的样本。该血小板用荧光共轭的抗-CD41和抗-CD16抗体进行标记。并将直径为3 μm 的滚珠添加到样本内。将样本在10x和20x放大倍数下进行成像。单个血小板的荧光分布密度被测量(来自两种抗体),并确认其具有高斯分布形态(图2B)。单个血小板的荧光测量数值被制成图形,并确定一个拟合的密度分布(图2C)。图2C中,灰线是测量出的每个血小板的荧光密度,而黑线是拟合线。拟合参数,诸如高斯均数、变异值、容积、

宽度以及基底面积等等,可以作为血小板容量预测因子进行评估。高斯容积和拟合宽度被认为与血小板平均容积最为相关。

[0236] 在以上测量中,3 μ m滚珠的作用是作为参照和基准点控制准确确定最佳对焦平面时出现的变异,以及该变异对容积测量的影响。

[0237] 除此以外,根据拟合二维模型估计的血小板大小可以被校准至正常范围内(图3)。

[0238] 示范3

[0239] 获得一份含有红细胞(RBCs)的血液样本。该RBCs用一种低浓度的表面活性剂(DDAPS或SDS)进行处理,造成RBCs呈现一种球形形状。该RBCs在两个不同的比色皿内由暗视野显微镜进行成像。(A)一个比色皿仅允许单纯的落射照明(图4A);(B)一个比色皿允许落射和透射的混合照明(图4B)。在允许落射和透射混合照明比色皿内的RBCs比仅允许单纯落射照明比色皿内的RBCs更显而易见(图4)。

[0240] 示范4

[0241] 获取一份含有中性粒细胞的样本。中性粒细胞中,其细胞核的形状和染色体形态可能指示出该细胞是一种不成熟的“带状核”中性粒细胞还是一种成熟的“分叶核”中性粒细胞。带状核中性粒细胞是一种刚从骨髓中释放出的不成熟的中性粒细胞。带状核中性粒细胞比例的增加可能指示出一种进展中的感染或炎症状态。

[0242] 该样本与一种荧光标记的抗-CD16抗体相混合,可以识别出中性粒细胞上的一种细胞表面受体CD16。该样本还被一种荧光细胞核染料染色。该样本通过荧光显微镜进行成像,同时从细胞中获得细胞核染色和CD16染色数据。带状核中性粒细胞通常与成熟的分叶核中性粒细胞有着相似的CD16表达水平,因此仅从CD16的荧光密度值不能对二者进行区别。

[0243] 包括分段成像在内的图像分析被用来识别带状核中性粒细胞和分叶核中性粒细胞的细胞核染色和形态,因此允许我们对中性粒细胞进行分类。细胞核的大小、形态和荧光密度被检测。而且,细胞核被分析以确定分叶数目(细胞核区域的峰值密度)、细胞核两个分叶之间的距离、以及细胞核外形曲线(二阶导数)的变化。图5A所示为代表性的带状核中性粒细胞图像。在这些图像中,细胞核显示为一种浅灰色,而细胞浆显示为一种深灰色。由于中性粒细胞由髓系干细胞分化而来,因此在达到完全成熟前会发展为一种特征性的“U”形细胞核。图5B所示为代表性的分叶核中性粒细胞图像。在这些图像中,细胞核显示为一种浅灰色,而细胞浆显示为一种深灰色。分叶核中性粒细胞的细胞核含有多个节段/分叶(通常为3-5个)。因此,这种分析有助于对血液中不同的中性粒细胞亚群进行识别和定量。

[0244] 示范5

[0245] 从慢性淋巴细胞性白血病(CLL)患者体内获得一份细胞样本。研究目标是对患者B细胞CD5的表达进行定量分析。抗-CD20抗体被选择作为B细胞的结合体。被一个第一彩色荧光标记的抗-CD20抗体与该样本混合。经过一段恰当时长的孵育后,该样本被洗涤,未结合的抗-CD20抗体被去除。将该样本暴露在可以激活第一荧光的光源下,并使用一台分光光度计对荧光信号进行测量。根据测得的荧光信号,样本中B细胞的大致浓度可被确定。被确定的B细胞大致浓度事实上是样本中B细胞真实浓度的1.5倍。

[0246] 根据样本中B细胞的大致浓度,一个抗CD5结合体的正确数量被加入样本中,以使CD5的表达与CD5荧光之间保持一个适当的比例关系。该抗-CD5结合体与一个第二荧光团相

耦合,与第一荧光团(附着于抗-CD20结合体)有着不同的峰值激活波长。将该抗-CD5抗体添加至该样本中,然后将该样本中的独立细胞暴露在可以激活第二荧光的光源下,并对独立细胞的荧光信号进行测量。根据从细胞中测得的荧光信号,样本B细胞中的CD5平均数量可被确定。

[0247] 虽然该示范以CD5为背景进行描述,应该理解的是,获得一个正确数量以指导添加一种理想数量的材料用于后续步骤的使用,这个概念并不限于CD5,不除外将本概念用于其他类型的细胞、分析底物或标的物。

[0248] 示范6

[0249] 根据此处所描述的方法,血液细胞可能被成像、确认和定量。例如,一份生物样本中细胞的二维图像,其中该细胞被标记(例如用荧光、化学发光物质、酶、或其他物质进行标记)、放置(例如允许其沉积在一种底物上)并由照相机进行成像,可能按当前示范中所描述的方法进行准备和分析。这种照相机可能包括一个镜头,而且可能贴附在一个显微镜上,或者与一个显微镜联合使用。细胞可能通过贴附其上的标记(例如有标记物释放的光波)在二维图像上被识别。

[0250] 从一个指尖采血中获得的80微升全血被加载至一个预含2mg/ml EDTA的带盖样本容器内。该示范中使用的是一个封闭的样本容器(带有一个可去除或可穿刺的盖帽);应该理解的是任何用来盛接这种小容量样本的适合容器均可能被使用,包括但不限于一个带盖的容器或一个不带盖的容器。该样本容器在1200x g转速下离心5分钟,使血细胞与血浆分离。样本容器的离心造成样本容器内的血液样本分离为两个主要的部分(从样本容器上部到底部)。1) 血浆,和2) 压积的血细胞。该过程保证没有一滴血在分离后仍保留在其液体部分内。而且,该处理过程将细胞从血浆成分中分离出来,可以减少代谢并允许对样本进行较长时间储存。

[0251] 离心后的样本容器被置于一个含有多个液体分离反应试剂、吸头和一个细胞计数比色皿的暗盒内。该暗盒内含有所有检测需要的反应试剂。该暗盒加载到一个至少配备有一个离心机、一个移液管和一个平台以加载比色皿的设备内。该设备内的移液管有多个管嘴,一些管嘴与其他一些管嘴有不同的尺寸。

[0252] 该设备内,移液管上的一个管嘴被降至一个比色皿装载工具上,与其上的相关孔洞相衔接。该工具接下来被移动至暗盒处,并被降至细胞计数比色皿上。该工具上的别针可以与比色皿上相应的孔洞相衔接并将其提起。该比色皿被转移至位于该设备其他部位内一个加载平台处。

[0253] 接下来,在设备内部该移液管的一个较大管嘴被降至暗盒内,与储存在该暗盒中的一个移液管吸头相衔接。该移液管和吸头一起被用于混合样本容器内的细胞和血浆,将移液管吸头置于样本容器内的样本中反复将物质吸入和弃出吸头。一旦细胞在血浆中再悬浮后,该全血样本即被完全混合,吸取5微升混合后的全血提供一个分装样本用于该血液样本特性的测量。这5微升分装样本被用于针对样本中红细胞和血小板的测量。如下所述,除去这5微升分装样本的剩余部分被用于样本中白细胞的测量。

[0254] 将5微升全血置于一个含有磷酸缓冲盐水和2%小牛血清白蛋白混合液的容器内,对全血进行20倍的稀释(最终形成100微升的稀释样本)。强力混合后,将5微升该样本移至另一个含有以下标记抗体的一种混合液内:AlexaFluor[®] 647 (AF647) 共轭的抗-CD235a、藻

红蛋白(PE)共轭的抗-CD41和抗-CD61。将该混合液孵育5分钟。接下来,将10微升该混合液与90微升含有一种两性离子表面活性剂的缓冲液以<0.1%重量浓度相混合。该表面活性剂分子改变红细胞的结合特性是所有的细胞都呈现一种稳定的球形形状。这种变化是等容性的,因为所用的缓冲液与细胞浆等张;这样没有跨越细胞膜的渗透性驱动的液体交换发生。再次孵育2分钟后,将30微升该溶液与一种含有戊二醛,一种固定剂和10 μ m直径非荧光滚珠溶液相混合。该混合液的最后浓度为0.1%戊二醛和每微升1000粒滚珠。戊二醛将细胞迅速固定以防止细胞裂解和其他活性生物过程。

[0255] 在这个非限制性示范中,该移液管与暗盒内的一个吸头相衔接,吸取所述混合液7微升,并将该7微升混合液加载至比色皿的一个管道内,该比色皿与运载工具一起放置在一个平台上。将该混合液加载至比色皿中后,该移液管从该暗盒中一个容器内吸取10微升矿物油,然后将一滴矿物油滴在该比色皿加载管道的两个开口处。将十六烷添加至管道的开放端口可以防止液体从加载的比色皿管道内挥发(矿物油也有该作用)。接下来,该设备水平的样本处理装置与比色皿转运器/比色皿联合体相衔接,并将该比色皿转运器/比色皿联合体从含有暗盒的模块传送至该设备的细胞计数模块。在该细胞计数模块处,该设备水平的样本处理装置将该比色皿转运器/比色皿联合体放置在该细胞计数模块的显微镜载物台上。这些操作过程所需要的时间,加上2分钟等待时间以使肿胀细胞在成像前沉淀在该比色皿底部。

[0256] 将比色皿转运器/比色皿联合体放置在显微镜载物台之后,该载物台被移动到预先确定的位置,使该细胞计数仪的光学系统能够看到含有该样本的管道的一个开口。在这个位置上,该光学系统将转送通过一个环形光暗视野照明获得的该样本图像。这些图像与位于该比色皿平面垂直的一个枢轴上的该光学系统驱动耦合在一起,用来找到最佳对焦平面。一旦对焦成功,该光学系统即被用来在不同波长下获取该样本的荧光图像,与所用荧光团波长相当。例如,为了看到由抗-CD235共轭Alexa Fluor[®]647标记的红细胞,一个红光(630nm波长)被用来激活该样本,而波长位于650nm和700nm之间的光线被用来对该样本成像。一个多色光镜片和一个带通滤波器联合体被用来滤过该光学信号中不需要的波长。由于细胞已经沉淀在该比色皿的底部,因此在一个单一聚焦平面上的成像就足以看到该区域内的所有细胞。

[0257] 源自这些图像的数据由该样本处理设备相关的一台控制器进行处理。此处使用的图像处理法则采用自适应阈值和边缘检测联合的方法通过细胞的荧光图像对其进行检测。根据局部密度和密度梯度在每个细胞周围创建感兴趣区域(RoI)。使用暗视野成像时,该样本中的滚珠也会被确认,并在滚珠周围创建RoIs。每个视野中的所有RoIs均被计数,并对该视野内每幅图像的荧光密度进行计算。由该图像处理法则输出的信息包含相撞或形态学测量以及每个RoI的荧光和暗视野密度。这个信息经统计学方法分析后即可对每个目标进行分类,是一个红细胞(CD235a阳性,但CD41/CD61阴性)、一个血小板(CD41/CD61阳性且CD235a阴性)、还有一个滚珠。这些形状描述指标,诸如周长、直径和圆度被用来计算每个红细胞和血小板的容积。由于这些滚珠是以一个已知浓度添加至样本中,所以整个管道中滚珠与细胞的平均比例被用来计算细胞浓度,其单位为细胞/微升。根据样本处理步骤,该浓度被稀释校正,以获得原始全血样本中细胞的浓度。下边是对一份样本的定量分析计算:1)该比色皿中红细胞的数量;2)该比色皿中红细胞的平均容量;3)该比色皿中红细胞的宽度

分布 (RDW) ; 4) 该比色皿中的血小板数量; 以及5) 该比色皿中血小板的平均容量。以下是根据这些计算结果, 对原始血液样本进行的计算:

[0258]

测量的数值	结果	典型范围
红细胞浓度(百万个/微升)	4.8	4-6
红细胞平均容积(飞升)	88	80-100
红细胞宽度分布 (RDW) , (%)	12	11-14.6
血小板浓度(千个/微升)	254	150-400
血小板平均容积(飞升)	10.4	7.5-11.5

[0259] 在去除5微升分装样本用于RBC和血小板信息分析后, 剩余的75微升样本用于对白细胞的分析。剩余的75微升全血也使用移液管通过在同一个容器内反复吸取和释放对样本进行混合。将剩余的混合后的75微升全血样本中的大约40微升吸至一个移液管吸头内, 并被该移液管传送至该暗盒的一个离心管内。含有该血液样本的离心管与该移液管衔接后, 被传送并放置在该模块中一个离心机内的一个浮桶内。该离心机在1200x g转速下旋转3分钟, 将该血液样本分离为含有EDTA的血浆上清液和压积的细胞沉淀物。

[0260] 离心完毕后, 该离心管从该离心机中移出并返回至该暗盒处。该血浆上清液被该移液管移出, 并将其传送至该暗盒中一个不同的反应容器内。从该暗盒中的一个反应容器中, 由该移液管吸取16微升再悬浮缓冲液, 并将其添加至该离心管中的细胞沉淀物中。该移液管通过反复吸取和释放该离心管中的混合物, 对该再悬浮缓冲液中的细胞沉淀物进行再悬浮。接下来, 该移液管吸取21微升再悬浮后的全血, 并将其添加至另一个含有2微升 Pacific BlueTM和DRAQ5[®]共轭的抗-CD14的容器中, 混合并孵育2分钟。将20微升该混合液添加至一种80微升裂解缓冲液中。该裂解缓冲液是一种温和的表面活性剂溶液, 诸如一种皂素与一种诸如多聚甲醛固定剂的配合使用。该洗涤剂会造成细胞膜内形成大量的孔洞。红细胞由于其独特的膜特性, 对这种孔洞形成特别敏感, 并完全裂解, 内容物漏至周围的液体中。加入固定剂防止白细胞不必要的裂解。血小板也保持未裂解状态。这个步骤的目的是为了从混合液中去除红细胞, 因为它们以大约1000:1的比例远远超过白细胞的数量。血小板对成像没有影响, 因此与这个处理过程无关。该裂解缓冲液中还含有一个已知浓度10μM的非荧光滚珠。

[0261] 孵育5分钟后, 该容器再次在1200x g转速下离心3分钟。通过一个移液管吸头吸取该上清液, 去除红细胞和其他细胞残渣, 并将其置于该暗盒内的一个废物区域。在该沉淀细胞中, 压积的白细胞处在大约15微升液体中。

[0262] 为了确定沉积细胞中白细胞的大致数目, 使用该移液管首先将白细胞在该容器内进行再悬浮, 然后吸取该液体并传送至一台分光光度计处进行检测。该白细胞悬液被波长为632nm的光线进行照明, 该波长的光线是AlexaFluor[®] 647染料的和DRAQ5[®]激活波长。该细胞悬液释放的光波被一个650nm的长通滤波器滤过, 并在该分光光度计内进行测量。这个测量值与以往生成的校准曲线相对应以估测出该细胞悬液内白细胞的一个大概浓度。通常情况是, 细胞浓度在大约1000个细胞/毫升到100000个细胞/毫升范围内。这个估计值被用来计算一个正确的稀释因子以保证该比色皿内的细胞浓度被限制在预置目标密度的两倍范围内。这个步骤的目的是为了确保比色皿中含有的细胞密度不会太高或太低。如果细胞密

度过高,图像处理运算的准确性会受到损害;而密度太低时,样本的细胞数量会不足。

[0263] 根据在所述步骤中计算出的稀释因子,将一种含有抗CD45(泛白细胞标记物)、CD16(中性粒细胞标记物)、和CD123(碱性粒细胞标记物)的标记抗体添加至该细胞悬液中并进行混合。

[0264] 一旦与比色皿运载器形成复合物的比色皿被置于比色皿运载器板上,10微升再悬浮于细胞计数缓冲液中的白细胞混合液被加载至该比色皿中的两个管道中。将该混合液加载至比色皿管道中后,该移液管从该暗盒中一个容器内吸取10微升十六烷,然后将一滴矿物油滴在该比色皿加载白细胞的管道的两个开口处。

[0265] 接下来,该设备水平的样本处理装置与比色皿转运器/比色皿联合体相衔接,并将该比色皿转运器/比色皿联合体从含有暗盒的模块传送至该设备的细胞计数模块。在该细胞计数模块处,该设备水平的样本处理装置将该比色皿转运器/比色皿联合体放置在该细胞计数模块的显微镜载物台上。将该比色皿转运器/比色皿联合体放置显微镜载物台上后,对含有白细胞的比色皿两个管道进行成像,如所述对RBC/血小板的描述一致。

[0266] 白细胞的暗视野成像用于计数一个视野内的白细胞数量(如图9A所示)。细胞表面标记物被用来确定一幅图像内单个白细胞的细胞类型;例如,CD14标记单核细胞;CD123标记嗜碱性粒细胞;CD16标记中性粒细胞;而CD45-AF647被用来标记所有的白细胞(图9B-9E)。核染色剂Draq5被用来标记细胞核,并将有核细胞(诸如白细胞)与成熟红细胞进行区别,后者没有细胞核(图9F)。

[0267] 此处使用的图像处理法则采用自适应阈值和边缘检测联合的方法通过细胞的荧光图像对其进行检测。根据局部密度和密度梯度在每个细胞周围创建感兴趣区域(RoI)界限。使用暗视野成像时,该样本中的滚珠也会被确认,并在滚珠周围创建RoIs界限。每个视野中的所有RoIs均被计数,并对该视野内每幅图像的荧光密度进行计算。由该图像处理法则输出的信息包含相撞或形态学测量以及每个RoI的荧光和暗视野密度。这些信息通过统计学方法加以分析以将每个标的物分类,是一个淋巴细胞、单核细胞、嗜碱粒细胞、嗜酸粒细胞、中性粒细胞、或是一个滚珠。根据不同类型细胞的数量,样本处理过程中与之相对应的滚珠数量和稀释比例被落实,并对每微升原始全血中的一个细胞绝对浓度进行计算。这种方法被用于所有白细胞和每个亚型的计算,并按绝对浓度(每微升细胞数量)和百分比例(%)进行报告。

[0268] 每种测量结果的图像和图形示范显示在图9、10和11中。

[0269] 图9显示来自一份全血样本的代表性的血细胞图像;这些图像通过不同的成像技术和染色进行拍摄。图9A中所示图像是使用暗视野照明拍摄的全血样本中的细胞。图9B所示图像拍摄于全血样本细胞,显示了Pacific Blue染料标记的抗-CD14抗体的荧光显像;该荧光细胞为单核细胞。图9C所示图像拍摄于全血样本细胞,显示了PECy5染料标记的抗-CD123抗体的荧光显像;该荧光细胞为嗜碱粒细胞。图9D所示图像拍摄于全血样本细胞,显示了PE染料标记的抗-CD16抗体的荧光显像;该荧光细胞为中性粒细胞。图9E所示图像拍摄于全血样本细胞,显示了AF647染料标记的抗-CD45抗体的荧光显像;所有白细胞均在该荧光显像之下。图9F所示图像拍摄于全血样本细胞被DRAQ5[®]对细胞核进行染色。因此,白细胞和血小板被染色并显示荧光,而红细胞(缺乏细胞核)没有被染色且无荧光显现。

[0270] 图10显示了一幅代表性的全血细胞中细胞类型的混合图像,图像根据此处所显示

的方法获得。图中显示了一个单核细胞图像(见于图的左上方,标记为一种淡红色中心外被蓝紫色环包围)、一个淋巴细胞图像(见于图的中央,标记为一种亮红色中心外被暗红色环包围)、一个嗜酸粒细胞图像(见于图的左下方,标记为一种绿色中心外被红色边界包围)、以及一个中性粒细胞图像(见于图的右下方,标记为一种绿色中心外被黄绿色边界包围)。

[0271] 对类似血液样本中发现的细胞类型进行确认和定量分析是非常有意思的。可能有多种方法进行类似的分类处理,在一些实例中,这种多重分类可能被认为是一个统计学问题。应该理解的是,在该领域内有大量的方法被提供用于解决这些细胞分类问题。这种分析的一个特殊实例被提供如下。

[0272] 图11显示的是通过本示范中所描述的细胞计数检测进行确认和定量分析的不同类型细胞的图形。图11A显示的是通过标记物FL-17 (pacific blue染料标记的抗CD14抗体) 密度对FL-9 (暗视野散射信号) 密度显示的一个斑点图形(细胞) 用来确认单核细胞。图11B显示的是通过标记物FL-19 (PE-CY5染料标记的抗CD123抗体) 密度对标记物FL-15 (PE染料标记的抗CD16抗体) 密度显示的一个斑点图形(细胞) 用来确认嗜碱粒细胞。图11C显示的是通过标记物FL-15 (PE染料标记的抗CD16抗体) 密度对标记物FL-11 (AF647染料标记的抗CD45抗体) 密度显示的一个斑点图形(细胞) 用来确认淋巴细胞。图11D显示的是通过标记物FL-15 (PE染料标记的抗CD16抗体) 密度对FL-9 (暗视野散射信号) 密度显示的一个斑点图形(细胞) 用来确认中性粒细胞和嗜酸性粒细胞。

[0273] 对单核细胞的初始确认(如图11A所示,9.6%) 被用来指导后续的嗜碱粒细胞的确认(如图11B所示,0.68%)。对单核细胞和嗜碱粒细胞的确认,如图11A和11B所示,被用来指导后续的中性粒细胞和嗜酸粒细胞的确认(WBCs中68%为中性粒细胞,3.2%为嗜酸粒细胞,如图11D所示)。最后,淋巴细胞的确认显示在图11C中(图11C中显示了93%的WBCs,对应于原始样本中18%的细胞)。

[0274] 当前的方法与其他方法的相关性很好。使用EDTA抗凝的全血样本对白细胞、红细胞、和血小板进行计数。白细胞得进一步计数,以确定该样本中中性粒细胞、单核细胞和淋巴细胞的数量。在图12中所示的测量方法中,EDTA抗凝的全血样本被分为2份,该样本的一部分在本发明系统中运行,并使用此处显示的方法进行分析。而另一部分样本在Abbott CELL-DYN Ruby系统(Abbott Diagnostics, Lake Forest, 伊利诺伊州, 美国) 中运行,由一种商业化多参数自动血液分析仪进行分析。用两种方法获得的结果比较显示于图12中。

[0275] 如图12A—12C所示,通过当前方法所测量的白细胞(“WBCs”,图12A)、红细胞(“RBCs”,图12B)、和血小板(图12C)数量与通过其他方法对当前方法所分析的同一个相应分装样本的WBCs、RBCs、和血小板数量测量结果相关性非常好。如图12D—12F所示,两种方法所测得的中性粒细胞、单核细胞、和淋巴细胞数量值非常接近,且相互之间的相关性非常好。

[0276] 在此处所使用的专业术语方面,专有名词“细胞计数”指的是关于一份生物样本中细胞的观测、分析、鉴别方法、以及结果,这些细胞大致是在一种液体内或在一种底物上。由细胞计数仪检测和分析的细胞可能被任何光学、电子或声学探测仪检测和测量。细胞计数仪可能包括准备和分析一份生物样本内或源自一份生物样本的细胞图像(例如二维图像)。该细胞可能被标记(例如用荧光、化学发光物质、酶、或其他标记物) 和电镀(例如允许其沉积在一种底物上),并且很典型地被一台照相机拍摄成像。一台显微镜可能在细胞计数仪内

被用来进行细胞成像,例如,细胞可能被一台照相机和一台显微镜成像,例如,由一台照相机对一台显微镜成像的图像进行拍摄。一幅由细胞计数仪形成的或用于细胞计数仪的图像通常包括一个以上的细胞。

[0277] 光学系统

[0278] 现在参考图6A和6B,适于此处使用的一个光学系统实例现在将被描述。虽然该系统的这些实例在细胞计数仪处被描述,应该理解的是该系统的这些实例还可能不止被用于细胞计数仪。作为非限制性示范,此处显示的该系统的成像以及成像处理能力可能有多方面的应用,包括细胞计数仪以外的应用。由于用于分析的该样本图像被拍摄,而且图像信息通常被链接到该系统或者与该系统相关联以进行定量测量,我们可以对于这些定量信息相关的图像进行进一步分析以收集图像中未进行报告的临床信息。

[0279] 被诸如细胞计数仪或其他光学或成像方法分析的一份样本可能被保留在一个样本架内用来分析。例如,一个比色皿可能作为这样一个样本架被使用。图6A中的实例显示了一个比色皿600的透视图,它含有多个开口602用来接收一份样本或样本的一部分用来分析。图6A实例中的水平横截面形状似一个长方形。虽然该系统在一个比色皿的上下文中被描述,应该理解的是其他样本盛接设备也可能被用来替代该比色皿600,或与该比色皿600结合使用。

[0280] 正如图6A实例中所见,这些开口602可能允许一个样本盛接系统(未显示)或其他传送系统将样本放置在开口602内,这些开口可能连接至或通向该比色皿内的一个分析区域608,该样本可以在此处被分析。在一个非限制性示范中,一个分析区域608可能是一个腔室。在另一个非限制性示范中,一个分析区域608可能是一个管道。在实例中,一个被设计为管道的分析区域608可能与两个入口602相连通。在一个进一步的非限制性示范中,一个分析区域608可能是一个管道,将样本以一种非流动方式保留其中。在此处的任何一个实例中,在分析过程中,该系统都可以以一种非流动的方式保留该样本。可选择地,一些其他实例可能被设计为允许样本在分析前、分析中、或分析后流经该分析区域。在一些实例中,分析完毕后,该样本被从该比色皿600中吸出,然后传送至另一个平台(在一个含有多个平台的系统中)用于进一步的处理和(或)分析。一些实例可能在系统中使用闸门来控制样本的流动。

[0281] 图6A显示,在一些实例中一个比色皿600中可能含有多个开口602。样本可能通过入口602被添加至该样本架中。一个开口602可能可操作性地与一个分析区域608相连接(例如以流体连续性方式)。一个分析区域608可能可操作性地与多个开口602相连接(例如以流体连续性方式)。应该理解的是,一些实例在该比色皿600内可能含有更多,或更少的开口602。一些实例可能与特定的开口602相连接,这样被选择的配对开口或配套开口602可以进入同一个管道(例如被设计为以一个管道的分析区域608)。作为非限制性示范,一个分析区域608的每个端口处可能都有一个开口602。可选择地,一个分析区域608的一个端口处可能有一个以上的开口602。

[0282] 实例中的一个比色皿600可能含有一些结构610允许一个样本处理系统与该比色皿600相衔接并对其进行传送。图6A和6B所显示的一个比色皿600可能通过一个元素610与一个样本处理系统相衔接,效果是该比色皿600可能被从一个位置传送至另一个另一个位置。一个元素610还可能被用来确保一个比色皿600位于一个所需要的位置上,例如传送至

一个位置(例如一个用于光学成像和分析的探测仪)之前或之后,一个比色皿600可能被一个元素610保持在某个位置,或者通过一个使用一个元素610的工具或设备将一个比色皿600保持在某个位置上。在一个非限制性示范中,该结构610可以是该比色皿600内的开口,它允许一个移液管或其他加长部件与该比色皿600相衔接并将其传送至所需要的位置。可选择地,取代所说开口或与所说开口结合使用的该结构610可以是,或可能包括一个突起、一个挂钩、一块磁铁、一种磁化元素、一种金属元素、以及/或其他可被用来衔接一个比色皿传送设备的结构。一个实例中,外力(例如压力、或其他外力)可能作用于一个比色皿600上;例如,压力可能作用于一个比色皿600上以将比色皿600压在一种底板或表面上(例如一个基底支持物620的一个表面),将该比色皿600与该表面有效地进行光学接触。在实例中,这种外力(例如压力)可能有助于提供理想的光学特性,诸如为一个比色皿600和一个基底支持物620之间提供良好的接触,有效地允许光线透过或生成其他所需要的光学特性,而在交界面处不会产生明显的扭曲或反射。在实例中,这种外力(例如压力)可能,至少部分地,是通过一种结构610或通过多个结构610来实施的。

[0283] 如图6B所示(透明视图),一个比色皿600可能含有一个圆形的水平横截面形状。一个开口602(或者多个开口602,可能出现在同一个实例中,图中未显示)可能允许样本处理系统或其他传送系统将样本放置在开口602内,该开口可能通向该比色皿内的一个分析区域608,该样本可以在此进行分析。非限制性的适合的分析区域608包括一个含有一个腔室的分析区域608,和一个含有一个管道的分析区域。在实例中,这样一个分析区域608可能位于一个环形结构内,诸如图6B中所示的环形结构604。在实例中,一个开口602可能与一个分析区域608相连接。在实例中,一个结构604内的一个分析区域608可能形成一个连续的环形腔室,并与一个开口608相连接,有效地允许样本在该腔室内从一个开口602向任何一个方向流动。在实例中,一个结构604内的一个分析区域608可能形成一个环形管道或腔室,一端与一个开口608相连接,另一端从开口602处断开或被封堵掉,有效地允许样本在该腔室内从一个开口602处只能单方向流动。在实例中,这种单向环形管道或腔室在一个远离一个开口602的位置处可能有一个通气孔或其他孔洞。在一个进一步的非限制性示范中,该分析区域可能是或可能包括一个将样本以非流动方式保留其内的管道;一个样本可能以一种非流动方式保留在一个有一个环形管道组成的分析区域608内,该环形管道或者与一个开口602双方向相连接,或者与一个开口602仅仅是单方向相连接。在此处的任何一个实例中,在分析过程中,该系统都可以以一种非流动的方式保留该样本。可选择地,一些其他势力可能被设计为允许样本在分析前、分析中、或分析后流经该分析区域。在一些实例中,分析完毕后,该样本被从该比色皿600中吸出,然后传送至另一个平台(在一个含有多个平台的系统中)用于进一步的处理和(或)分析。一些实例可能在系统中使用闸门来控制样本的流动。

[0284] 图6B只显示了一个单一环形结构604;但是,应该理解的是,如图6B所示一个比色皿600形状的实例中,一个比色皿600可能含有多个环形结构604。例如,一个含有多个环形结构604的比色皿600可能含有不同大小的同心的环形结构604,一个外围的环形结构604包围着一个或多个内侧的环形结构604。这种环形结构604可能在每一个环形结构604内都包括有分析区域608。图6B只显示了一个单一开口602;但是应该理解的是,如图6B所示一个比色皿600形状的进一步的实例中,一个比色皿600可能含有多个开口602。例如,一个含有多个环形结构604的比色皿600(例如,含有多个同心的环形结构604)可能含有多个开口602

(例如,每一个环形结构604都可能含有至少一个开口602)。应该理解的是,一些实例在一个比色皿600内可能含有更多,或更少的开口602。一些实例可能与特定的开口602相连接,这样被选择的配对开口或配套开口602可以进入同一个管道或腔室。作为非限制性示范,一个分析区域的每个端口处可能都有一个开口602。可选择地,一个分析区域608的一个端口处可能有一个以上的开口602。

[0285] 图6A和6B所示的比色皿的一些实例可能为一个比色皿600的选择区域提供结构604。在一个实例中该结构604是成凸起条纹状的,为该比色皿内被选择具有一个被控制厚度的区域(例如区域613)提供结构性支持。例如,该厚度可能被选择以提供理想的光学特性,包括光线在该比色皿600内反射前后所遵循的理想通路。这种反射可能是部分内反射(PIR)或全内反射(TIR)。这种反射是否发生取决于许多因素,包括光线的波长、入射光线到达一个表面的角度、该材料的组成成分(区域613以及一个区域613周围激活外围包绕的材料)、以及其他因素。在图6A所示的实例中,该结构604是长方形,而且有一个长方形的横截面。在图6B所示的实例中,该结构604是环形,而且可能有一个长方形的横截面、或者一个菱形的横截面、或者其他形状的横截面。这些结构可能有任何适合的横截面形状。如图8B所示,该结构604可能有一个三角形的横截面(例如,如果表现为多个凸起条纹状时,会形成一个锯齿形的横截面)。应该理解的是,这种结构604可能含有其他形状和横截面形状(例如,半圆形、椭圆形、不规则形或其他形状),而且在实例中,同一个系统内可能会有一个以上的形状表现(例如,一个比色皿可能包括长方形、三角形、或其他形状的结构)。当被控厚度区域613相对于该比色皿特定区域其厚度有所降低时,该结构604可能被使用,这样可以从结构604提供的机械性支持中获得好处。

[0286] 除提供结构性支持以外,结构604可能有助于为一个比色皿600内部的光线内反射提供材料和通路。如图8A-8D所示,在一个比色皿600内部进行的光反射可能包括一个结构604内发生光反射的通路(例如,一个凸起的条纹结构或一个含有一个三角形横截面的结构,如图所示,或任何其他形状,例如一个圆形或半圆形横截面、或其他横截面形状)。这样结构604可能提供凸形结构从一个比色皿600的一个表面614向外延伸;或者可能提供凹形结构从一个比色皿600的一个表面614向内延伸;或者可能从一个比色皿600的一个表面614上既提供凸形结构又提供凹形结构。这样,结构604可能为一个比色皿600提供机械性支持;可能为一个比色皿600提供理想的光学特性;也可能为一个比色皿600提供其他需要的和有用的结构和功能,如此处所示。

[0287] 支持行结构604因此可能用来为一个比色皿600提供结构性支持,包括硬度支持。一个比色皿600的光学特性对于其在光学成像中的应用和在一个分析区域608对样本,和类似样本中的细胞、粒子或其他成分进行其他光学测量可能是非常重要的。一个比色皿600的一个表面平度的维持,包括一个基底部分606、或一个表面614或618的平度维持;一个比色皿600正确方位和结构的维持(例如没有拧绕、弯曲或其他扭曲);以及一个比色皿600正确位置的维持(例如,在一个基底支持物620上或一个光学设置内)对于使用该比色皿600进行光学测量和成像的整合性来说可能是非常重要的。这样,诸如支持性结构604和基底部分606的设计和构造可能是提供和维持一个比色皿600正确光学特性的非常重要的因素。一个分析区域608正确维度的维持,包括一个分析区域608上下表面(或侧壁)之间正确距离和相对角度的维持对为一个分析区域608内一个样本提供正确和持续的照明可能是非常重要

的。一个分析区域608正确维度的维持在确保一个分析区域608的容量,也就是该分析区域608内的样本容量方面也可能是非常重要的。正如此处所讨论的,外力(例如压力)可能被应用于一个比色皿600上以进一步确保正确的平度、或者减少拧绕或扭曲、或者在使用过程中确保一个比色皿的正确形状、大小和方位。应该理解的是可能不需要外来压力确保这种正确的平度,以及在使用过程中一个比色皿的正确形状、大小和方位。例如,在实例中,单独的结构604可能已经足够帮助或确保一个比色皿600具备正确的平度,以及在使用过程中的正确形状、大小和方位。而且应该理解的是,在实例中,单纯的外来压力可能已经够帮助或确保这种正确的平度,以及在使用过程中一个比色皿的正确形状、大小和方位。应该理解的是,在实例中,结构604与外来压力结合在一起可能帮助或确保正确平度,以及在使用过程中一个比色皿正确形状、大小和方位的维持。

[0288] 一个包括一个支持性结构606和一个覆盖部分612的比色皿600可能由任何具有适合光学特性的材料制成。在实例中,一个包括一个支持性结构606和覆盖部分612的比色皿600可能由玻璃(例如,石英、或硼硅酸盐玻璃、或铝矽酸盐玻璃、或硅酸钠玻璃、或其他玻璃)制成。在实例中,一个覆盖部分612或一个基底支持部分620可能由一种丙烯酸塑料、或一种无色聚合物(例如,一种环烯共聚物、一种聚碳酸酯、一种聚苯乙烯,一种聚乙烯,一种聚氨酯,一种盐酸聚乙烯、或其他多聚物或复合多聚物)、或其他透明材料制成。除了这种材料的光学特性外,其物理特性(例如硬度、强度、熔点、被机器加工的可能性以及其他特性)、与其他材料的兼容性、价格、以及其他因素也可能会影响用来制造一个比色皿600的材料选择。如以上所讨论的,结构604的表现形式、外来压力的可利用性(例如可能通过一个结构610给予或直接应用于结构606和覆盖部分612的至少一个部分),以及其他因素可能允许使用一些诸如比石英硬度低的材料,这些材料可能也会提供此处所示系统和方法中所要求的光学和机械特性。除此以外,结构604的表现形式、外来压力的可利用性、以及其他因素可能允许使用一些制造技术和耐久性技术,这在缺乏类似结构、压力和其他结构的情况下可能是行不通的(例如可能因为变形或其他因素)。除此以外,结构604的表现形式、外来压力的可利用性、以及其他因素可能允许使用一些在缺乏类似结构、压力和其他结构的情况下不可能被使用的材料,包括一些便宜的材料。

[0289] 因此,支持行结构64和基底部分606的正确设计、构造和使用材料对于比色皿606及其使用来说是非常重要的。

[0290] 在一些实例中,这些厚度控制区域613(力图,见图8A、8B、和8D)被选择放置在该分析区域608的上面。在一些实例中,这些厚度控制区域613能够给予该分析区域或其附近一些特定的光学特性。一些实例也可能将该结构604设计为对经过该比色皿600的光线提供一些光学特性。可选择地,在一些实例中,该结构604可能被设计为对该比色皿600的光学质量不产生任何影响。在这样一个实例中,该结构604可能被设计为含有一个或多个光学吸收表面。例如瓣不限于,这种特定的表面可能是黑色的。可选择地,一些实例可能具有由一种吸光材料构成的该结构604。可选择地,该结构604可以被放置一个位置为该分析区域附近的比色皿600提供机械性支持,但不干扰其光学特性。

[0291] 例如特定的表面,包括一个厚度控制区域613的一个表面614,以及一个结构604的一个表面618,可能被涂层为一种黑色或其他颜色。这样一种涂层可能包括一个涂层,也可能包括多个图层。例如适合一个表面614或618的涂层可能包括2个、3个、4个、5个、6个、7个

或更多个涂层。在实例中,例如一个结构604的一个表面(如一个表面618)或一个表面614可能被覆盖3个或5个涂层。这样一种涂层可能包括一种染料、一种墨水、一种涂料、一种表面处理剂、一种带颜色的胶带、或其他涂层或表面处理技术。在实例中,一种黑色或其他颜色的标识(例如一个PaperMate[®],或Sharpie[®],或Magic Marker[®],或其他标识)可能被用来对一个厚度控制区域613的一个表面614,或一个结构604的一个表面618进行涂层。例如,一个超大的黑色记号笔可能被用来对一个表面614或一个结构604的外表面618实施黑色墨水的多层涂层以提供一个光学吸收表面,从而提高一个比色皿600的光学质量。在实例中,一个表面614或618可能被涂层或处理以影响或减少该表面的反射(PIR或TIR)。一个表面反射的减少可能会影响(例如减少)来自一个表面的背景照明。

[0292] 在实例中,特定的表面,包括一个厚度控制区域613的一个表面614,以及一个结构604的一个表面618,可能被一种提高该表面反射的材料涂层或覆盖。通过例如对一个表面进行涂层或将一种材料贴附在一个表面上,一个表面的反射可能被增强;适合增强反射的材料包括铝、银、金、和介电材料(例如氟化镁、氟化钙、或其他氧化盐或金属,或其他反射性的或介电材料)。这样一种涂层或覆盖物可能包括一个涂层,也可能包括多个图层。例如,适合一个表面614或618的涂层和覆盖物可能包括2个、3个、4个、5个、6个、7个或更多个涂层。一个表面反射的增加可能会影响(例如增加)来自一个表面的透射照明。一个表面反射的增加可能帮助或提高一个分析区域608内一个样本的成像;或者可能帮助或提高一个分析区域608内一个样本的光学分析。

[0293] 应该理解的是,该比色皿600典型地是由一种光学透明材料或光学透射材料制成。可选择地,只有该比色皿600所选择的部分(例如该分析区域或与该分析区域相关的区域)由光学透明材料或光学透射材料制成。可选择地,该比色皿600中所选择的层面或区域也可以被设计为非光线透射性。一个比色皿的一部分或一个区域可能被覆盖或涂层以吸收光线;例如一个表面(或一部分)可能被一种深色、或一种吸光染料或墨水涂层。在一个进一步的示范中,一个表面(或一部分)可能被一种深色、或一种吸光性涂料涂层,诸如一种深色或吸光材料,如胶带、或布料、或纸张、或橡胶、或塑料。

[0294] 图6A、6B、和8A-8D显示了一些实例,其中该比色皿600放置在一个基底支持物620上面,而该基底支持物620的一部分或全部是由一种光学透明或透射材料制成。在一些实例中,这种光学透明或透射材料部分被设计为与该比色皿600的分析区域成直线,以允许对该分析区域内的样本进行光学数据获取。在一个非限制性示范中,该底座支持物620可以在X、Y、和Z轴上移动,从而将该比色皿600移动到一个理想的位置进行成像。在一些实例中,该底座支持物620含有一个只可以在两个轴向上移动的平台或载物台。可选择地,一些支持结构可能只能在一个单一轴向上移动。该比色皿600可以被设计为通过摩擦力、机械性耦合、或通过安装于其中一个或全部两个部件上的保持零件可操作性地与该支持结构600相耦合。在实例中,压力或其他外力可能被施加在一个比色皿600和(或)一个底座支持物620上,以保证一个比色皿600和一个底座支持物620之间适当的接触和正确的嵌合。在实例中,这种压力可能有助于确保一个比色皿600、或一个底座支持物620、或二者兼有的一个光学透射表面是光学平面的且大致上没有扭曲。例如,在实例中,一个比色皿600可能被压向一个底座支持物620以减少或避免任何可能的因一个比色皿600一个光学表面的缺陷或异常造成的光学扭曲。在实例中,这种外力(例如压力)可能有助于提供理想的光学特性,有效地允许

光线透过,否则就会在交界表面产生扭曲。在实例中,这种外力(例如压力)可能,至少部分地,是通过一种结构610或通过多个结构610来实施的。

[0295] 图6A、6B、8A、8B、8C进一步显示了一些实例,其中用于暗视野和(或)亮视野观察的照明源可能通过一个置于该底座支持物620下面的照明光源650提供(例如但不限于所示的环形光),以将照明设备定位在该比色皿600水平以下。这个设计将该比色皿600的上方空间提供给移液管、样本处理设备、或其他设备,使其无障碍地进入位于该比色皿一个上表面的开口或其他结构。可选择地,一些实例可以将照明源660(虚影所示)定位在该比色皿600上方,以取代下方照明光源(例如所示的下方照明源650)单独使用或与下方照明光源联合使用。一个物镜670可以被放置在所示位置,或其他设计中,用来观察被照明的样本。应该理解的是,使用该比色皿600和该光学部分650和670之间的相对运动可以允许该系统对该比色皿600内不同的分析区域进行观察。可选择地,这些结构中只有一个处于运动状态以从该比色皿600的不同区域获取数据。

[0296] 现在参照图7A,将对一个适合的成像系统的一个实例进行更详细的描述。图7A显示了一个位于该底座支持物620下方的不同结构的横截面示意图。该横截面是图6A中弯箭头7所指示的面积区域。

[0297] 图7A显示一个实例,其中该比色皿600含有一个底座部分606和被一个覆盖部分612限定的分析区域608。可选择地,该分析区域608可能被限定在一个单一部件内。可选择地,该分析区域608可能通过使用两个以上的部件进行限定,例如但不限于一个针对每个该分析区域608的独立的覆盖部件。在一个实例中,该分层606含有光学透明塑料,例如但不限于传送优质光学元件和应用的环烯烃聚合物保温塑料。一些实例可能由玻璃、丙烯酸塑、无色多聚物或其他透明材料形成的一个或多个层次或结构。图7A所示的该比色皿600包括五个分开的分析区域608;这些区域的横截面显示在图中;具有这样一个横截面的分析区域608可能是长方形、或方形、或其他形状。例如,分析区域608可能含有加长管道,提供表面积相对大的表浅腔室,并可能通过该结构对样本进行观察。应该理解的是,一个比色皿600可能包括一个单一的分析区域608、或可能包括两个分析区域608、或可能包括三个分析区域608、或可能包括死个分析区域608、或可能包括五个(如图7A所示)或以上的分析区域608。

[0298] 在这个非限制性示范中,从中获取数据的该样本可以被限制在整个或部分区域608内。在非限制的示范中,该底座支持物620下方的光学系统可能包括一个含有一个环面反射器652和一个光源654的环形光650。适合于暗视野照明的其他照明成分可能被使用;这样该光学系统可能包括其他照明光源单独使用或与这样一个环形光联合使用。一些实例可能使用一个镜面。一些实例可能使用一个被覆涂层的反射性表面。一些实例可能使用一个与图中所示不同的反射器(例如,在照明一个样本时可能不使用环面反射器)。一些实例可能使用一个抛物面反射器。一些实例可能使用一个椭圆抛物面形状的抛物面反射器。一些实例可能使用多个单独的反射片。一些实例可能不使用任何反射器。一些实例可以进一步借助或不借助来自一个或多个外部反射器的辅助,通过使用与直射光线成角的光源获得非垂直照明。

[0299] 图7A所示实例显示激发能源680、682和684,例如但不限于位于指定波长的激光二极管,安装在对分析区域608内的样本进行照射的直接光源内。在一个非限制性示范中,为了有助于压缩包装,该能源680、682和684可能直接对一个二色分光元件690(例如一个二色

分光镜面或光束分束器)发光,然后将激活波长指向该分析区域608内。该激活波长造成该样本中的标记物、染料、和(或)其他物质中的荧光团发散出荧光波长。该发散的荧光波长通过该物镜670、通过该二色分光元件690、通过一个光学滤光片692进入到一个探测器700内,例如但不限于一个照相机系统。在非限制的示范中,该二色分光元件690被设计为反射激活波长但让荧光波长和任何用于光学观察的所需波长通过。

[0300] 在一个实例中,所有的荧光波长对分析区域608内的该样本同时进行照明。例如,一个探测器700可能与一个程序化处理器710耦合在一起,能够摄取捕获的信号和(或)图像,并拆解与荧光团发散荧光相关的波长。在一些实例中,激发光源可能对该样本进行顺序照明,或使用激发光源整个数量的一部分进行照明。当然,应该理解的是该系统不限于基于荧光的一个样本内荧光团的激发,其他探测技术活激发技术可能被用来取代荧光单独使用或与荧光联合使用。例如,一些实例还可能与荧光探测器联合使用同时或顺序收集暗视野照明散射信息。

[0301] 被一个样本架内一个样本中的物体所散射的光线(例如,一个细胞、或一个滚珠、或一种晶体)将被多角度散射,其中一个散射角度可能被测量并与从一个从光源到目标的入射光线进行比较。这种多个散射角度包含一个散射角度范围。这样一个样本架可能含有此处显示的一些结构,而且可能被设计为内部光反射提供通路。一个设计用于物体成像的物镜镜头将收集并聚焦这些反射光线,然后将该光线传送至一个探测器。这种被一个物镜镜头聚焦并对焦到一个探测器上的光线可能在该探测器上形成一个光点。在实例中,从物镜镜头传送至探测器的光线可能被一个额外的镜头对焦;这种对焦可能会减小在该探测器上形成的光点的大小。对焦到一个探测器上的光线,无论是否经过一个额外的镜头,含有该样本架内物体以多个散射角度散射出的光线。

[0302] 本申请显示的方法、系统和设备(例如样本架)可能允许探测到较其他的方法、系统和设备更小的散射角度范围,因此可以为一个样本内的标本和物体提供更清晰和更优质的图像。本申请显示的比色皿设计特点可能被用来控制入射到该样本上的入射光线的角度和强度,例如通过PIR和TIR,有效地控制被测量的散射光角度。

[0303] 由于受到许多非成像光学系统的影响限制(例如集光率,或经过该系统时光传播的延伸),到达一个探测器的光线散射角度可以比理想状态宽。例如,在一些联合使用环形光-比色皿和LEDs作为光源的情况下,照射到该样本上的光线可能以围绕主角度至少20度的角度播散。换句话说,如果该主光线以60度的角度照射到该样本上,光线束中的其他光线可能以大约50度到70度的散射角度照射到该样本上。应该理解的是,被一台物镜所收集的光散射角度锥体范围取决于该镜头的光圈数量。在这种情况下,该物镜镜头(例如40度的数值光圈)收集的光线应该是在一个大约30-70度角的锥体内。其结果是,一个大范围散射角度的散射光将到达该探测器上;例如,这样一个系统将测量由该样本散射的聚焦在一个大约60度+/-40度的大锥体范围内的所有光线。然而,如此处所示,一些应用需要对位于一个较窄散射角度内的光线进行探测,例如,位于一个非常窄的角度范围(60+/-5度)。此处所显示的申请,为了对来自这种较窄范围内的光线提供测量,一个光圈可以被放置在该物镜镜头(或与该平面相连的任何平面)的傅里叶(或后聚焦平面)内。在傅里叶平面内,该角度信息是空间编码的。因此,根据这个光圈的形状和大小,来自该样本的一定角度的光线可以被阻止到达该探测器(例如被阻断或过滤掉)。一个环形光圈将阻断或过滤掉内角(像60+/-

30度)。该结果导致的测量可以被调整到所需的角度。

[0304] 在实例中可能提供一个光圈,使光线从一个物镜镜头发出后,在接触到一个探测器之前,先经过该光圈。在实例中可能提供一个光圈,使光线从一个额外镜头(经过一个物镜镜头后)发出后,在接触到一个探测器之前,先经过该光圈。其中这样一个光圈被设计用于限制到达该探测器的光线,与缺乏类似光圈的情况相比,经过此光圈的光线将被减少至一个较少的散射角度和较小的散射角度。在实例中,这样一个光圈可能含有一个单一孔洞,例如一个圆形孔洞。在实例中,这样一个光圈可能含有一个单一环形孔洞,例如经过一个圆环形处的光线可以通过;而经过一个中央部位(例如一个圆形)的光线则不能通过。在实例中,这样一个光圈可能含有两个、或三个、或多个同心的环形孔,经过圆环形处的光线可以通过;也可能包括一个中央部位(例如一个圆形),经过此处的光线则不能通过。在实例中,这样一个光圈可能含有一个不同于一个圆形或环形的形状。

[0305] 置于一个物镜和一个探测器之间的这样一个光圈,例如位于一个额外镜头和一个探测器之间(光线在经过该额外镜头之前已经经过了一个物镜镜头),提供了对来自该样本的散射光进行精确辨别的优势,从而提高了从该样本处获得的散射光图像(例如暗视野图像)的分辨率。在光线强度可能是一个影响因素的实例中,与没有此处所示光圈的设计相比,在具有此处所示光圈的设计中,所应用的光线强度(例如,来自一个光源,或多个光源)可能要增加。

[0306] 一个系统可能包括一个样本架,具有此处所显示并描述的配置,以及光源、二向色镜片、和其他图7A中所示的元素。如图7B中所示,含有类似配置的系统(例如与图7A或此处其他说明图所示配置相似)可能包括一个样本架600、一个光源650(例如光源654或一个激发光源680、或二者兼有)、一个物镜670、一个光圈694、一个额外镜头696、和一个傅里叶镜头698。一个光圈694可能具有一个单一通路允许光线透过并到达一个探测器700。一个探测器700可能可操作性地与一个处理器(例如一个程序化处理器)710相连接。实例中,一个光圈694可能含有两个通路允许光线透过并到达一个探测器700。实例中,一个光圈694可能含有三个通路允许光线透过并到达一个探测器700。实例中,一个光圈694可能含有四个或更多通路允许光线透过并到达一个探测器700。实例中,一个光圈694内的一个通路可能含有一个圆形孔洞允许光线透过并到达一个探测器700。实例中,一个光圈694内的一个通路可能含有两个、或三个、或四个、或更多圆形孔洞允许光线透过并到达一个探测器700。实例中,一个光圈694内的一个通路可能包含一个环形结构允许光线透过并到达一个探测器700;而且可能包括一个中央部分不允许光线透过并到达一个探测器700。实例中,一个光圈694内的一个通路可能含有两个或多个环形结构(例如实例中的同心环),每个环形结构均允许光线透过并到达一个探测器700;而且这样一个光圈694可能包括一个中央部分不允许光线透过并到达一个探测器700。这样一个环形或几个环形结构可能具有一个圆形、或椭圆形、或其他环形形状。

[0307] 因此,本申请显示的系统用于成像一个样本,含有:一个样本架、一个用来对所述样本架内物体进行照明的光源、一个物镜镜头用来对来自所述样本架内物体的散射光线进行收集和聚焦,而所述的散射光线包含以多个散射角度散射的光线、一个光学光圈用来通过来自所述物镜镜头的光线、以及一个额外镜头用于将来自所述物镜镜头的光线聚焦到所述光学光圈上,而所述光学光圈被设计只允许被所述物镜镜头聚焦的一部分光线通过,而

允许通过所述光圈的所述部分光向由仅处于所述多个散射角度中一部分的散射光线组成。

[0308] 如此处所用,专有名词“落射”和“落射照明”指一个样本被单方向走形的光线照明,其方向通常是远离一个物镜或其他用于样本观察或成像的光学元素。因此,在缺乏荧光时,一个被落射照明照射的样本图像形成于来自该样本的反射光或散射光(光线从该光源走行到该样本,然后被该样本反射或散射到用于观察、成像或测量的光学元素上)。如此处所用,专有名词“透射”和“透射照明”指一个样本被单方向走形的光线照明,其方向通常是指向一个物镜或其他用于物体观察或成像的光学元素(光线从该光源发出并通过该样本,然后继续照射到用于观察、成像或测量的光学元素上)。因此,在缺乏荧光时,一个被透射照明照射的样本图像形成于经过该样本的光线或被该样本散射的光线。

[0309] 当一个光源与该物镜或其他用于物体观察或成像的光学元素位于一个样本的同一侧时,来自该光源的光线直接照射到该样本上,该样本被典型地通过落射照明进行观察或成像。然而,即使一个单一光源与该物镜或光学元素位于一个样本的同一侧时,作为此处显示的一个样本架除落射照明外也能够为一个样本提供透射照明。因此,本系统能够提供双方向照明而不需要将光源同时置于一个样本的两侧。这样一种设计非常紧凑,节省资源;而且由于该光源和其他光学元素均位于该样本架的一侧,这种设计允许无障碍地进入该样本架的一侧而不被该光学元素干扰。因此,这样一种设计提供了一个优势,能够在不干扰光学成像或测量,或者不干扰用于光学成像和测量的装置和元素的情况下,对该样本架内的一个样本和反应试剂进行加载、混合和移除。

[0310] 如图4A和4B中的图像所示,将透射照明添加到暗视野图像中很大程度地增强了图像效果,而且很大程度地提高了从该图像中所能获取的信息。此处显示的方法和系统通过落射照明和透射照明二者的结合、从一个单一方向和单一光源进行照明提供了效果大幅度提高的图像。

[0311] 如此处所示,一个样本架诸如一个比色皿600(例如图8A-8D所示)被设计为允许从一个光源进行光线内反射(PIR或TIR),这样一个比色皿600的一个分析区域608内所保留的一个样本可以被直接光线照射(落射照明;例如沿通路830走形的光线),也可以被间接的反射光线照射(透射照明;例如沿通路820或825走形的光线)。如此处所示,与光学元素670、690、700等暴露在一个比色皿600同一侧的一个光源发出的光线可能为一个样本同时提供落射照明和透射照明。

[0312] 现在参照图8A-8D,对一个进一步的实例进行描述。图8A-8D显示了一个比色皿600和该暗视野散射光源诸如但不限于图6A和6B中所示的环形光650一部分的一个横截面示意图。底座支持物620也显示在图8A-8D中。图8A-8D包括括号和箭头来指示结构或结构的一部分;例如括号标记的600表示显示在图中的整个比色皿600;括号标记的612表示该比色皿600的覆盖部分612。图8A中的箭头621到626表示的是该覆盖部分612指示部分的尺寸。应该理解的是,在一个比色皿600的不同实例中这些尺寸可能有变化,而且这些变化可能有赖于大小、应用、材料、光学波长、样本、以及与一个比色皿600的结构和使用相关的其他元素和因素。例如,在实例中,支持结构604之间的距离621可能在大约0.1毫米(mm)到1厘米(cm)之间,而且在实例中可能在大约1mm到100mm之间、或者在大约1.5mm到50mm之间、或者在大约2mm到20mm之间。在进一步的实例中,支持结构604之间的距离621可能在大约0.5mm到10mm之间,或者在大约1mm到5mm之间。在实例中,一个支持结构604的高度622可能在大约0.1mm

到100mm之间,或者可能在大约0.5mm到500mm之间、或者在大约1mm到25mm之间。在进一步的实例中,支持结构604的高度622可能在大约0.1mm到10mm之间,或者可能在大约1mm到5mm之间.同样的,在实例中,一个厚度控制区域613的高度623可能在大约0.1mm到100mm之间、或者在大约0.5mm到50mm之间、或者在大约1mm到25mm之间。在进一步实例中,一个厚度控制区域613的高度623可能在大约0.1mm到10mm之间、或者在大约1mm到5mm之间。在实例中,一个分层800的厚度624可能在大约0.01mm到10mm之间、或者在大约0.05mm到1mm之间、或者在大约0.1mm到0.5mm之间。在实例中,一个分析区域608的宽度625可能在大约0.05mm到100mm之间、或者在大约0.5mm到50mm之间、或者在大约1mm到25mm之间。在进一步实例中,一个分析区域608的宽度625可能在大约0.1mm到10mm之间、或者在大约1mm到5mm之间。在实例中,一个支持结构604的宽度626可能在大约0.1mm到100mm之间、或者在大约0.5mm到50mm之间、或者在大约1mm到25mm之间。在进一步实例中,一个支持结构604的宽度626可能在大约0.05mm到10mm之间、或者在大约0.5mm到5mm之间。

[0313] 应该理解的是,用于照明、激活、发射波长观察、以及显示在一个说明图中具有类似功能的光学成分和安排可能说明了用于其他图示实例的成分和安排,即使这些特殊成分或说明没有在各自的说明图中明确显示。例如,虽然一个环形光650或其他照明光源650没有包括在图8D中,但是在任何所示实例以及其他实例中,一个环形光650或其他照明光源650(见图8A、8B、和8C)可能被用来对该分析区域608进行照明(分析区域608显示在图8A和8B中)。作为适合于与一个比色皿600共同使用的光学成分示范,环形光成分652和654显示在图8A、8B和8D中;在实例中,可能会使用其他照明成分或其他数量的照明成分。例如,光源654可能是白光或一些光源,例如但不限于具有特定输出波长或输出范围的发光二极管(LED)或激光二极管。可选择地,该环形光源654可以是设计用来提供一种环形光的光缆(例如带有许多接头)。可选择地,该光源654可能是一种LED,具有一个特定的由该反射器控制的狭窄发散角度。通过对光源的选择以及/或者通过对反射器的设计控制源自一个环形光的发散角度可能非常令人满意。

[0314] 在非限制性示范中,一个光源654可能使用激光照明来提供一个狭窄的光线模式,在落射形式光线存在的情况下造成一个较低的透射照明背景(照明成分全部位于该样本的一侧),因为该光源:提供一个窄光点(指向该样本分析区域内);提供窄光谱宽度的光线(例如,光线的波长位于以一个特殊主要波长为中心的狭窄范围内);而且它是一个连续光源。可选择地,使用一个LED作为该照明源654也可能提供一个小的光点(例如一个在一个分析区域608内的小光点),这样也可以提供一些一个激光光源所具备的有益的特性。由于这些原因或其他原因,一个激光光源(或一个LED,提供一个小的光点))与其他照明设计相比,可以有效地降低背景信号水平。与较多的弥散光源相比,激光光源可能减少前者通常出现的散射光线,这样可能通过减少从一个相邻管道(例如从一个相邻的第二分析区域608)散射到该管道中的光线而降低一个管道内的背景光(例如一个第一分析区域608内)。这样激光光源可以造成比弥散光源照明预期更少的透射照明背景。当然透射照明的降低小于背景照明的降低是可取的,而背景光源明显下降可以造成一个更多的可区别信号。可选择地,使用一个LED作为该照射源654提供一个弥散光模式,从而增加背景照明和透射照明。当然透射照明的增加大于背景照明的增加是可取的。

[0315] 一些比色皿实例可能包括由多个单独层次粘合在一起形成的比色皿、由一种或多

种材料塑形而成的比色皿、以及/或者将反射层添加在该比色皿的不同表面上以提高单一或多种内反射(例如,增加TIR或PIR)。

[0316] 在实例中,此处所示的系统、比色皿、和光学元件可能与荧光联合使用,我们可能需要暗视野照明和这种系统和比色皿一起使用,而不是白光照明。然而,一些实例可能就是需要使用白光照明,例如,如果荧光探测不能与暗视野显微镜和(或)亮视野显微镜联合使用时。

[0317] 图8A和8B显示,在一些实例中,该设备可能在该比色皿600内有一些光学非透射性层面,例如层面800。这在一些实例中可能是非常有用的,其中该光源654是弥散性的,光线不能指向特定的位置。该层面800可以阻断没有按理想角度和(或)位置进入该比色皿600的光线。该层面800可以被设计放置在某个位置来防止照射,但是除外通过该分析区域618下方的区域进行照明。一些实例可能仅仅有一些离该分析区域608最近的特定的区域被遮盖。一些实例可能有一个以上的层面被遮盖或是非透射材料。一些实例可能在不同的方向上被遮盖或使用非透射材料,例如但不限于一个是水平向的,而另一个是垂直向或非水平向的。

[0318] 应该理解的是,在一些实例中,一个层面800可能是光学透射的。例如,图8D显示了一个实例,其中一个层面800是光学透射性的。在一些实例中,一个层面800可能含有一种光学透射材料,其反射指数与一个厚度控制区域613和(或)一个底座支持物620的反射指数不一样。在一些实例中,一个层面800可能含有一种光学透射材料,其反射指数与一个厚度控制区域613和(或)一个底座支持物620的反射指数相同。

[0319] 图8A、8B和8C中显示,一个光源位于一个比色皿600(接近光学系统652和654)的下方,并直接从底座部分606的下方提供光线。这样一个光源可能通过图8D中所示的示范更容易理解。如这些图中所示,一个光源650可能包括一个环形光654和一个环面反射器652。其他元件,包括但不限于镜头、滤光器、格栅、镜片和其他反射表面、光纤、棱镜、和其他元件可能被包括在内。一个实例中,一个光源可能含有一个激光器、或一个LED、或其他光源;而且可能含有一个光线可以将光线从这样一个光源传输至另一个位置,以及/或者直接将光线引向一个光学元件。光学系统的一个设计标准是从光源发出光线的离散或发散角度;在该光源一个给定的距离内,一个宽度为D且离散度低的光束比一个宽度为D但离散度高的光束所提供的光点小。通常情况下,首选的是一个提供低离散度光线的光源650.这种光学元件和结构可能被设计用来提供大致平行的光线,例如,大部分或全部光线沿着大致平行的线路指向该样本(例如指向一个分析区域608)。然而也有一些首选弥散或散射光线的实例,具有高离散度的一个光源650可能被使用。

[0320] 如图8C所示,适合作为此处所示设备或系统一部分的一个光学系统实例可能包括光学元件(例如,一个光源650、如图8C中所示的一个环形光654以及一个物镜670)、一个比色皿600和一个设计用来对一个成像比色皿进行保持和定位的底座支持物620。在图8C所示的实例中,一个底座支架620可能包括光学配置802,对从一个光源650发出的光线进行反射(或衍射、或改变线路)。如图8C所示,光学配置802可能含有一个微透镜阵列。应该理解的是,光学配置802可能含有任何适合的光学结构。在实例中,光学配置802可能含有微透镜、或衍射格栅、或Fresnel透镜、或凸透镜、或凹透镜、或其他可能对光线产生反射、衍射、或改变线路、或组合作用的形状和结构。在实例中,这种光学配置802可能含有与底座支架620不同的材料,和与底座支架620不同的反射指数。例如,受光学配置802影响的光线可能适合使

用此处所示的方法直接或通过反射(例如内反射)间接地指向一个分析区域608,这样对一个分析区域608内的一个样本既提供落射照明又提供透射照明。如图8C实例所示,这个实例也可能包括一个绕过光学配置802的光路。与使用一个光学配置802通路进行成像相比,这样一个光路可能更好地适合对一个分析区域608内的一个样本进行成像。在实例中,这两种类型的光路(例如绕过光学配置802和经过光学配置802)可能同时被提供,这样可以为一个被与光源650位于一个比色皿600同侧的一个光源既进行落射照明又进行透射照明的样本的图像分析提供适合的光学条件。

[0321] 该比色皿600包括的一些结构会影响照射到比色皿和比色皿内样本的光线的路径。这种透射照明可能受到一个比色皿600内反射光(例如内反射)的影响,包括或主要通过从例如一个表面612、或其他表面或联合表面产生的部分内反射(PIR)或全内反射(TIR)。进行TIR的光线路径的其他示范显示在,例如,图8A、8B、和8D中。

[0322] 如图8D所示,实例中,作为此处所示并适合使用此处所示方法的一个设备或系统中光学系统中的一个比色皿600,可能包括一些结构会影响照射到该比色皿600内部的光线路径,例如照射一个分析区域608以及一个比色皿600中一个分析区域608内样本的光线。如图8D所示,一个层面800可能包括一些结构,可以反射、衍射、或影响、改变进入到一个分析区域608内的光线路径。这种光路的改变可能对一个分析区域608内的样本照明有影响或有提高。在图8D所示的示范中,光想从横向进入层面800;该光线路径通过该层面800的形状(以及材料特性)而发生改变,并按所需方向进入分析区域608内。例如,一个层面800的一个外表面可能是平面的(例如外表面674),或者可能是曲面的(例如外表面676)。例如,一个层面800的一个内表面可能是平面的(图8D中未显示;见图8A和8B中类似的表面;虽然图8A和8B中的层面800不是光学透射性的,但是这些表面以平面进行显示),或者可能是曲面的(例如,图8D中所示的内表面678)。实例中,这种光路的改变对一个分析区域608内的样本同时提供落射照明和透射照明是非常有效的。

[0323] 图8A、8B、8C和8D显示了一个样本架内的光线路径,提供了一个覆盖部分612内一个上表面614和(或)一个支持结构604的表面618上产生TIR和PIR的示范。一个样本架,例如一个比色皿600,可能含有一个光学透射表面,光线可能经过其中;实例中,这样一个光学透射表面可能允许光线经过而不产生明显的扭曲或强度减低。一个样本架,例如一个比色皿600,可能由光学透射材料制成,其效果是光线可能进入到该样本架内。在一个样本架至少部分由光学透射材料制成的实例中,光线可能穿透一个样本架的一个光学透射表面,而且可能在该样本架内走行。实例中,在一个样本架内走行的光线可能在一个或多个表面被反射,并沿一个样本架内的一个反射路径走行。当光线从一个位于一个样本架外面的光源透过一个样本架的光学透射表面进入到一个样本架内时,这个光线可能在该样本架内沿背离该光源的方向走行;也可能被该样本架的一个表面反射,这样该反射光在被反射之后可能沿面向该光源的方向走行。这种反射可能是PIR或TIR。

[0324] 这样,在一个比色皿600内走行的光线可能被一个表面(例如一个表面614或表面618)反射。这种反射可能对一个分析区域608内的一个样本进行间接光线照明是非常有效的;与直接照明联合使用后(光线作用在一个样本之前没有被反射),该样本可能以这种方式接受落射照明(从该光学探测元件的同侧进行照明)和透射照明(从该光学探测元件的对侧进行照明)。

[0325] 应该理解的是,光线波长、材料、表面、以及提高或增强PIR的设计可能不适合或不能有效地提高或增强TIR。应该理解的是,光线波长、材料、表面、以及提高或增强TIR的设计可能不适合或不能有效地提高或增强PIR。因此,有一些设计和结构可能对PIR和TIR其中之一有促进作用,但对另外一个则无效。在实例中,有一些设计和结构可能对PIR和TIR都有促进作用。在实例中,有一些设计和结构可能对PIR和TIR都没有促进作用。

[0326] 如图8A所示,支持结构604可能具有长方形或正方形横截面。应该理解的是,一个支持结构604可能不止具有正方形或长方形横截面;例如图8B所示,一个支持结构604可能具有一个三角形横截面;其他的横截面形状(例如圆形或半圆形、或锯齿状的、或不规则形的)可能也适用于此处所示的系统和比色皿。PIR和TIR是可调节的特性,可以根据该比色皿600的使用材料,任何涂层、覆层、或使用的覆盖物,以及该比色皿600厚度控制区域613的几何结构和(或)厚度进行选择。实例中,PIR可能是首选的,而光线、材料、以及设计结构可被选择用来增强PIR。

[0327] 实例中,TIR可能是首选的。在实例中,来自一个光源650的波长或光线的波长可能被选择用来增强TIR。在实例中,一个比色皿600的材质、厚度、表面、设计、以及其他结构可能被选择用来增强TIR。例如,厚度控制区域613的高度(从覆盖部分612的底部到层面800之间的测量)可能影响到达分析区域608被TIR反射的光线角度和强度。一个使比色皿内发生光线TIR,从而允许对一个样本进行倾角照明(从该样本上方进行照明)的比色皿600设计结构是我们所需要的,特别是针对暗视野显微镜。在一些实例中,需要将来自所述样本的TIR最大化。可选择地,在一些实例中,一个比色皿600可能被设计为仅仅从该分析区域608上方的表面提供TIR。可选择地,一些实例可能被设计为仅仅从该厚度控制区域613上方的表面(例如,图8A和8B中所示的实例,通常在分析区域608上方)提供TIR。可选择地,在一些实例中,一个比色皿600可能被设计为从该比色皿600的其他表面提供TIR;例如,来自该比色皿600其他表面的TIR光线可能被提供用于以倾角散射光线,其效果是该光线被直接反射回该分析区域608内。.

[0328] 用来构建一个比色皿600的设计和材料可能被选择和设计以便提供光线TIR。例如,在一些实例中,提供TIR或提高或增强TIR数量的设计包括,但不限于:厚度控制区域613的尺寸与TIR相兼容或可以提高TIR;一个表面614或一个表面618(例如与入射光线相比较)的角度与TIR相兼容或可以提高TIR;一个表面614或一个表面618的形状、质地或涂层与TIR相兼容或可以提高TIR;制成一个厚度控制区域613的材料的反射指数与形成一个厚度控制区域613边界的表面614的材料和空间的反射指数之间的差异与TIR相兼容或可以提高TIR;制成一个支持结构604的材料的反射指数与形成一个支持结构604边界的表面618的材料和空间的反射指数之间的差异与TIR相兼容或可以提高TIR;以及其他的设计和结构。为了增强TIR,在其内对该光线进行反射(内部的)的第一种材料应该含有一个比如果没有进行内反射光线可能经过其中的第二种材料高的指数;由于类似的第二种材料通常为空气,其反射指数接近1,所以要确保较高的反射指数并不困难。为了提高TIR,入射角度必须大于临界角度。例如,参照图8所示的实例,形成厚度控制区域613和支持结构604(例如,表面614和618的外侧部分)的材料应该具有比空气大的反射指数。一个实例中,一个层面800内需要TIR,该层面800的材料应该比厚度控制区域613材料的反射指数低,以保证在图8A、8B和8D所示的壁面上发生TIR。在另一个实例中,一个层面800的材料比厚度控制区域613材料的反

射指数高,这会在边界处(一个层面800和一个厚度控制区域613之间)产生TIR,其效果是角度和材料可能被调整,从而优化指向一个分析区域608内一个样本的透射照明光线的组成。

[0329] 在实例中,一个表面614或618可能被涂层或处理以影响或减少该表面的反射(PIR或TIR)。在实例中,一个表面614或618可能被涂层或处理以减少从该表面漏出的光线。例如,即使一个表面614或618适合于TIR,或增加TIR数量,一些光线还是可能被该表面614或618透射或反射。一种吸光涂层或材料可能被置于或应用于这种表面614或618上,或其中一部分上,以减少从一个比色皿600处漏出的漫射光数量。这样一种吸光涂层可能是,诸如,一种染料、一种墨水、一种涂料、一种表面处理剂、一种带颜色的胶带、或其他涂层或表面处理技术。在实例中,一种黑色或其他吸光固体材料可能被紧贴或紧邻一个表面614或618,以提供一个光学吸收表面。

[0330] 可选择地,一些实例中,一个比色皿600可能被设计,使得该比色皿的一部分或几个部分不提供TIR光线(或仅提供不明显的TIR数量),或不提供PIR光线(或仅提供不明显的PIR数量)。例如,一些实例中,一个比色皿600可能被设计从该支持结构604处不提供TIR或PIR光线(或仅提供不明显的TIR或PIR数量)。可选择地,一些实例中,一个比色皿600可能被设计从一个表面618处不提供TIR或PIR光线(或仅提供不明显的TIR或PIR数量)。不提供TIR或PIR光线,或仅提供不明显的TIR或PIR数量的设计包括,但不限于:厚度控制区域613的尺寸与TIR或PIR不合适或不能提高TIR或PIR;一个表面614或一个表面618(例如与入射光线相比较)的角度与TIR或PIR不合适或不能提高TIR或PIR;一个表面614或一个表面618的形状、质地或涂层与TIR或PIR不合适或不能提高TIR或PIR;制成一个厚度控制区域613的材料的反射指数与形成一个厚度控制区域613边界的表面614的材料和空间的反射指数之间的差异与TIR或PIR不合适或不能提高TIR或PIR;制成一个支持结构604的材料的反射指数与形成一个支持结构604边界的表面618的材料和空间的反射指数之间的差异与TIR或PIR不合适或不能提高TIR;以及其他结构和设计。

[0331] 可选择地,在一些实例中,一种反射性材料可能被置于或贴附于一个表面614和(或)一个表面618上。这样一种反射性材料可能是,诸如一种金属,例如银、或仅、或铝;可能是一种电介质,例如氟化镁或者氟化钙、或其他氧化盐或金属;或其他反射性材料。典型地,这样一种反射涂层可能非常薄(例如可能小于0.1微米,或可能最大为100微米厚)。可选择地,一种反射性材料(例如一种反射性涂层)可能仅仅被置于或贴附于表面614上。可选择地,一种反射性材料可能仅仅被置于或贴附于表面618上。可选择地,表面618可能被处理成黑色从而具有吸光性。在另一个实例中,一个表面614可能被处理成黑色从而具有吸光性。一些实例可能选择该厚度控制区域613的宽度宽于该分析区域608。对于一些实用激光照明的实例,该层面800可能被移除或称为光透射性,因为该激光照明已经给予了足够的聚焦,从而在分析区域618之间不需要黑暗区域。

[0332] 在非限制性示范中,使用PIR和(或)TIR也可以使光线沿路径820从附近区域直接行走到达该分析区域608内。如图8A、8B和8D所示,沿路径820行走的光线被反射后指向分析区域608;而沿路径825行走的光线在比色皿600内行走时会经历多个反射,最终到达分析区域608。如图8B所示,沿路径820行走的光线在比色皿600内行走时会经历多个反射,最终到达分析区域608。如图8B所示,这种反射可能是PIR,或者可能是TIR。用传统属于讲,图8A中由沿路径820和825行走光线所示的照明,以及图8B中由沿路径820行走光线所示的照明是透

射照明。图8A和8B中由沿路径830走行光线所示的照明显示了直接来自该环形光的光线而不是通过TIR的方法:这是落射照明。将来自该样本下方(或只位于该样本的一侧)一个光源的两种类型光成分联合使用使其功能较只提供其中之一光成分作为光源时有提高。这对于暗视野显微技术特别有用。

[0333] 图8A-8D所示实例的一个非限制性应用示范是使用暗视野照明测量该样本中细胞的散射特性。暗视野显微技术是一种确定的方法,主要作为一种对比-增强技术被使用。在暗视野显微技术中,由于只对该样本散射或反射的光线进行成像,所以整个成像背景是完全黑暗的。高质量的暗视野细微技术不会使用流式细胞仪中传统的“侧向散射”参数对细胞的散射特性进行测量。

[0334] 从硬件上看,用于暗视野显微技术的照明需要斜角照明,例如所有从该照明光源发出的光线都应该首先接触样本然后进入物镜。在非限制性示范中,照明波长不应该激活已经存在于该样本中的任何其他的荧光团。可选择地,这种照明允许使用高数值孔径(NA)的镜头进行成像。在非限制性示范中,与光学显微镜相关的传统镜头光圈大小,NA值可能至少是0.3。可选择地,NA值至少是0.4。可选择地,NA值至少是0.5。可选择地,一些实例可能使用油浸物镜镜头来获得一个理想的NA值,特别是当镜头光圈数值被限制在一个特定水平以下时。

[0335] 用于暗视野照明的传统方法是使用透射照明,其中样本位于该成像镜头和暗视野光源之间。因此,在这种传统安排下,该探测器与照明成分不是在该样本的同一侧。传统的落射照明方法(成像镜头/物镜和该光源位于该样本的同侧)需要使用特殊制造的物镜,而且典型的是不允许使用该NA值物镜,这样就限制了整个系统的功能。

[0336] 相反,至少有一些此处描述的暗视野照明系统实例具有下列属性。在硬件方面,图8A-8D中实例的示意图是“落射”,其中用于暗视野照明的环形光与物镜位于该样本的同侧。这种设计从系统视角出发是非常需要的,尽管如此,对侧带有光源的其他实例也可能被单独使用或与此处所描述的实例联合使用。在一个非限制性示范中,该环形光被设计为其LED和(或)激光光源654全部位于同一个平面并且指向同一个方位(光源位于同一个水平平面,光线指向上方)。一些实例中光线可能位于同一个平面,但指示方向是不平行的,例如但不限于一个锥体方式。一些实例中光线可能位于不同的平面,但指示方向是一致的。一些实例中光线可能位于不同平面,且指示方向也是不平行的,例如但不限于一个锥体方式。一些实例中,该光线被一个环形镜面652所反射疑惑的对该样本的倾角照明。

[0337] 除了该环形光以及该环形反射器的光学特性之外,图8A-8D实例中所示的比色皿600的光学特性也明显地影响暗视野照明。在这个实例中,该细胞计数仪比色皿600被设计为来自该环形光650的光线直接落在该样本上;但是除此以外,光线也会经该比色皿的一些结构“反射”到该样本上,以效仿“透射”照明。这种反射可以是TIR方式以及/或者真正的反射方式。

[0338] 注意的是,任何透射照明设计都允许我们对一个样本的前向散射光线进行测量;而一个落射照明设计只允许我们对改样本的后向散射光线进行测量。前向散射光线在强度上通常比后向散射光线高出两个数量级。因此,使用透射照明允许我们使用非常低的照明强度,减少对该样本有害的副作用。

[0339] 如图8A中所示的实例,该环形光650(或其他照明源)和比色皿600提供了一个可被

调节的系统,其中透射和落射照明的强度可以被调整以提高其性能超过传统的透射照明。同样地,图8B所示实例中,该环形光650(或其他照明源)和比色皿600提供了一个可被调节的系统,这样透射和落射照明的强度可以被调整以提高其性能超过传统的透射照明。这种调试可以通过所选材料的优势(例如其光学特性)以及比色皿的几何设计来完成,以控制全内反射的角度和延伸。

[0340] 如图8C所示,结构802可能改变入射光的路径,可被用来增强透射照明和落射照明。如图8D所示,表面674、676、和678的形状和设计可能改变入射光的路径(例如横向照明),而且可被用来提供或增强透射照明和(或)落射照明。

[0341] 图8E提供了一个示意图,代表了将一个比色皿600从一个样本准备位置输送至一个光学探测器D附近的一个样本观察位置。如图中所标明的,一个样本架600可能被从一个位置移动到一个探测器D附近的位置或移动到一个探测器D上。一个探测器D可能包括一个载物台用来接收、保留、以及定位一个比色皿600。样本可能通过入口602添加至该样本架中(例如在图8E所示示范中有6个入口602),而且可能被置于一个位置以便在图8E所示比色皿600的一个分析区域608(未显示,作为一个支持结构604的内表面)内进行光学观察和测量。保留在一个分析区域608内的样本可能被照明,并且可能被一个探测器D检测。在实例中,一个探测器D可能被设计进行高质量的观察或成像。

[0342] 图8E中所示的一个探测器D可能含有一个细胞计数单元或细胞计数模块;或者其本身就是一个细胞计数单元或细胞计数模块的一部分。这样一个细胞计数单元或细胞计数模块可能含有一个独立的单元或模块用于样本分析。在实例中,其他分析功能和设备可能包括在一个探测器D内;或者与一个探测器D封装在一起;或者可能被设计用来与一个探测器D联合使用。在实例中,此处所描述的用于样本分析的系统可能含有这样一个细胞计数单元或细胞计数模块,例如含有一个用来对一个比色皿600内的一个样本进行分析的探测器D。在实例中,此处所描述的用于样本分析的系统可能含有这样一个细胞计数单元或细胞计数模块;而且除了一个用来对一个比色皿600内的一个样本进行分析的探测器D外,还含有可提供其他分析功能和设备的其他单元或模块。在这种系统中,这种其他单元或模块可能与一个探测器D封装在一起;或者可能被设计用来与一个探测器D联合使用。这种其他的分析功能和设备可能被应用于一个样本;例如,这种分析功能和设备可能被用来对存在于一个比色皿600内的一个样本或样本的一个部分进行分析。在实例中,这种分析功能和设备可能被用来对存在于一个比色皿600内的该样本的一个不同部分进行分析(例如一个样本可能被分装为两份或三份,其中一个分装样本被置于一个比色皿600内进行细胞计数分析;而一个个或多个分装样本则被与一个细胞计数单元或细胞计数模块封装在一起、或位于其附近、或与其联合运作的其他设备进行分析)。因此,例如,独立于这样一个细胞计数模块执行的分析之外,一个样本(或样本的一部分)可能在一个化学分析单元、或一个核酸分析单元、或一个蛋白分析单元(使用抗体或其他特异性结合分子分析一个样本的单元)、或其他类似单元或单元联合内进行测量和(或)分析。这种分析可能包括对一个样本内所表达的小分子和元素进行分析(例如通过一个普通的化学单元);对一个样本内所表达的核酸分子进行分析(例如通过一个核酸单元);对一个样本内所表达的蛋白和(或)抗体-反应性抗原进行分析(例如通过一个酶联免疫吸附测定(ELISA)单元);或几种分析的联合。另外,如图8E所示以及此处所讨论的系统可能包括一个控制器,对一个或多个单元或模块内的操作进行控制

和计划。

[0343] 图8E提供了系统的进一步详细的示意说明,包括一个传送机制用来将一个比色皿从一个样本准备位置输送到一个光学探测器D附近的一个样本观察位置。一个系统,例如图8F所示的一个系统实例,可能包括多个样本分析模块,这些模块可能被设计为独立进行工作;或者在一些实例中被设计为互相合作。图8F所示的系统包括一个单一的带有一个探测器D的细胞计数单元707;在实例中,在701、702、703、704、705和706任何一个或所有分析单元中进行分析的样本(或样本的一部分)都可能被输送至细胞计数模块707处通过探测器D进行观察和测量。独立于细胞计数模块707所执行的分析之外,一个样本(或样本的一部分)可能在一个化学分析单元715内进行测量和(或)分析。这种在一个化学分析单元715内进行的分析可能包括对一个样本内所表达的小分子和元素进行分析(例如通过一个普通的化学单元);对一个样本内所表达的核酸分子进行分析(例如通过一个核酸单元);对一个样本内所表达的蛋白和(或)抗体-反应性抗原进行分析(例如通过一个酶联免疫吸附测定(ELISA)单元);或几种分析的联合。

[0344] 如图8F所示的系统可能包括一个控制器,对一个或多个模块701-707内的操作进行控制和计划。样本可能被加载至样本架其他元件上,并在图8E所示的示范系统中进行分析。这种系统,或这种系统中的模块,包括例如,样本处理系统708、用于获取、移动和分装样本的移液管,包括抽吸性移液管711和容积式移液管712、离心机713、分光光度计714、化学分析单元715、光电倍增管(PMTs)716、用于盛接一次性用品和工具,例如移液管吸头和其他吸头的暗盒717、以及其他元件。模块和其他元件可能被一个支架709或其他支持结构支撑。样本、一次性用品、工具、以及其他元素可能在一个模块内被传送,而且可能在模块之间(例如在一个模块701-706和一个细胞计数模块707之间)进行传送。

[0345] 图8E和8F显示,该样本架诸如比色皿600可能从一个位置(例如可能在此处进行样本处理)被传送至另一个位置(例如图8E和8F所示的探测器D)。该比色皿600并不向探测器D中或探测器D上释放液体,而是一种自含单元,将所有的样本保留其中。位于该探测器D上或该探测器D附近可能有一个或多个、两个或多个、三个或多个位置,其上含有该比色皿600或其他样本架可以与之衔接的透明表面,为样本信号的探测提供一个透明界面。图8F所示元件以及关于这些元件及其应用的进一步显示可在美国专利申请序列号13/769,779中找到,并以参考形式完全纳入本文。

[0346] 暗视野

[0347] 此处至少一些实例包括一个暗视野照明源和比色皿。该比色皿600的有关结构与该比色皿尺寸、光学材料以及几何结构的设计有关。该比色皿通过反射(例如,通过TIR和(或)PIR)来增加暗视野照明的程度。在一个实例中,该系统可能对一个样本同时使用透射暗视野照明和落射暗视野照明。

[0348] 在此处所示的一些实例中,该比色皿600与该光源650联合使用时可以使透射照明和落射照明在该落射结构(例如该光源与物镜位于样本的同侧)中使用一种物理系统。最基本的比色皿被设计用于盛接和观察生物学样本。在实例中,该覆盖部分612可能具有一种特殊的设计。我们知道不同的材料可能具有不同的反射指数;具有一种理想反射指数的材料可能被选择用于制造一个覆盖部分612、或者一个底座支架620、或者一个比色皿600及其相关元件和组成部分的其他元素和成分。例如在一些实例中,一个覆盖部分612或一个底座支

架620可能由玻璃制成。例如,在一些实例中,一个覆盖部分612或一个底座支架620可能由石英制成。例如在一些实例中,一个覆盖部分612或一个基底支持部分620可能由一种丙烯酸塑料、或一种无色聚合物(例如,一种环烯共聚物、一种聚碳酸酯、一种聚苯乙烯,一种聚乙烯,一种聚氨酯,一种聚氯乙烯、或其他多聚物或复合多聚物)、或其他透明材料制成。

[0349] 我们可以设计该上方覆盖部分612的材料使其有助于照明和图像收集。在实例中,为了照明一个样本,该光源650可能是一个环形光650(例如可能是环形)可能具有按一种间断或连续方式放置的光源654,而且可能使用一种曲面反射器652将光线指向该样本。

[0350] 在暗视野显微技术中,通过倾斜光线对该样本进行照明。在暗视野显微技术中,进入显微镜光学系统的光线被该样本轻度散射,从而允许对细胞、粒子和样本中其他物质和结构的散射特性进行测量。如果样本中不存在细胞、粒子、结构或其他物质,该暗视野图像是黑色的。

[0351] 在非限制性示范中,该反射器652和该环形光650的LED654被设计用来反射光线,以至于光线的一小部分直接返回到物镜作为非特异性背景。该系统被设计通过在比色皿表面发生的TIR将光线直接返回到该分析区域608内。从一个表面反射的光线,无论是TIR还是其他类型的反射,被指向用于该分析区域608内一个样本的照明。分析区域608样本内的细胞、粒子和结构接受直接来自细胞下方环形光的光线(例如,通过落射照明)。而且如此处所示,来自上表面(被反射的)的光线也被指向该分析区域608(例如通过透射照明)。

[0352] 因此,根据此处所示的系统和方法,与该环形光650位于同一个位置,光线可能从一个单一环形光源发出从两个方向(落射照明和透射照明)指向分析区域608进行照明。在实例中这种照明都是倾角照明。我们可以通过对该比色皿的设计以及该比色皿使用的材料来控制这两种光成分的相对强弱。

[0353] 这种暗视野照明与传统的暗视野是不同的。例如,在此处所示的实例中,暗视野照明由一个比色皿表面TIR所反射的光线提供。作为非限制性示范,在一个实例中,此处所显示的一个系统可能在该覆盖部分612特定表面的背侧使用一种反射性层面来反射所有的光线。作为非限制性示范,在一个实例中,此处所显示的一个系统可能在一个比色皿600特定表面的背侧使用一种反射性层面来反射所有的光线。一些实例可能使用一种全部或选择性的反射背景。

[0354] 例如,在实例中,需要以一种斜角射出光线以保持照明暗视野。在一些实例中,光源654可能以一种斜角射出光线,因此可能不需要或者可能不使用该反射器652。该反射器652可能提高该光源654的品质,因为所有的光线都位于同一个平面内,而且以同一个方向射出。可选择地,该成角光源654也可能替代一个反射器使用,或者与一个反射器联合使用。

[0355] 应该理解的是,即使照明中透射照明成分的光线强度可能较相应的落射照明强度弱,诸如10倍,但该样本内细胞或其他物质中源于透射照明的散射光强度可能较来自落射照明的散射强度强200倍。就是说,来自一个数量落射照明的散射强度与来自同一个数量透射照明的散射强度相比,该样本内细胞或其他物质中源于透射照明的散射光强度可能较来自落射照明的散射强度强200倍。因此,一个很小的透射照明量可以明显增强细胞的光散射。

[0356] 仅使用落射照明时,一个物镜收集的光线仅仅是由一个样本反射的光线。然而,衍射是散射的一个重要成分,而且透射照明的使用可以提供一定数量的衍射光(例如,由样本

衍射的光线)。尽管如此,从落射照明采集的光线不包括该样本的衍射光线(没有光线在衍射后反射回光源处)。因此,当使用透射照明和落射照明时,一个物镜收集的光线中有反射、折射和衍射的成分。传统的方法是全部使用透射暗视野照明,优于需要将光学系统组成部分放置在该样本的两侧,因此设计上空间占有量非常明显。与之相反,此处所示的系统和方法只单独使用落射照明光学元件即可以同时提供落射照明和透射照明。此处所示实例可能在获得落射照明设计的空间节省效果同时,为该样本既提供落射照明的好处又提供透射照明的好处。

[0357] 对该样本架和光源一起进行设计可以使一个落射照明结构提高样本的透射照明数量,特别是可能提供一致的透射照明。一些实例可能使用反光平面。一些实例使用TIR,它可以被调节产生理想的透射照明,包括统一的并以一定倾斜角度进入该分析区域608的透射照明,用于该样本的暗视野照明。一个比色皿600可能被设计仅仅从一个落射照明结构内的光源通过使用反射,例如使用TIR和(或)PIR为一个分析区域608提供透射照明。在一个非限制性示范中,一个较厚的覆盖部分612允许光线经过TIR(或PIR;或二者兼有)反射回该目标区域608内。而且,此处所示的系统和方法不仅仅提供源自TIR(或PIR;或二者兼有)反回一个分析区域608内的光线,而且这种返回到一个分析区域608内的光线时统一的。图8A、8B和8D中的实例含有以一定角度存在的特定表面、特定的黑色表面和特定的反射表面,以至于统一返回一个分析区域608的光线可以为一个分析区域内的一个样本有效地提供统一的透射照明。可选择地,我们可以将一个完全反射表面放在上面(例如但不限于图7A和7B中所示的一个平面覆盖部分612,或者可选择地覆盖在图8A、8B和8C中所示区域613上方所选择的区域)。与之相反,在传统硬件中走行的光线可能会经过一些反射,包括可能是一些TIR(或PIR,或二者兼有),但是该光线可能不会返回到该区域608内。

[0358] 在非限制性示范中,此处所示实例采用的是一种成像平台,而不是使用诸如可能含有16个激光光源的高复杂性、高成本系统,目前的实例发展了一种更为整合的探测系统对一个样本内的不同细胞和类型进行成像和识别。

[0359] 在非限制性示范中,将这些所有不同类型的信息结合在一起对获得理想的分析目标是非常有用和有效的。中额可能包括定量测量和(或)与定量测量相连接的定性测量,或者是与定量测量相连接的成像。此处显示的方法和系统提供了不同的荧光通道,其中每一个通道可能含有一个或多个针对性的特异性分子标志(例如定量信息)。此处显示的方法和系统可能包括显微镜,或者可能与显微镜一起使用,此处的实例可能具有观察和测量源于细胞内部染色背景的能力(例如其是否位于细胞浆内、是聚集在表面上、细胞核内还是另外一些位置),可以链接到已生成的用于定量测量的图像和(或)定性信息。在这个模式中,如果该定量测量结果触发了警报,或满足了表明需要进行进一步分析的阈值,那么与产生该定量分析结果的原始图像相链接则为进一步的分析提供了可能性。此处的实例可以获取在一个分析区域608内一个样本中的一个细胞内产生染色的背景图像数据和信息。这种图像和信息允许对染色是否产生在细胞内进行确定,例如在细胞浆内、在细胞核内、在细胞膜内、还是其他细胞器或细胞位置内。

[0360] 在此处显示的方法和系统的一些实例中,细胞联合定量的散射特性、细胞的形状和(或)细胞的大小可能被观查和测量,而且可能被用来确认和(或)描绘一个样本。在此处显示的方法和系统的一些实例中,一个样本或样本一部分的物理特性、光学特性、以及生

物/生化特性可能在同一设备同一时间内被观察和被测量。所有这些测量和观察都可以与一个程序化的处理器或其他处理系统相结合,与各种类型的信息相链接而达到检测的目的(例如达到一个临床检测的目的)。

[0361] 尽管传统的设备可能适合一种或另一种类型的观察或测量,但是他们不适合于同时来自同一个光源的落射照明和透射照明;而且在这种不同类型信息之间也没有链接。例如,在此处显示的一些实例中,产生定量测量值的图像信息是可获取的,该系统和方法可能被用于组织形态学测量。可选择地,该系统可以被应用于Pap涂片,这更多地与传统的细胞学相类似。它可以被延伸至任何使用传统显微技术完成的检查。在尿液中,至少有一些目前的实例可以观察并分析其中的结晶,而不仅仅是细胞。我们可以观察来自尿液样本的无机盐和化学物质结晶,这些结晶可以在一部分图形中产生一定的定量读数。除此以外,我们可以观察和分析存在于血液中的细胞和粒子,包括血细胞不同类型和群体的分析,例如但不限于图1A中的可能所见,其中不同区域的数据被圈划出来。一定数据区域的图像信息可能被获取以进一步分析潜在的、用来绘制图形或图表测量值的细胞图像。

[0362] 此处的一些实例可以将该成像配置与该病理学配置结合在一起。例如,组织准备可能在设计含有此处所示光学元件的一个设备或系统内进行(一个系统可能是,或可能包括,诸如对一个样本进行光学和其他分析的一个或多个模块),而且这种所准备的材料可以在该平台内被成像。然后该图像或分析可能被发送至服务器进行图像分析、诊断、或执行数字病理学有效地帮助一位病理医生分析一个样本。

[0363] 此处所示的方法、系统和设备实例,包括例如图8C和8D所示的系统和设备,提供了一个广范围的细胞计数能力,它可能被一同应用于对一个样本的分析。这种细胞计数能力包括细胞计数性成像,例如被典型地限制在显微镜内;这种生物样本的显微成像和成像分析由此处所示的设备和系统提供。除此之外,此处所示的设备和系统被设计提供生物学样本的分光光度计分析。这种图像分析包括暗视野、亮视野和其他的图像分析。此处显示了从同一个光源同时应用落射照明和透射照明的新型和改良的方法,它允许我们对血液样本进行更敏感和准确的成像。与此处所示的方法一起使用,可能会获得关于RBCs、WBCs和这些亚类细胞的分别测量值。此处所示的图像和分光光度计分析可能被用于鉴别和定量分析WBCs的不同亚群,有助于一份血液样本的描述和许多临床情况的诊断。在此显示的设备和系统可能被用于提供临床报告,其中包括普通化学分析信息、基于核酸的分析信息、基于抗体(或蛋白、或抗原决定基)的分析信息、和分光光度计分析信息,而且还提供所分析细胞和样本的图像。产生这些信息以及提供这种报告,包括图像和其他临床信息的能力被认为能够提供新型的以及出人意料的功能和结果。

[0364] 除此以外,这种信息和这些报告可能在一个很短的时间内生成(例如不到一小时、或不到50分钟、或不到40分钟、或不到30分钟、或其他更短的时间)。除此以外,这种信息和这些报告可能从小容量样本中生成,例如小容量血液或尿液样本。这种小容量样本的大小可能不多于大约500 μ L、或者小于大约250 μ L、或者小于大约150 μ L、或者小于大约100 μ L、或者小于大约75 μ L、或者小于大约50 μ L、或者小于大约40 μ L、或者小于大约20 μ L、或者小于大约10 μ L、或者其他的小容量。一些实例中,其中一个样本是一个血液样本,这种小容量样本可能采集于一次指尖采血。典型地,一次指尖采血只能采集一个小容量血液样本(例如该血液容量可能是大约250 μ L或以下、或者大约200 μ L或以下、或者大约150 μ L或以下、或者大约

100 μ L或以下、或者大约50 μ L或以下、或者大约25 μ L或以下、或者其他小容量)。

[0365] 如此处所示,包括细胞计数信息和图像(包括图像、散射绘图和其他光学和成像信息)、还包括普通化学分析信息、基于核酸的分析信息、基于抗体(或蛋白、或抗原决定基)的分析信息、和分光光度计分析信息的临床报告,被认为可以提供广泛的和丰富的临床信息,有助于许多临床情况的诊断和描述,并提供专业技术上的优势。这种报告可能在一个定点服务(定点医疗)站被迅速准备,并且可能被迅速地传递(例如,通过无线电子传输、陆上通讯线、光纤或其他交流链接)给一位病理医生或其他临床专业人员进行分析和解释。这种专家分析和解释作为快速反馈反过来也可能被迅速传递回(例如,通过无线电子传输、陆上通讯线、光纤或其他交流链接)照顾该病患的临床医生和(或)定点服务(定点医疗)站。根据样本提供的信息和分析结果,这种快速反馈,如果需要的话,能够提供及时的处理,或者防止不必要的处理;该样本可能在一个定点服务站或定点医疗站被获取、被分析、或二者兼有。这种快速分析、报告和反馈提供了较耗时方法更多的好处;而且通过允许及时的处理以及防止不必要的处理,还可能提供了更有效、更高效以及更便宜的临床服务和处理。此处所示设备、系统和方法可能避免的这种耗时较多的方法包括但不限于:由于患者需要到一个远离患者家和受委托照顾患者的临床医生的实验室或诊所所带来的延迟和不便;由于将一份样本从一个采集地点传送至一个样本分析地点所带来的延迟和可能的样本降解;由于将这种分析结果传输给一个病例医生或其他专家所带来的延迟;将一位专家的观点传递给该患者的临床医生所带来的延迟;一位专家的观点传递给该临床医生后该临床医生对该患者的诊断和处理过程所带来的延迟。通过使用此处所示的方法、设备和系统,这些延迟、不变以及可能的样本降解可能被减少或消除。

[0366] 图6A、6B、7、8A、8B、8C、8D和其他示意图以及此处所示的系统和设备实例,可能提供细胞计数的功能,包括以紧凑格式与一种或多种其他样本分析功能一起使用。此处所示新型设备和系统的发明申请,包括此处所示设备和系统中的新型细胞计数功能以及其他样本分析功能。例如,此处所示设备和系统的发明申请提供此处所示的新型细胞计数功能与通过一个普通的化学单元进行样本分析的设备和系统联合使用;与通过一个核酸分析单元进行样本分析的设备和系统联合使用;与通过抗体检测(例如ELISA)单元进行样本分析的设备和系统联合使用;或几种分析单元的联合。作为此处所显示的一个样本处理设备可能被设计在一个样本上执行多种检测。这样一个样本可能是一份小容量样本。

[0367] 一些实例中,所有样本检测操作和步骤都在一个单一样本上进行。一些实例中,所有样本检测的操作和步骤都由一个单一设备或系统来执行,而且可能是在一个封装的单一设备内进行。这种包括细胞计数仪,特别是在一个单一单元内提供图像分析以及分光光度计或其他光学分析的细胞计数的系统和设备被认为是新型的和意想不到的。提供包括细胞计数仪,特别是在一个单一单元内提供图像分析以及分光光度计或其他光学分析的细胞计数的系统和设备被认为是提供了一种以往技术不可能提供的优势。

[0368] 图6A、6B、7、8A、8B、8C、8D和其他示意图以及此处所示的系统和设备实例,以一种可移动形式提供细胞计数的功能,而这种设备和系统可能被封装在一个足够小的密闭结构内以方便从一个位置传送到另一个位置。例如,这种设备和系统可能在一个定点医疗点(例如,一个医生办公室、一个诊所、一所医院、一个临床实验室、或其他地点)被使用以随时进行传输。例如,这种设备和系统可能在一个定点服务点(除上面所述的这种定点医疗点以

外,还包括诸如一所药店、一个超市、或其他零售或服务站点)被使用以随时进行传输。一个定点服务站点可能包括,例如,一位患者可能接受一项服务的任何地点(例如检测、监测、处理、诊断、指导、样本采集、身份确认、医疗服务、非医疗服务等等)。定点服务地点包括,但不限于,一个实验对象的家里、一个实验对象的工作地点、一个医疗服务提供人员的地点(例如医生)、医院、急诊室、手术室、诊所、医疗服务专业人员的办公室、实验室、零售店【例如药店(例如零售药店、临床药店、医院药店)、药房、超市、食品店等等】、交通车辆(例如轿车、船、卡车、公共汽车、飞机、摩托车、救护车、活动专门设备车、消防车、急救车、执法车辆、警车、或用于将一个实验对象从一个地点运送到另一个地点的其他车辆等等)、旅游医疗服务单元、移动单元、学校、育儿中心、安检地点、比赛场所、医疗辅助生活住宅、政府办公室、写字楼、帐篷、体液样本获取站点(例如采血中心)、位于或临近一个实验对象可能希望进入的一个地点的入口处、位于或临近一个研究对象可能希望使用的一个设备的地点(例如一台计算机所处的地点,如果该研究对象希望使用这台计算机)、一个样本处理设备接收一个样本的地点、或者此文其他地方描述的任何其他定点服务地点。

[0369] 深奥的细胞计数技术和特殊的细胞计数标记物

[0370] 许多传统的高级或深奥的细胞计数检验需要一个传统的系统来测量细胞上一种大量的标记物;通常这些标记物被同时测量。该领域通常的检测方法已经与高功能仪器紧密联系在一起,包括诸如6个或更多个激光光源以及18个不同的PMT管同时对所有这些标记物进行测量。但是,在许多临床情况下,并不需要同时测量多个标记物。例如,在许多临床需求中,一个感兴趣的问题是看一看多少细胞对一种标记物是阳性表达;或者多少细胞对两种或三种联合标记物是阳性表达;或者其他类似的几种联合标记物的表达。此处的一些实例提供了多种标记物联合染色计划,其中一个可能含有,诸如一套10种标记物、一个可以是一套3-4种或5-6种标记物的联合;甚至可以是将两种标记物用同一种颜色联合使用。本系统中的一些实例还可以对该复杂图像和信息进行解密,以确定哪种信号源自哪种标记物。这种情况允许本系统中的一些实例减少其硬件需求,也就是光源的数量、用于样本分析的通道数量,并进行其他的简化和增效。因此,使用一种子集数量的标记物、或在预定配对联合使用中采用非同时方法对标记物进行应用和测量对进行复杂的细胞计数检测可以是非常有用的。例如,一些标记物可能被认为是“选通”标识;这种标记物被首先测量,而且如果这种初始测量结果呈阴性(例如,一份样本中该标记物不表达、或仅有小量表达),那么可能不需要对其他后续标记物进行测量。在实例中,这种非同时的方法和系统可能会降低进行分析时所需要的该样本容量,而且可能会减少分析时所需要的标记物数量(例如,一种后续标记物只典型地用于所分析样本的一小部分中)。

[0371] 应该理解的是使用成像对样本进行细胞计数分析,例如血液样本或尿液样本,能够使我们获得一个真实的细胞数量,而且可能比传统的不包括这种测量方法的细胞计数方法更准确。样本的成像,包括一个样本内的细胞(或粒子、或某种结构)成像真的可以比其他方法,例如传统的细胞计数方法,更准确。例如,传统的流式细胞计数选通不允许进行真正的计数。流式细胞计数中的选通是主观的,因此在系统与系统之间可以有很大的变化。而且,传统的流式细胞计数方法不提供一个样本内的细胞图像。

[0372] 此处的一些实例也可能进行选通,但是该选通在算法上是基于不同因素的,包括但不限于患者的健康状况。分类方法是按患者群体进行修订的,知道他们是健康人群还是

患病人群。此处的一些实例可以对一个异常患者进行标记，并用于复查。自学式选通可以根据关于患者健康状况所传递的信息来确定是否需要不同的选通。因此，此处所示一些实例对于该样本的选通是可能是由一台程序化处理器通过计算法则来完成的，而且根据患者的健康状况，该选通会有所改变。

[0373] 在用于成像的方法和系统实例中，我们可能希望将所需硬件的数量和复杂性最小化，而且我们可能希望尽可能地重复使用该样本的一部分或全部，以减小需要获取的样本量。因此，我们能够从一份样本的图像中获取的功能越多，我们从一份样本中最大程度地获取信息的能力就越好，而且有可能是从更小的样本容量中获得。因此，我们从最少量图像中获得区别不同细胞类型的信息越多，我们就越可能减少需要获取的样本容量。

[0374] 可选择地，在一个非限制性示范中，用来在该显微镜载物台内使用的该比色皿可以被设计为以下形式（参照图7、8A和8B中所示的实例和元件）。一个中间的管道层含有一层很薄的塑料膜核心800，双侧带有压敏粘结剂（psa）。一侧粘附在透光层606上，另一侧粘附在覆盖部分612塑形的顶层上。该核心是一个压制而成的薄膜，颜色是黑色，主要是出于防止光线散射以及防止不同液体管道之间的光学干扰等光学原因。该核心薄膜的厚度首选沿其长和宽是一致的，而且可能由诸如一种黑色PET或黑色HDPE（聚乙烯）压制的薄膜制成。位于双侧的psa亚层倾向于尽可能地薄，以保持其整个液体管道的紧密和一致（例如，分析区域608）；但是它又需要足够厚，以便在该液体管道周围提供一个良好的液封效果。在实例中，有助于这种样本架的psa粘合剂实质上是丙烯酸塑料，它对低表面能塑料有很高的粘附强度。在其中间层面上的液体管道、开口和其他成线结构可能使用激光切割或冲压裁剪操作制成。

[0375] 这个实例还显示，磁性元素，例如但不限于磁球或磁盘、或者可能被一块磁铁吸附住的金属球或金属盘，可能被组合进该比色皿内。例如，这种磁性元素可能包括在一个样本架或比色皿塑形顶层内，或者组成一个样本架或比色皿塑形顶层。磁性元素可以被用来简化用于传送该比色皿的硬件。例如，该处理系统可以与该比色皿内的磁性结构相衔接，以对其进行传送而不必具有一个额外的样本处理设备。

[0376] 在本发明已经参考一定的特殊实例被描述和说明的同时，那些本领域的专业技术人员会领悟到，在不背离本发明的实质和范围的情况下，可能会进行各种变通、改变、修饰、替代、删除、或附加步骤和操作规程。例如，不停地材料可能被用来建立该比色皿内不同的反射表面，或在该光学系统内沿一条光路存在的其他表面。可选择地，该反射表面被选择，以使该反射仅仅是弥散性的。可选择地，该反射表面被选择，以使该反射仅仅是镜面性的。一些实例可能使用一种Coumans, F.A.W., van der Pol, E., & Terstappen, L.W.M.M. (2012) 所规定的平顶照明设计，平顶照明通过双微透镜阵列出现在落射荧光显微技术中。细胞计数仪, 81A:324-331. doi:10.1002/cyto.a.22029, 因各种目的完全以引用的方式并入本文中。

[0377] 另外，浓度、数量以及其他数字数据都可以以一个范围格式显示。应该理解的是，这种范围格式仅仅出于方便和简洁的目的被使用，其结果应该被灵活地解释，不仅包括明确列出的范围界限数值，还要包括所有单个数值或包含在该范围内的子范围数值，就像每一个数值和子范围被明确列出一样。例如，一个大约1nm到20nm的尺寸范围应该被解释为不但包括明确列出的1nm和20nm这个界限，还应该包括单独的尺寸例如2nm、3nm、4nm，以及子

范围例如10nm到50nm、20nm到100nm,以及其他范围。

[0378] 这里讨论或引用的出版物仅作为本申请提交日期前的发现被提供。本条规定并不被视为承认本发明在利用以往发明价值上不得早于类似出版物。进一步讲,出版物所提供的日期可能与真正出版日期有差异,这可能需要进行独立确认。这里所提及的所有出版物都是以引用的方式并入本文中,用于显示和描述与被引用出版物有关的结构和(或)方法。以下申请因各种目的也以引用的方式并入本文中。美国专利号7,888,125;美国专利号8,007,999;美国专利号8,088,593;美国专利8,088,593;美国专利8,380,541;美国专利发行号US20120309636;PCT申请号PCT/US2012/057155;PCT申请号PCT/US2011/53188;PCT申请号PCT/US11/53189;美国专利申请序列号13/769,779;美国专利申请13/244,946;美国专利申请13/244,947;美国专利申请13/244,949;美国专利申请13/244,950;美国专利申请13/244,951;美国专利申请13/244,952;美国专利申请13/244,953;美国专利申请13/244,954;美国专利申请13/244,956;美国专利申请13/769,798;美国专利申请13/769,820;美国专利申请61/766,113;美国专利申请号61/673,245;美国专利申请61/786,351;美国专利申请61/697,797;以及美国专利申请61/733,886,这些专利和专利申请发明以各种目的完全以引用的方式并入本文中。

[0379] 本申请要求对美国专利申请序列号61/675,811的优先权,申请日期2012年7月25日;美国专利申请序列号61/676,178,提交日期2012年7月26日;美国申请61/676,116,提交日期2013年2月18日;以及美国专利申请61/802,194,提交日期2013年3月15日,这些专利和专利申请的发明以各种目的完全以引用的方式并入本文中。

[0380] 本文中含有受版权保护管制的材料。版权拥有者(此处是申请人)不反对专利材料和发明的传真复制产品出现在美国专利和商标局的资料或记录中,除此以外保留所有版权权利。以下注意事项将用于:版权2012-2013,Theranos公司。

[0381] 在以上对本发明首选实例进行全面描述的同时,有可能使用各种替代物、修饰物和等价物。因此,本发明涵盖范围不应该参照所述描述来决定,而应该参照附加权利要求以及等价物的全部范围来决定。任何结构,无论是否愿意,都可以与其他任何结构结合,无论是否愿意。附加权利要求不应该被解释作为包括意义加功能上的限制,除非类似限制已经在所给权利要求中使用词组“意味着”明确列出。应该理解的是,正如在此说明和以下整个权利要求中所使用的,除非上下文明确指明,单数形式“一个(a)”、“一个(an)”和“这个、该(the)”包括复数概念。还应该理解的是,正如在此说明和以下整个权利要求中所使用的,除非上下文明确指明,“在..内(in)”的意思包括“在..内(in)”和“在..上(on)”。最后,正如在此说明和以下整个权利要求中所使用的,除非上下文明确指明,“和(and)”和“或(or)”的意思既包括连接意思也包括转折意思,而且可以互相转换使用。因此当上下文中使用“和(and)”或“或(or)”时,除非上下文明确指明,类似连词用法并不除外“和(或)(and/or)”的意思。

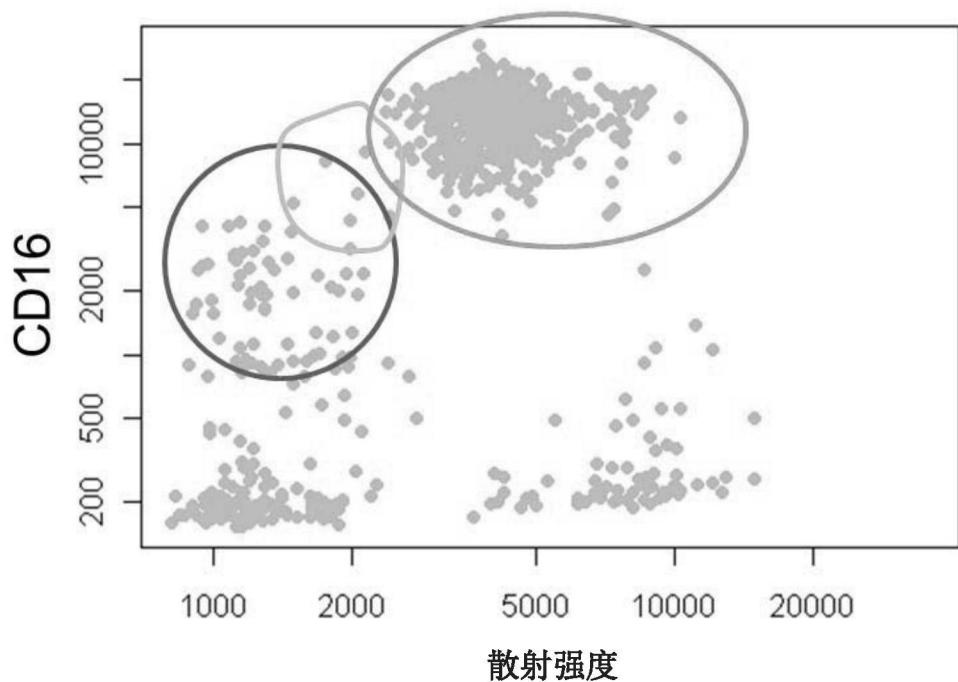


图1A

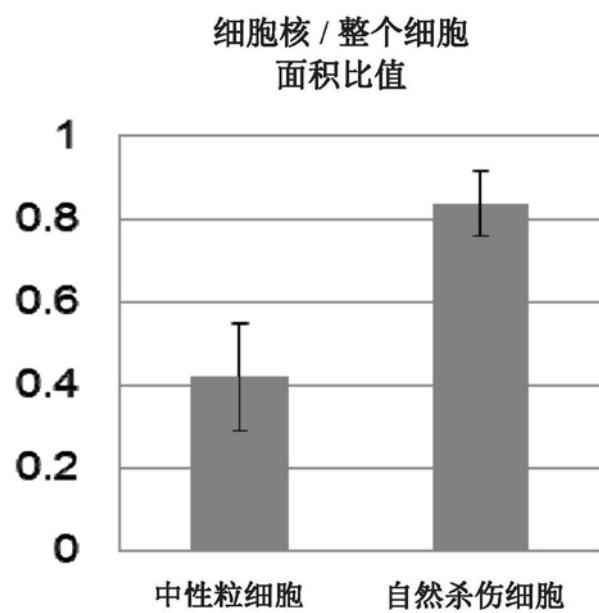


图1B

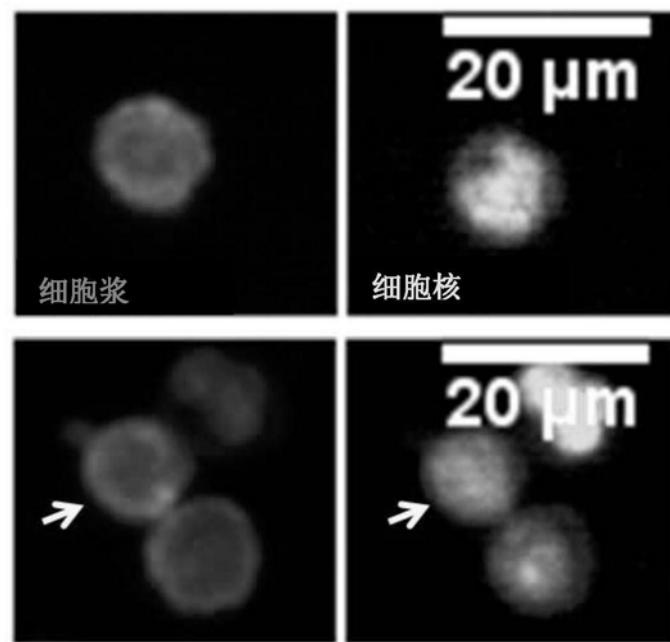


图1C

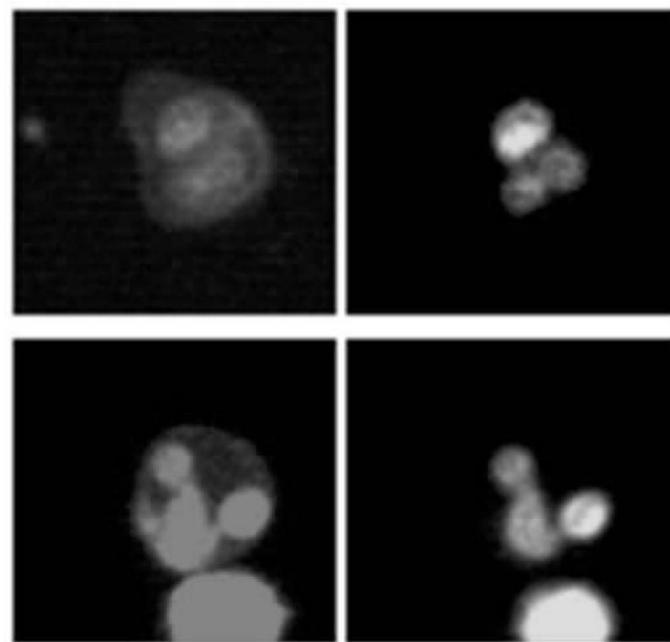


图1D



图2A

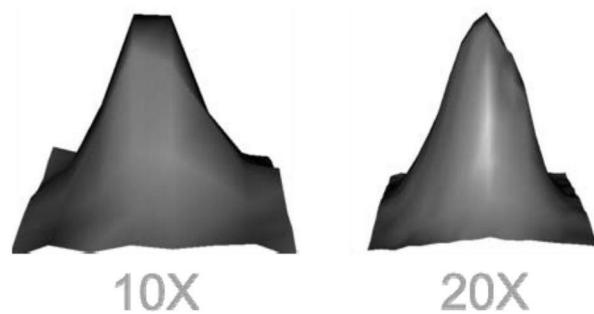


图2B

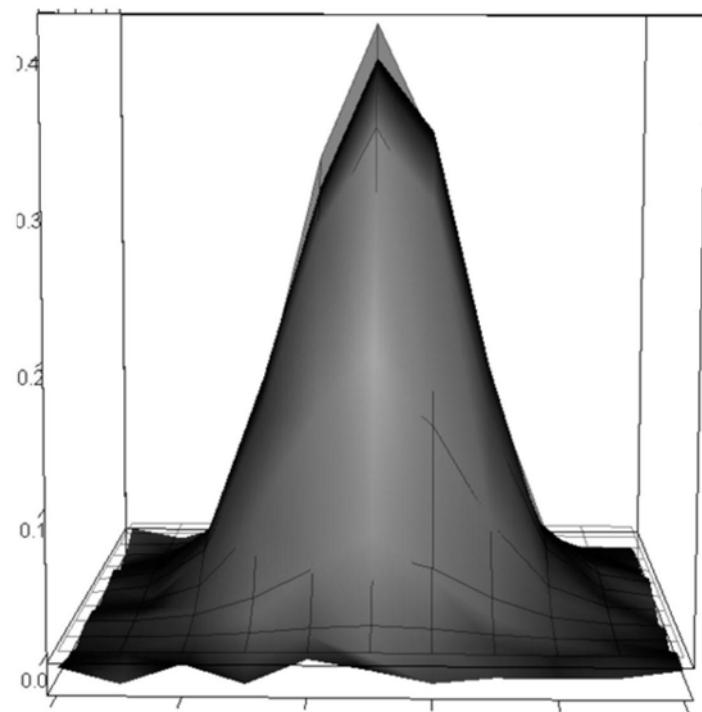


图2C

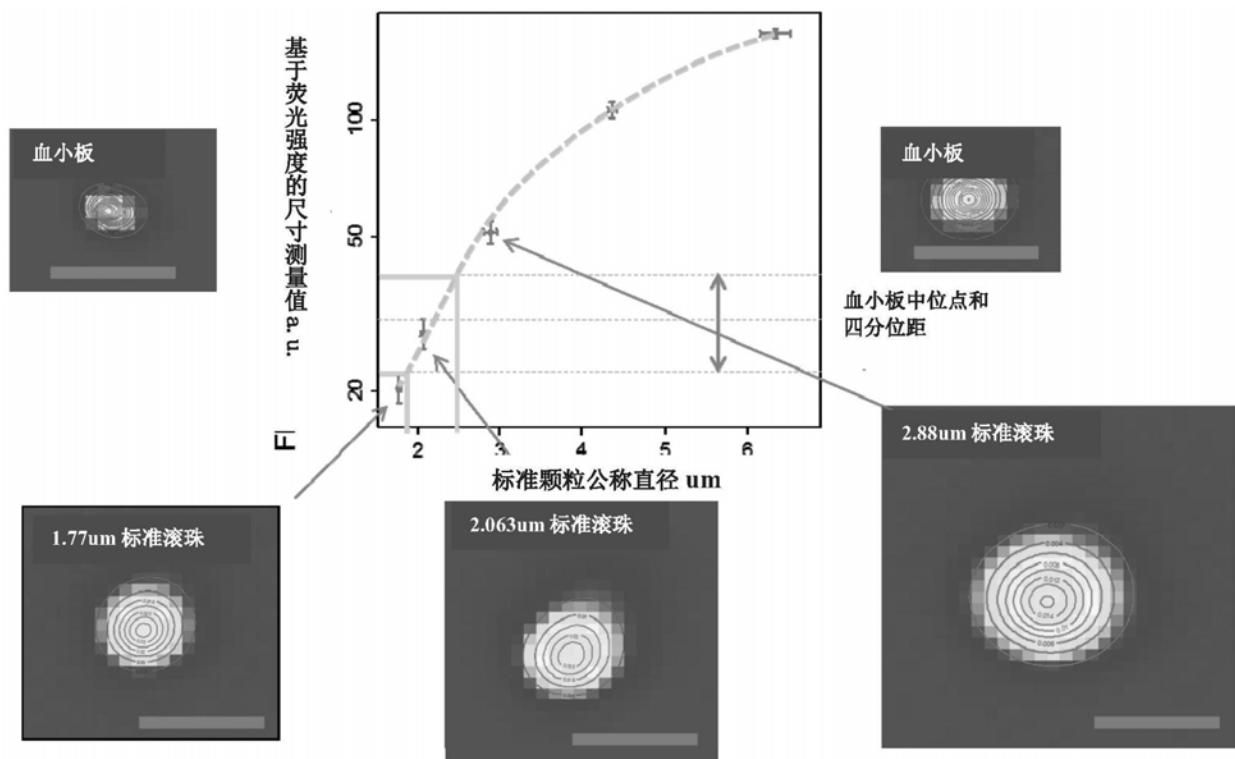


图3

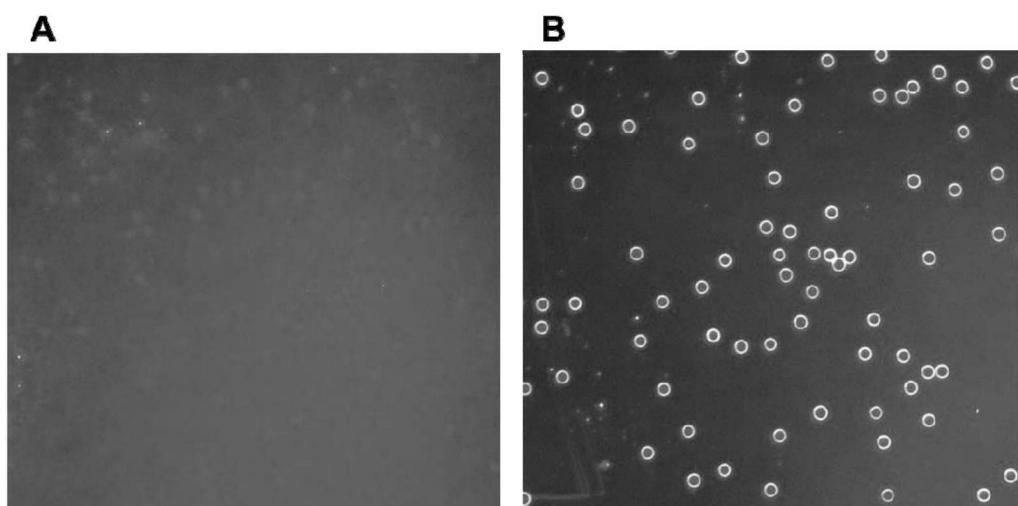


图4

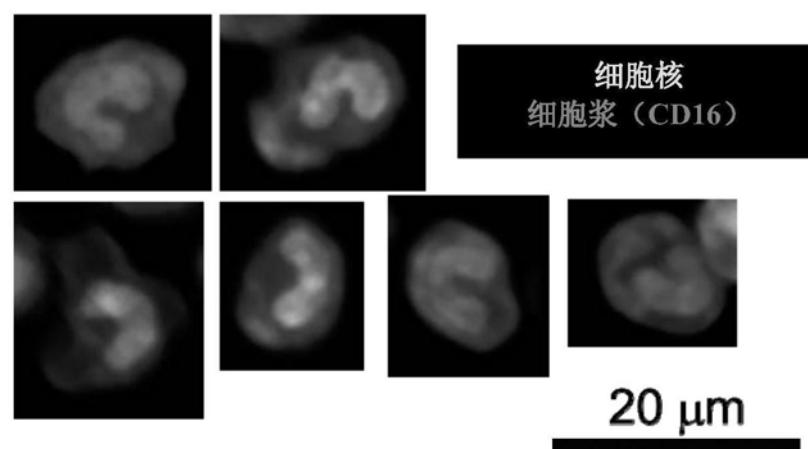


图5A

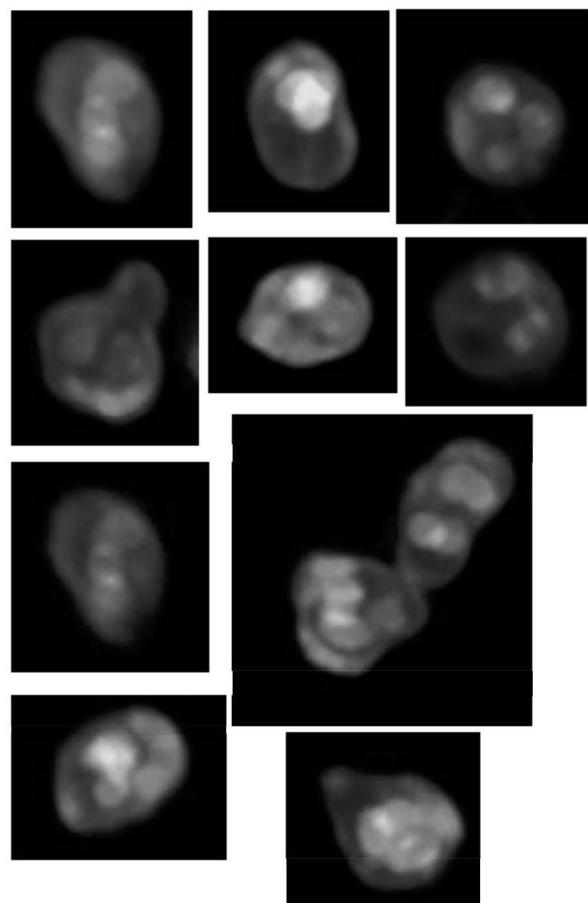


图5B

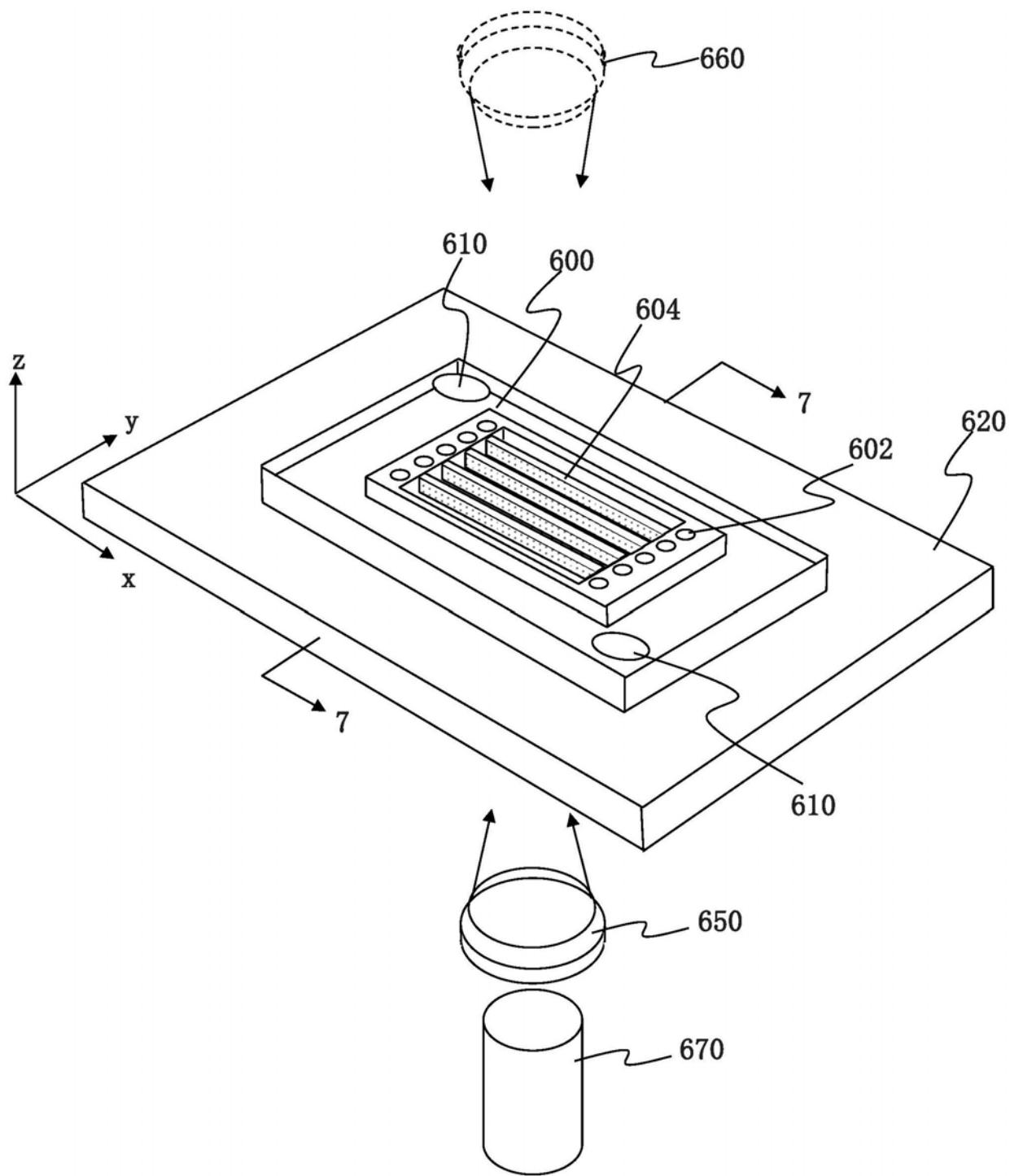


图6A

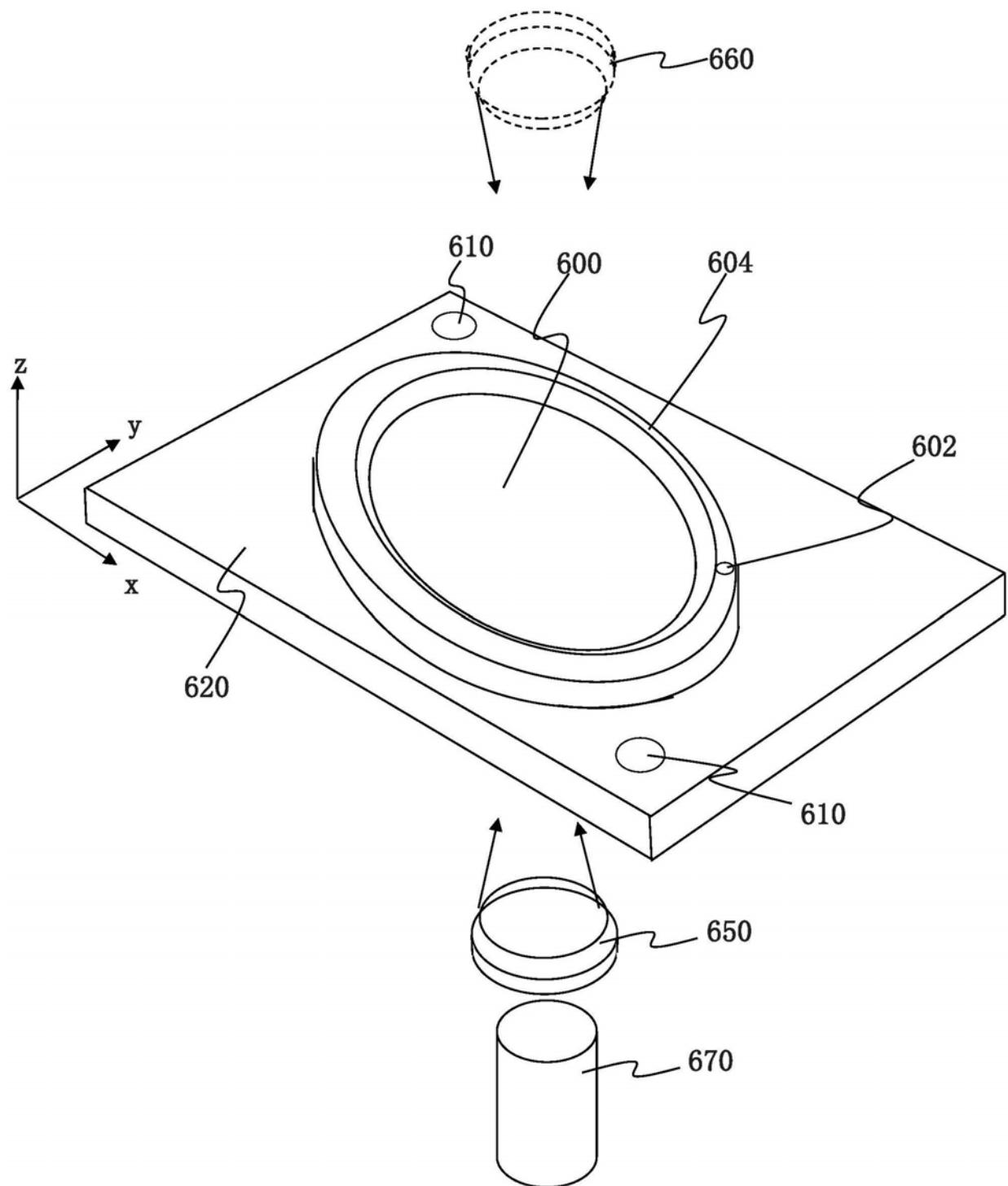


图6B

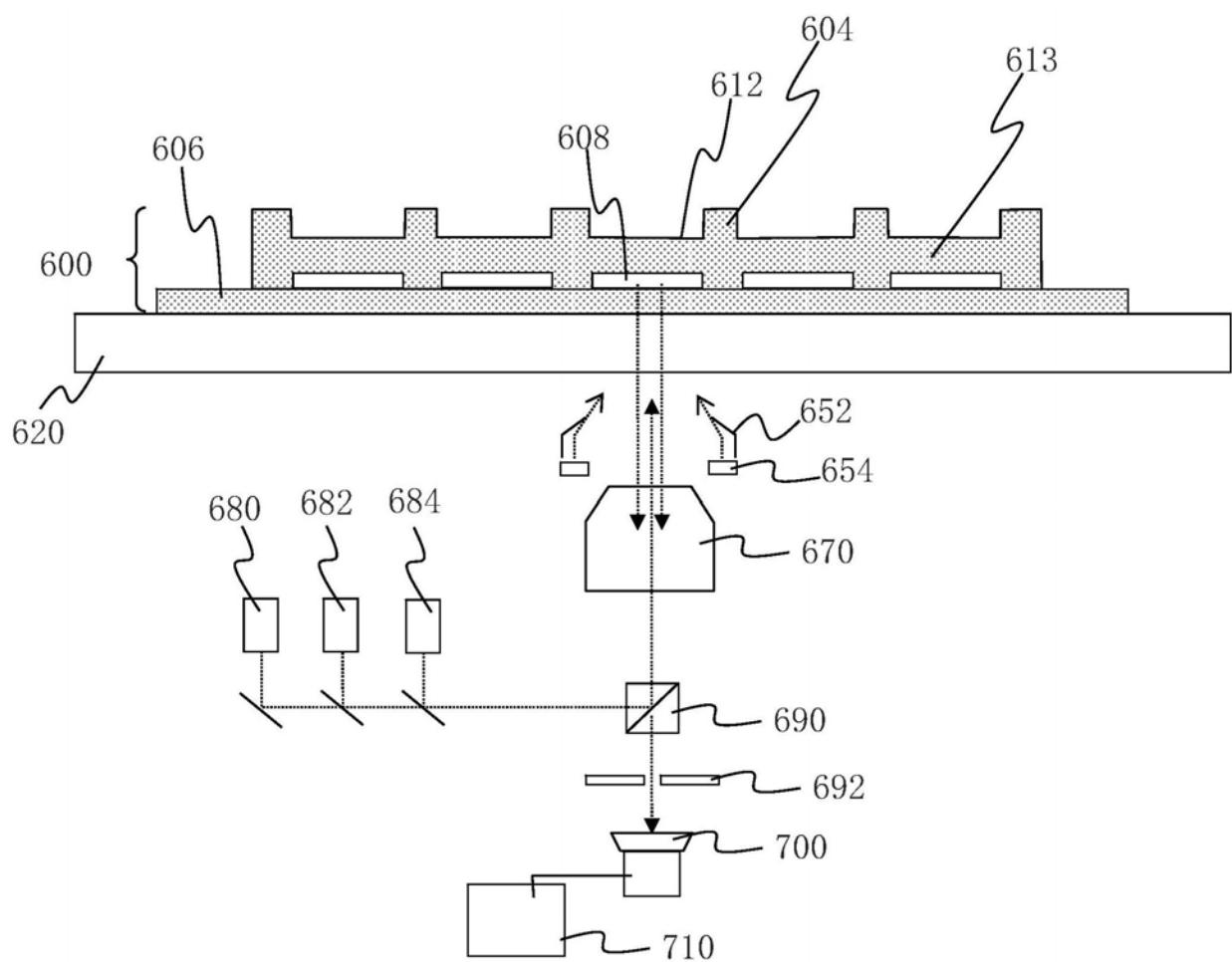


图7A

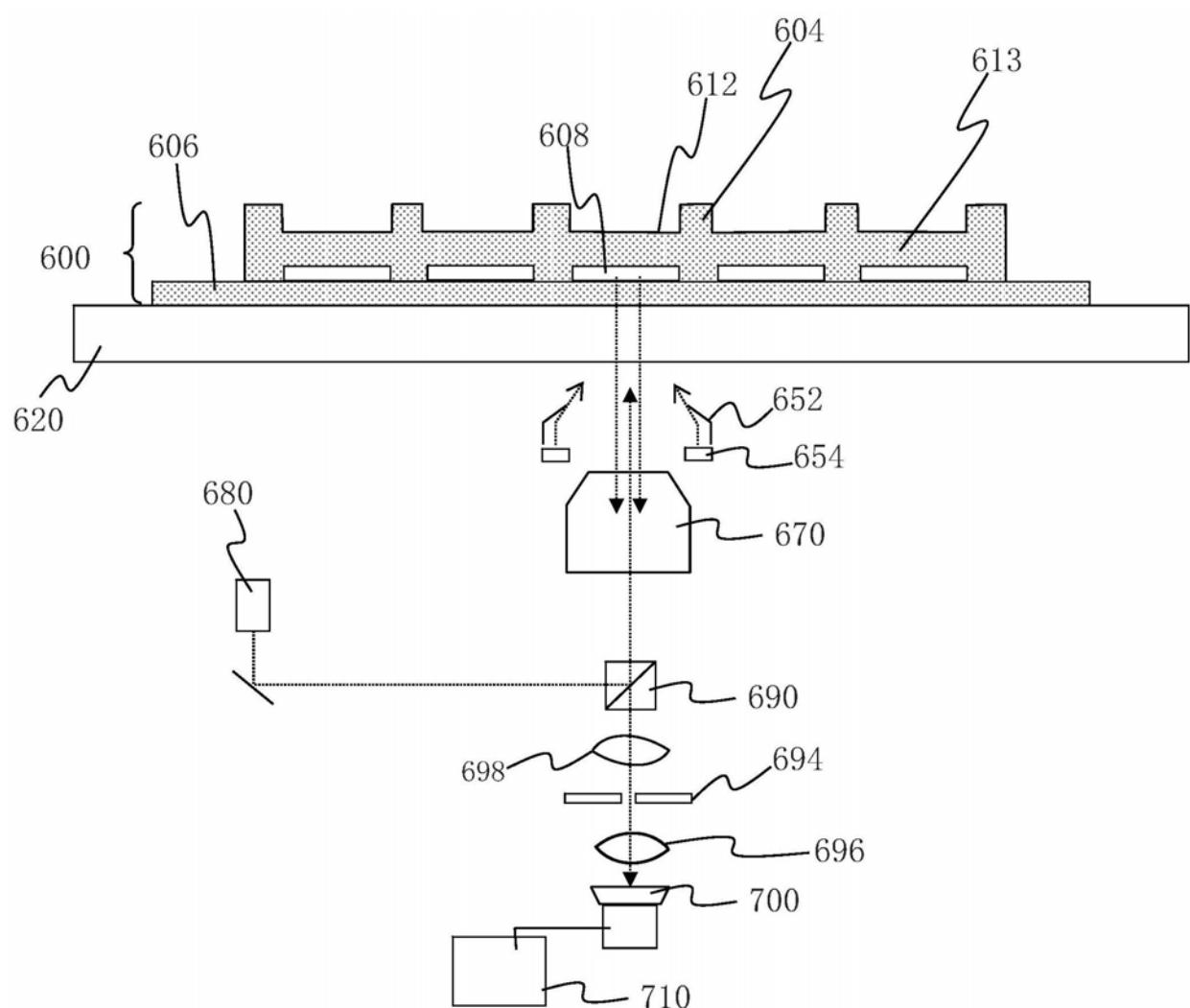


图7B

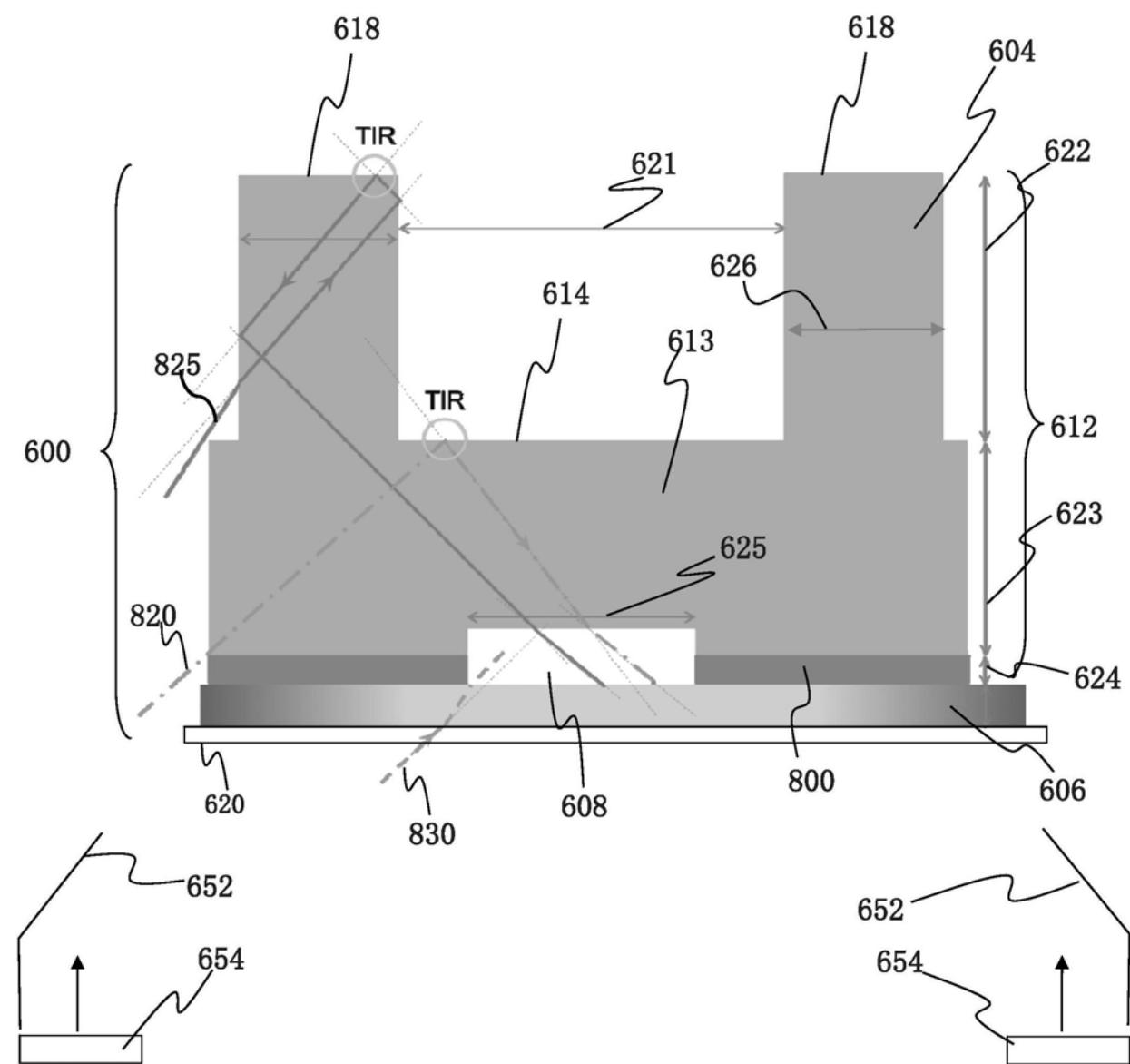


图8A

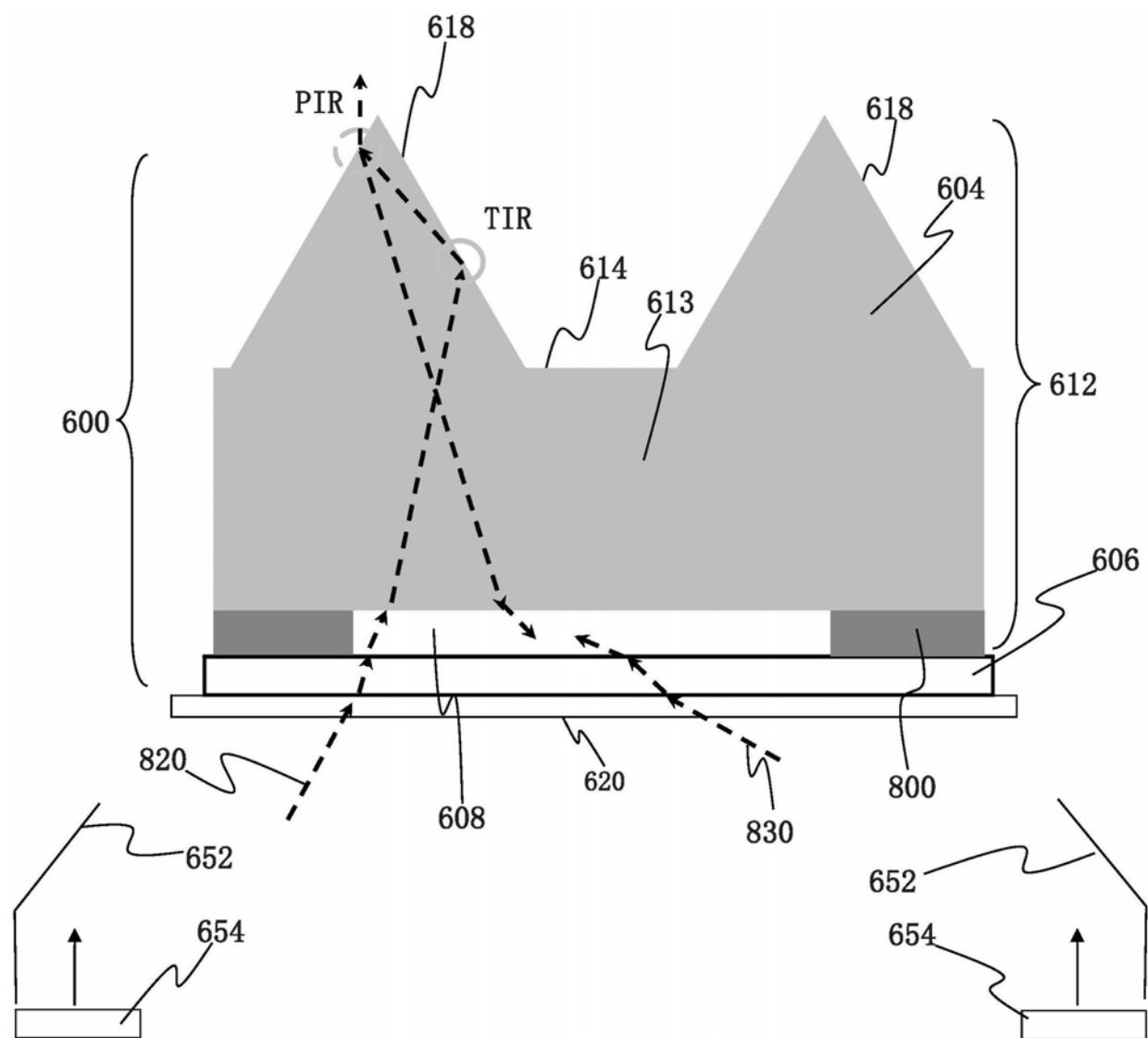


图8B

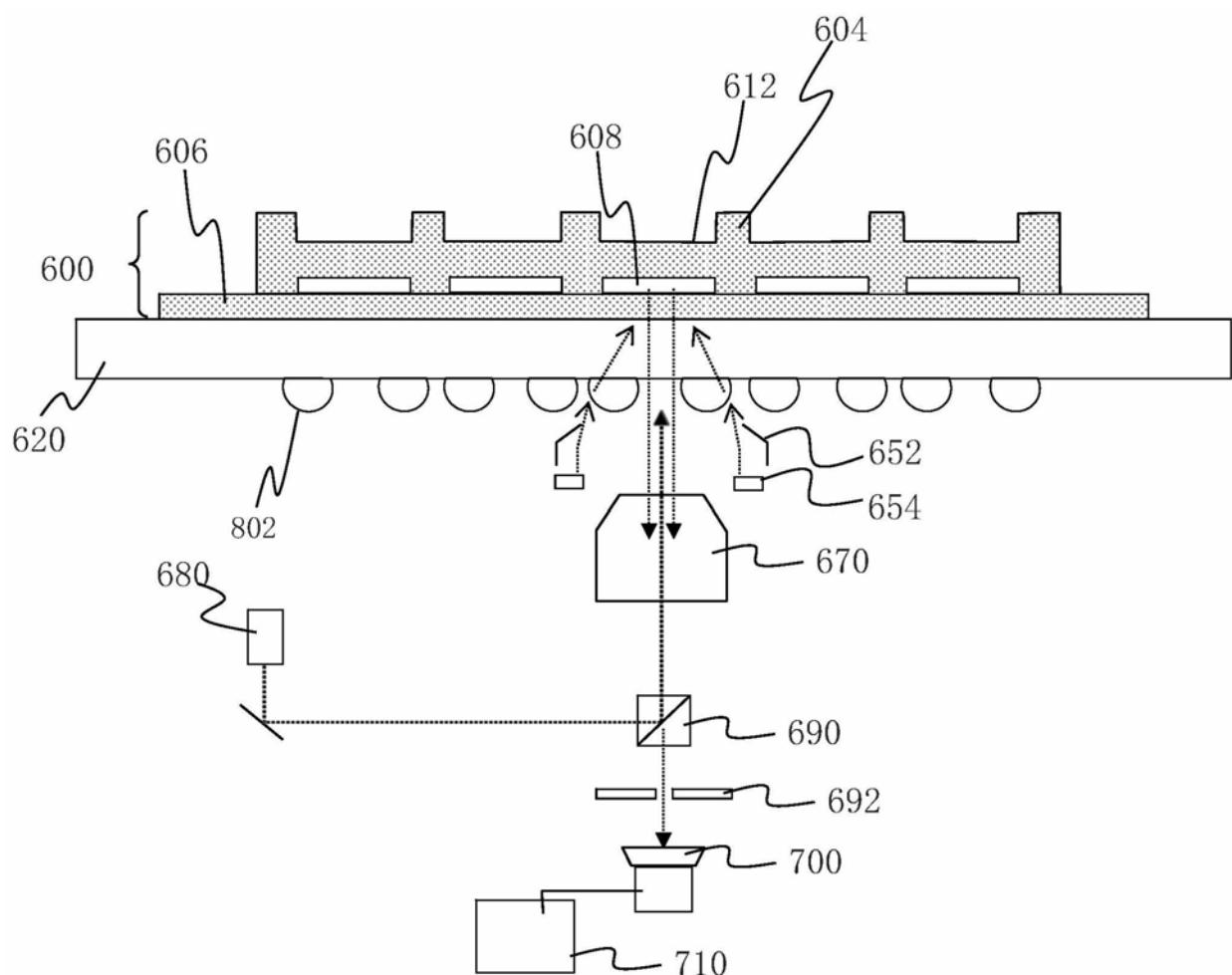


图8C

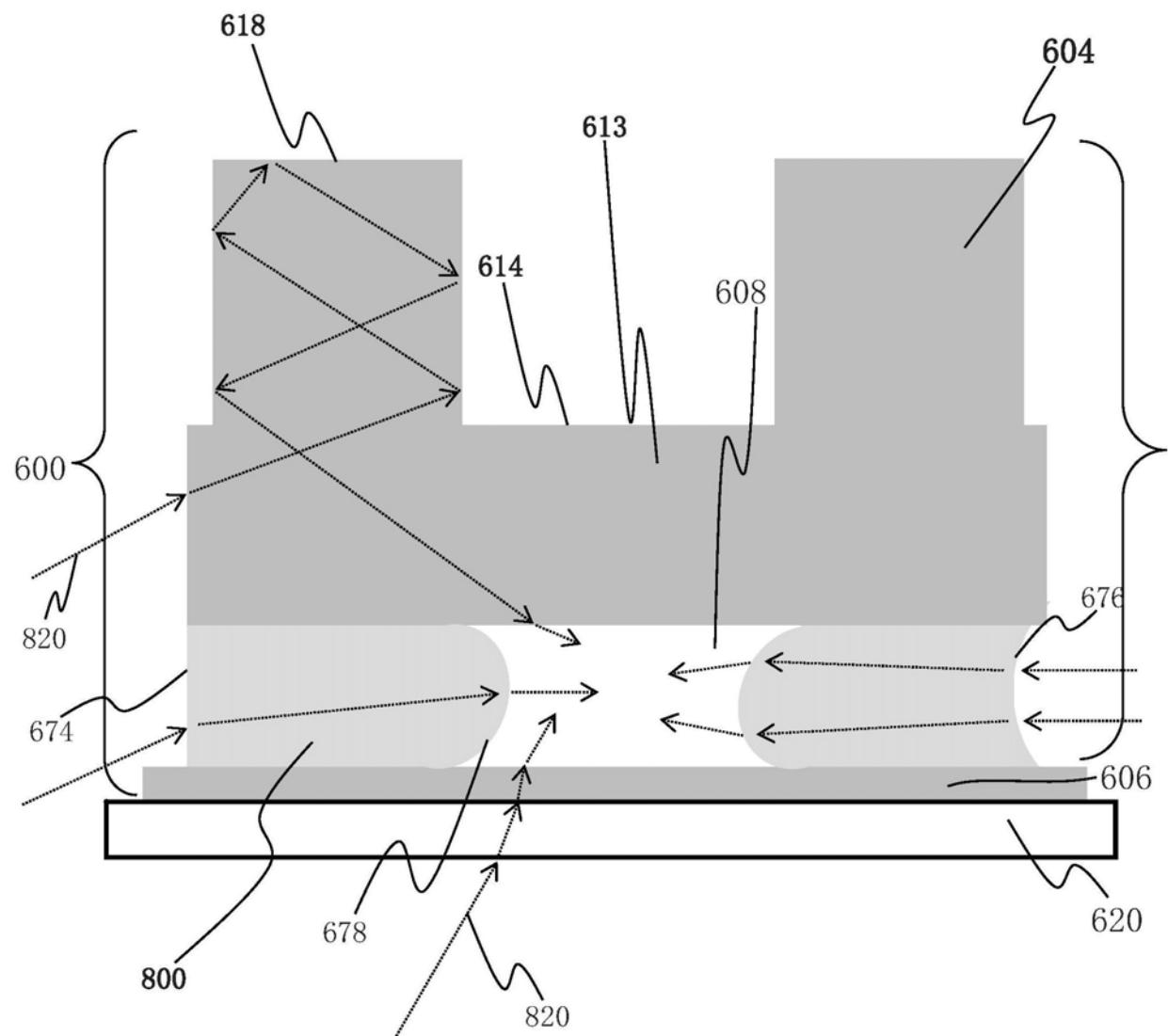


图8D

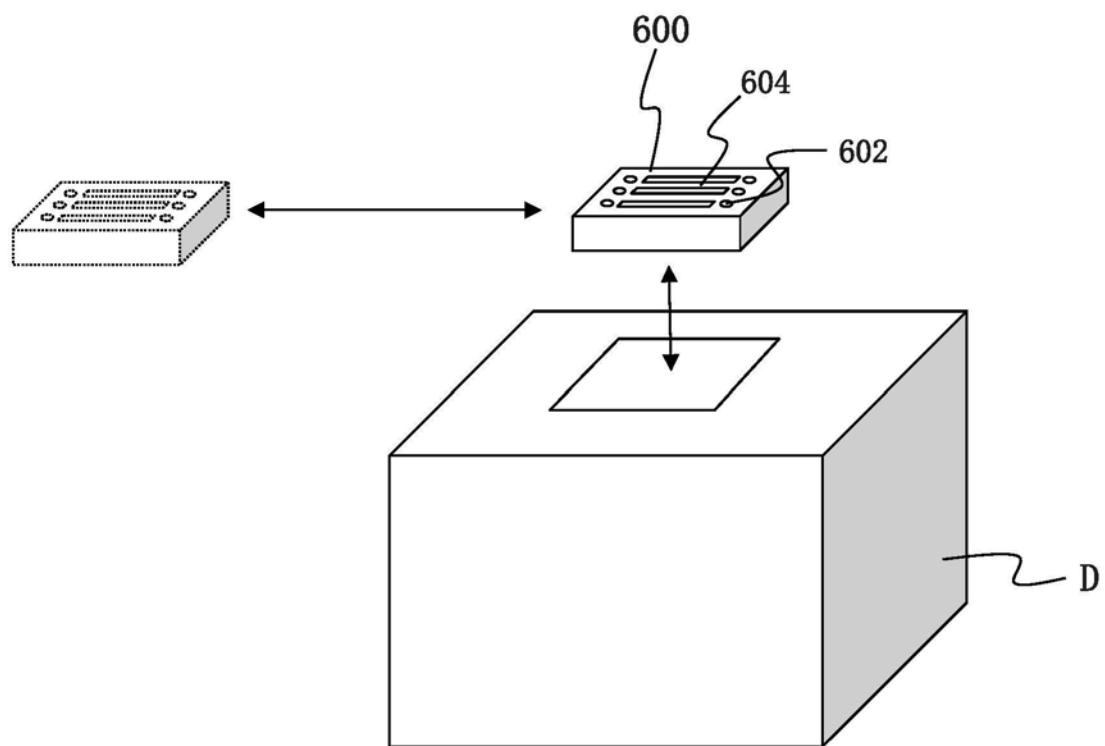


图8E

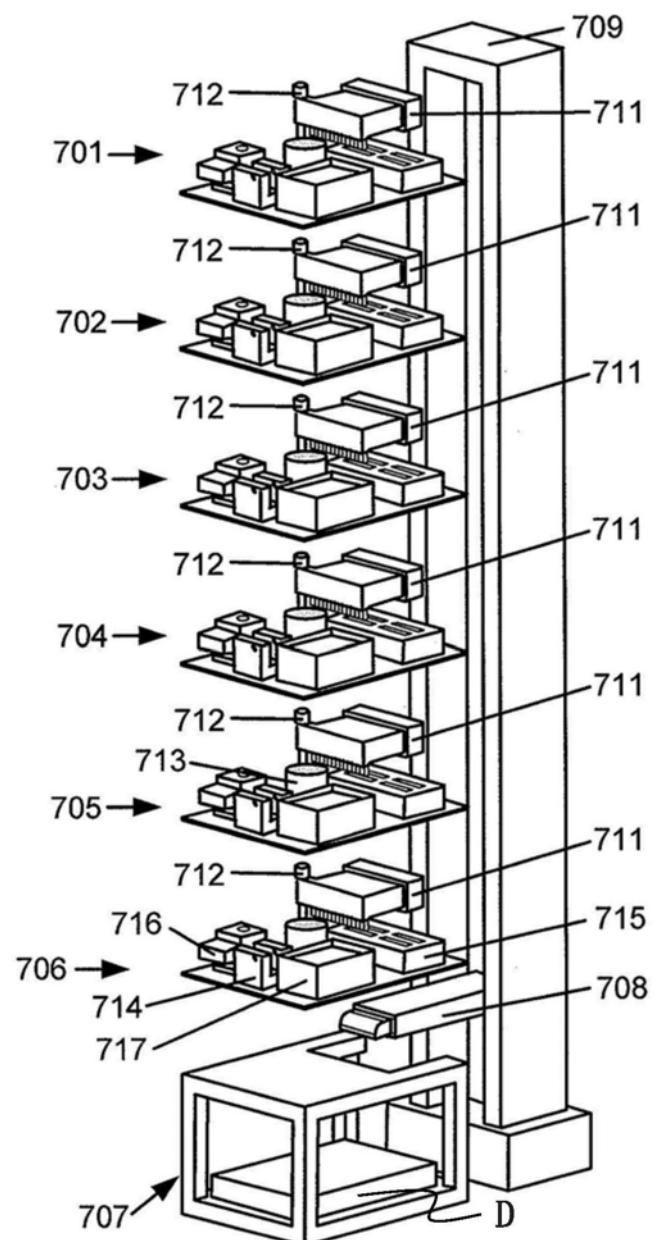
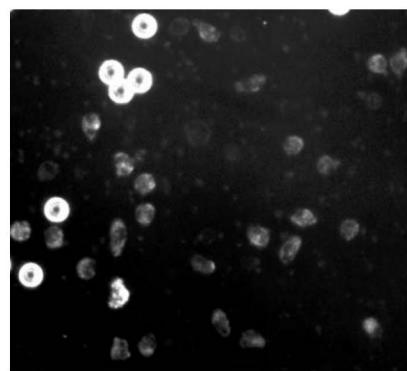
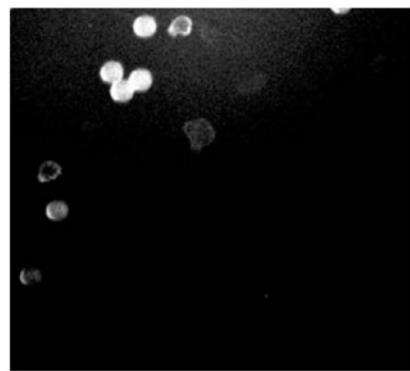


图8F



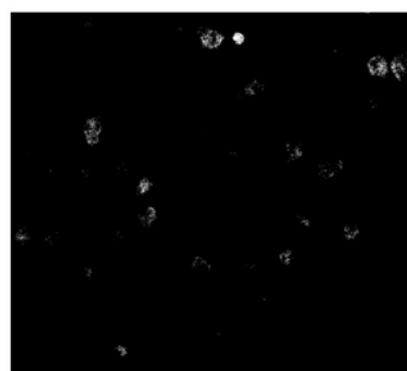
散射

图9A



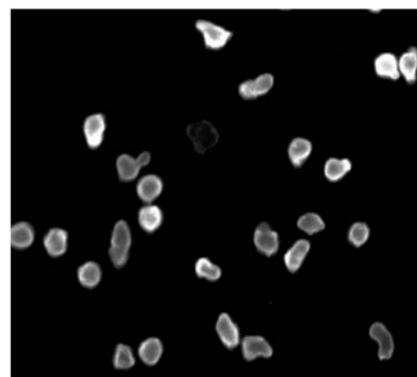
用于单核细胞的 CD14-Pac Blue

图9B



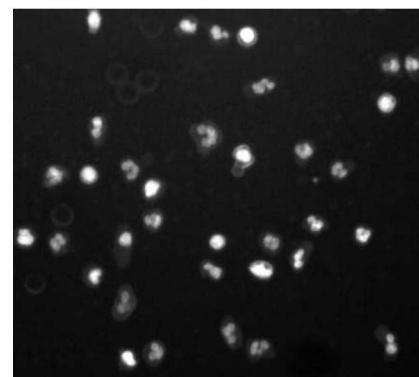
用于嗜碱粒细胞的 CD123-PECy5

图9C



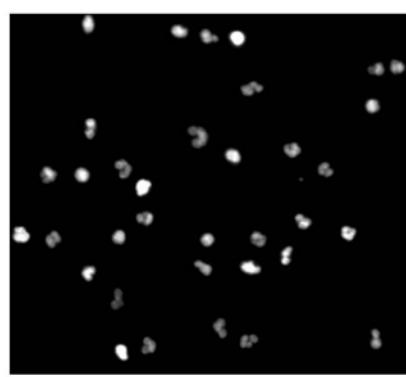
用于中性粒细胞的 CD16-PE

图9D



用于所有白细胞的 CD45-AF647

图9E



作为一种细胞核染色剂的 Draq5

图9F

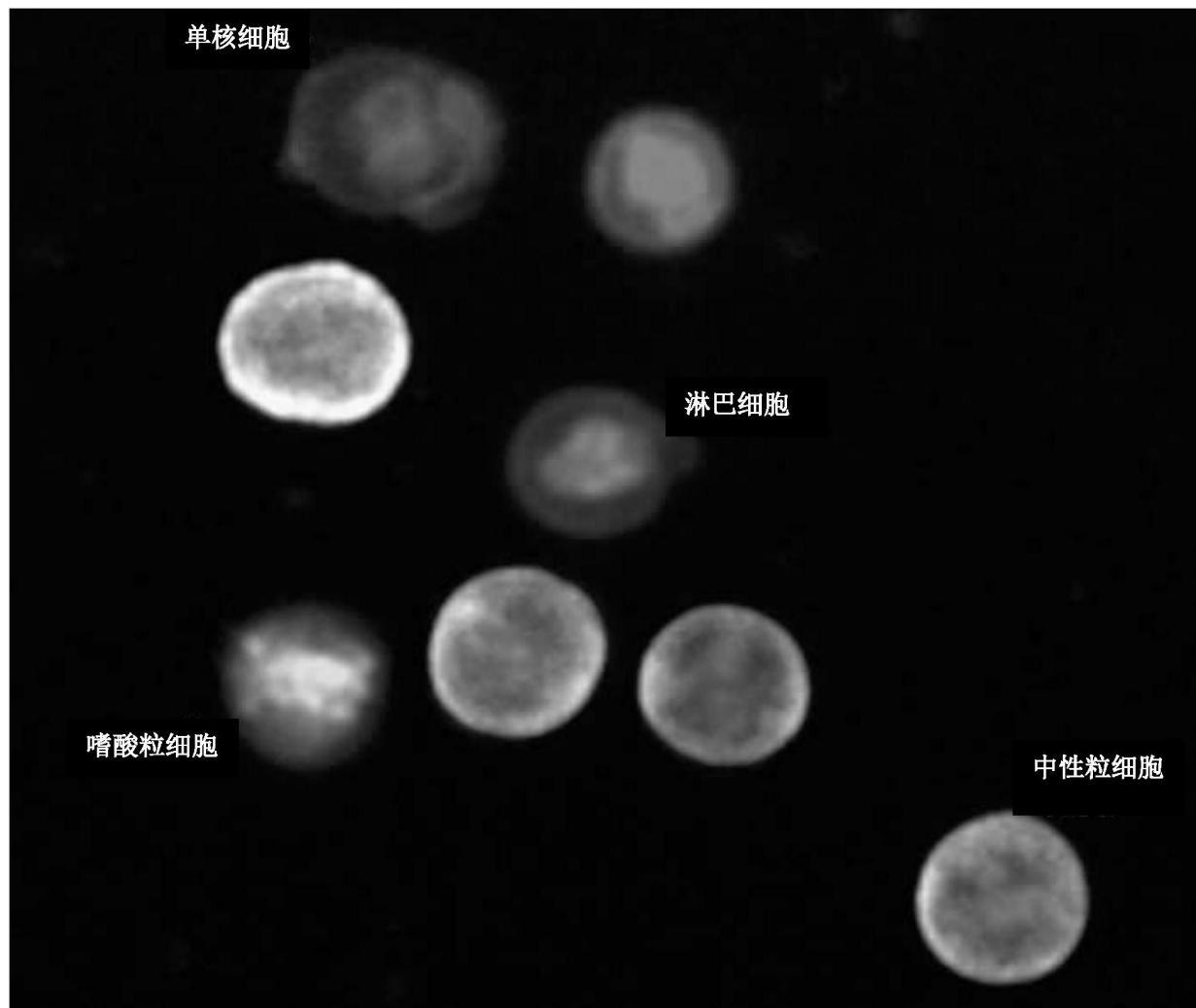


图10

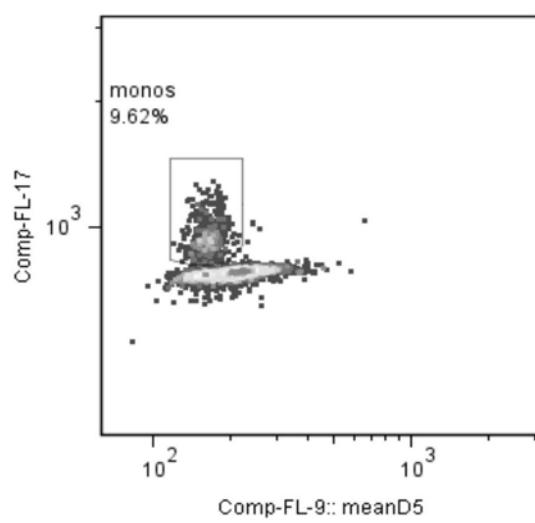


图11A

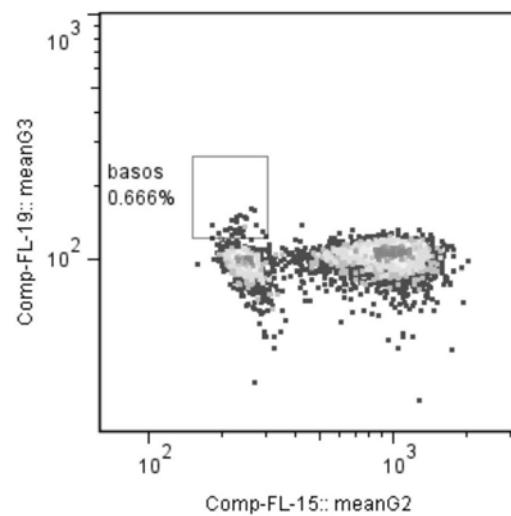


图11B

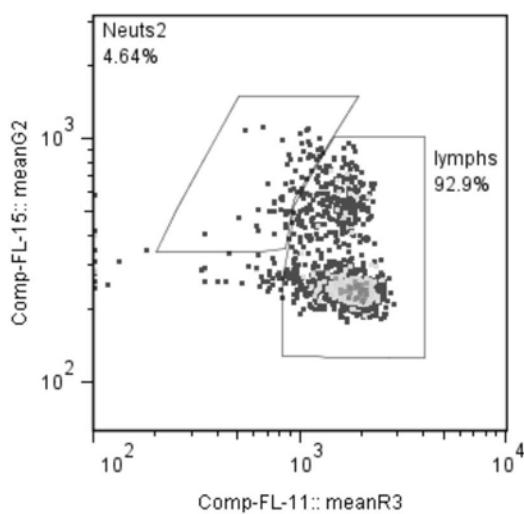


图11C

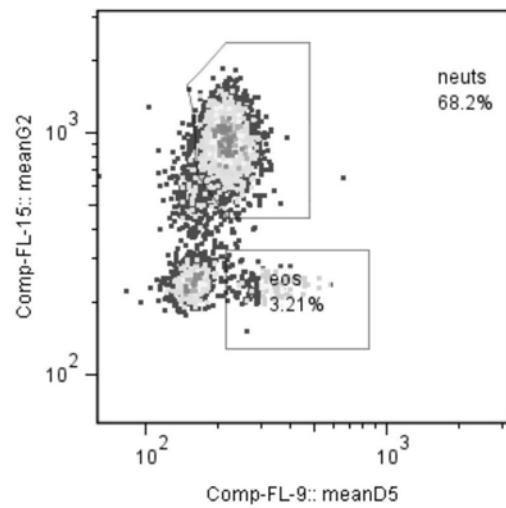


图11D

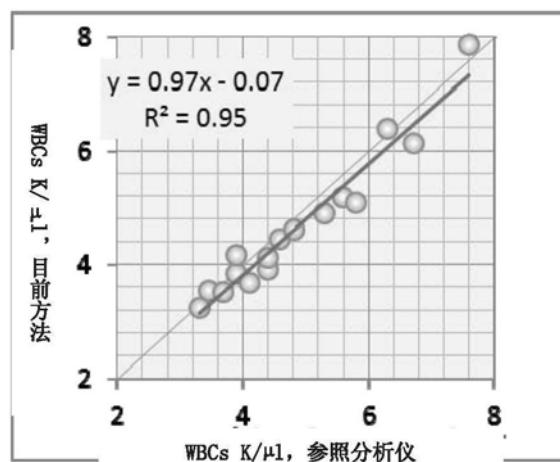


图12A

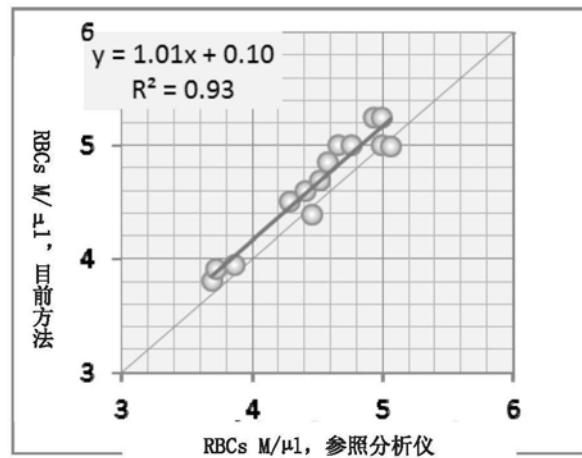


图12B

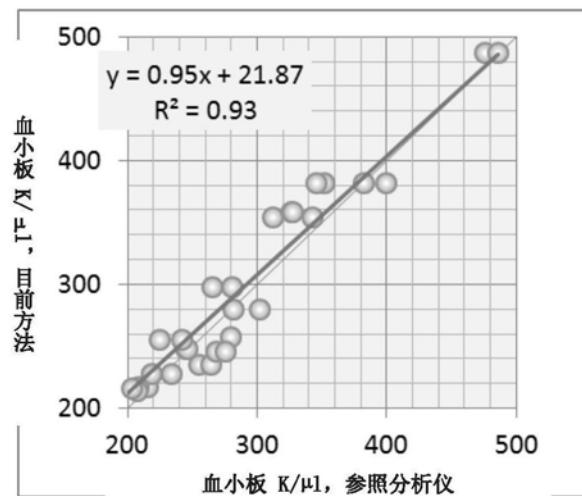


图12C

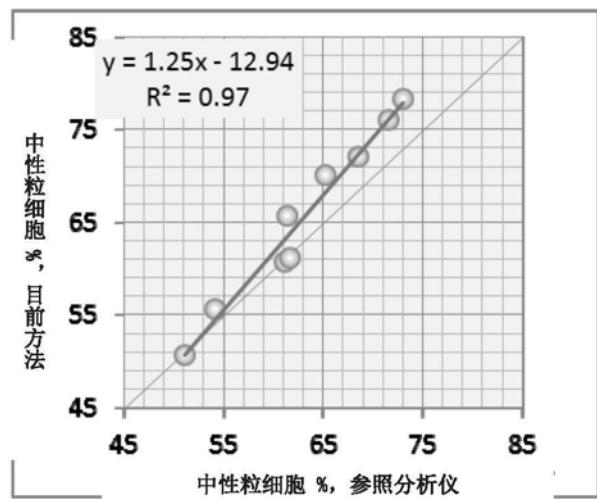


图12D

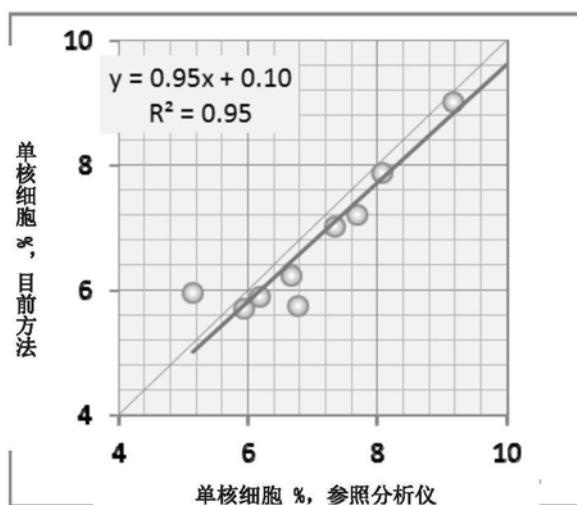


图12E

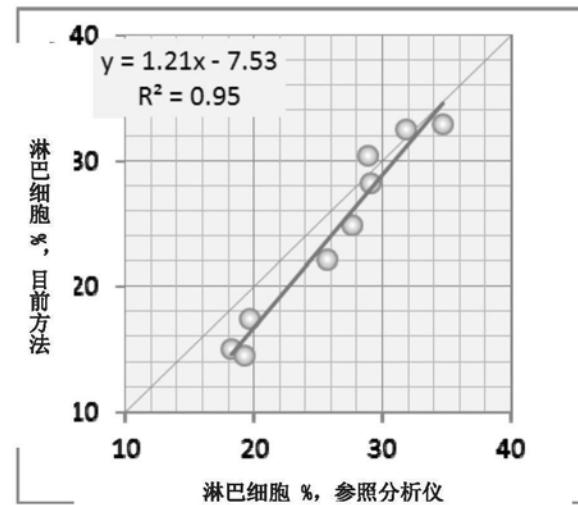


图12F