



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116529587 A

(43) 申请公布日 2023. 08. 01

(21) 申请号 202180076614.6

(22) 申请日 2021.10.26

(30) 优先权数据

63/114,230 2020.11.16 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.05.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/056647 2021.10.26

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/103574 EN 2022.05.19

(71) 申请人 贝克顿·迪金森公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 伊戈尔·V·贝尔齐纳

(74) 专利代理机构 北京柏杉松知识产权代理事

务所(普通合伙) 11413

专利代理师 王贺达 程强

(51) Int.Cl.

G01N 15/14 (2006.01)

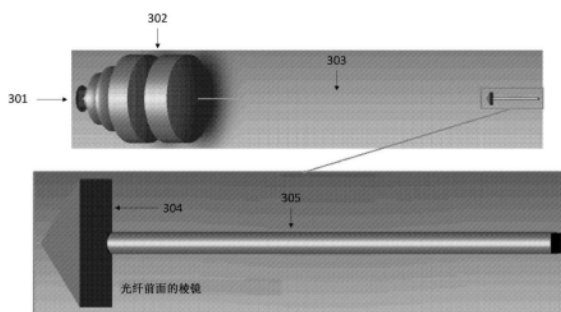
权利要求书1页 说明书24页 附图12页

(54) 发明名称

包括光收集模块的流式细胞仪及其使用方法

(57) 摘要

提供包括光收集模块的流式细胞仪。在实施例中，主题流式细胞仪包括光源、物镜和光收集模块，该光源用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒，该物镜用于聚焦颗粒调制的光，该光收集模块用于收集物镜聚焦的光。在一些实施例中，光收集模块包括光纤光传输器和定位在物镜与光纤光传输器之间的折射光学元件。在这样的实施例中，折射光学元件被配置为通过折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播来将物镜聚焦的光引导到光纤光传输器的表面上。还提供了流式细胞仪的使用方法。



1. 一种流式细胞仪,包括:
光源,用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒;
物镜,用于聚焦颗粒调制的光;和
光收集模块,用于收集物镜聚焦的光,其中所述光收集模块包括:
光纤光传输器;和
定位在所述物镜与所述光纤光传输器之间的折射光学元件,其中所述折射光学元件被配置为将物镜聚焦的光引导到所述光纤光传输器的表面上。
2. 根据权利要求1所述的流式细胞仪,其中所述折射光学元件为棱镜或柱面透镜。
3. 根据权利要求1至3中任一项所述的流式细胞仪,其中所述折射光学元件被配置为折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播。
4. 根据前述权利要求中任一项所述的流式细胞仪,其中所述光源被配置为在查询点处同时照射穿过所述流动池的多个颗粒。
5. 根据前述权利要求中任一项所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括来自位于所述流动池的查询点内的多个焦斑的光。
6. 根据权利要求5所述的流式细胞仪,其中来自所述多个焦斑中的每个的光被引导到所述光纤光传输器的表面上。
7. 根据前述权利要求中任一项所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括荧光。
8. 根据前述权利要求中任一项所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括前向散射光。
9. 根据前述权利要求中任一项所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括侧向散射光。
10. 根据前述权利要求中任一项所述的流式细胞仪,其中所述光收集模块还包括可操作地耦接到所述光纤光传输器的检测器组件。
11. 根据权利要求10所述的流式细胞仪,其中所述检测器组件包括荧光检测器。
12. 根据前述权利要求中任一项所述的流式细胞仪,其中所述光源包括激光器。
13. 一种分析样品的方法,所述方法包括:
(a) 将样品引入流式细胞仪中,所述流式细胞仪包括:
光源,用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒;
物镜,用于聚焦颗粒调制的光;和
光收集模块,用于收集物镜聚焦的光,其中所述光收集模块包括:
光纤光传输器;和
定位在所述物镜与所述光纤光传输器之间的折射光学元件,其中所述折射光学元件被配置为将物镜聚焦的光引导到所述光纤光传输器的表面上;和
(b) 对所述样品进行流式细胞术分析。
14. 根据权利要求13所述的方法,其中所述折射光学元件为棱镜或柱面透镜。
15. 根据权利要求13至14中任一项所述的方法,其中所述折射光学元件被配置为折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播。

包括光收集模块的流式细胞仪及其使用方法

[0001] 相关申请交叉引用

[0002] 根据35U.S.C.§119(e),本申请要求2020年11月16日提交的美国临时专利申请NO.63/114,230的优先权,其公开内容通过全文引用并入本文。

背景技术

[0003] 流式细胞术是一种经常用来对生物材料进行分类和表征的技术,例如对血液样品中的细胞或其他类型的生物或化学样品中感兴趣的颗粒进行分类和表征。流式细胞仪通常包括用于容纳流体样品(例如血液样品)的样品储存器和包含鞘液的鞘储存器。流式细胞仪将流体样品中的颗粒(包括细胞)作为细胞流输送到流动池,同时将鞘液引导至流动池。为了表征流动流中的成分,用光照射流动流。流动流中材料(例如形态或荧光标记的存在)的变化可以导致观察到的光的变化,这些变化允许进行表征和分离。

[0004] 在具有多个激光器的典型流式细胞术系统中,最终聚焦透镜(FFL)为流式细胞仪中的每个激光器生成高度为10-20 μm 的椭圆光斑。样品被照射后,物镜收集激光光斑并将其投射到一组(即不止一个)光纤上。传统上,每个激光光斑都被投射到相应的光纤上,即每个激光光斑一根光纤。随后,光纤将来自激光光斑的光传输到检测器。例如,图1描述了包括光纤组的常规流式细胞术系统。穿过流动池(即吸收池101)的颗粒被包括多个激光器(未示出)的光源照射。从流动池发射的激光光斑被物镜102收集,并被投射到一组光纤103上,以将激光光斑传输到一组检测器。类似地,图2描绘了由包括光纤组的常规流式细胞仪收集光的模拟。如图2所示,来自激光聚焦光斑201的光被物镜202收集。来自激光光斑中的每一个的光被投射到光纤组203中的相应光纤上。

发明内容

[0005] 如上文所述以及图1和图2所示,包括光纤组的流式细胞术系统导致了流式细胞仪的复杂性、尺寸、重量、功耗和成本增加。因此,期望一种降低流式细胞仪复杂性的解决方案。

[0006] 提供包括光收集模块的流式细胞仪,其中光收集模块包括光纤光传输器和定位在物镜与光纤光传输器之间的折射光学元件。折射光学元件被配置为通过折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播来将物镜聚焦的光引导到光纤光传输器的表面上。还提供了流式细胞仪的使用方法。

[0007] 本发明的各方面包括具有光源、物镜和光收集模块的流式细胞仪,该光源用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒,该物镜用于聚焦颗粒调制的光,该光收集模块用于收集物镜聚焦的光。在一些实施例中,光收集模块包括光纤光传输器和定位在物镜与光纤光传输器之间的折射光学元件。在某些情况下,折射光学元件被配置为通过折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播来将物镜聚焦的光引导到光纤光传输器的表面上。在一些情况下,折射光学元件为棱镜。在其他情况下,折射光学元件为柱面透镜。在实施例中,由主题光收集模块收集的颗粒调制的光为前向散射光。在另外一些实施例中,由主题光收集模块收集

的颗粒调制的光为侧向散射光。在另外一些实施例中,由主题光收集模块收集的颗粒调制的光为荧光。在某些实施例中,光收集模块同时收集散射光(例如,前向散射光和/或侧向散射光)和荧光。在一些实施例中,主题光源包括多个激光器,这些激光器被配置为照射流动池并在其中生成焦斑。在某些实施例中,焦斑之间的距离不小于颗粒大小。在实施例中,光纤光传输器可操作地耦接到检测器组件。在某些实施例中,检测器组件包括前向散射光检测器、侧向散射光检测器和/或荧光检测器。

[0008] 本发明的各方面还包括一种分析样品的方法,该方法包括将样品引入具有光源、物镜和光收集模块的流式细胞仪中,该光源用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒,该物镜用于聚焦颗粒调制的光,该光收集模块用于收集物镜聚焦的光。在一些实施例中,光收集模块包括光纤光传输器和定位在物镜与光纤光传输器之间的折射光学元件。在某些情况下,折射光学元件被配置为通过折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播来将物镜聚焦的光引导到光纤光传输器的表面上。在一些情况下,折射光学元件为棱镜。在其他情况下,折射光学元件是柱面透镜。在实施例中,由主题光收集模块收集的颗粒调制的光为前向散射光。在另外一些实施例中,由主题光收集模块收集的颗粒调制的光为侧向散射光。在另外一些实施例中,由主题光收集模块收集的颗粒调制的光为荧光。在某些实施例中,光收集模块同时收集散射光(例如,前向散射光和/或侧向散射光)和荧光。在一些实施例中,主题光源包括多个激光器,这些激光器被配置为照射流动池并在其中生成焦斑。在某些实施例中,焦斑之间的距离不小于颗粒大小。在实施例中,光纤光传输器可操作地耦接到检测器组件。在某些实施例中,检测器组件包括前向散射光检测器、侧向散射光检测器和/或荧光检测器。

附图说明

[0009] 当结合附图阅读时,从下面的详细描述可以最好地理解本发明。附图中包括以下图:

[0010] 图1描绘了包括光纤组的常规流式细胞术系统。

[0011] 图2描绘了由包括光纤组的常规流式细胞仪收集光的模拟。

[0012] 图3描绘了根据某些实施例的光收集模块。

[0013] 图4描绘了由包括根据某些实施例的光收集模块的流式细胞术系统收集光的模拟。

[0014] 图5描绘了激光焦斑的大小和几何形状。

[0015] 图6描绘了利用包括根据某些实施例的光收集模块的流式细胞术系统收集来自激光焦斑的光的模拟。

[0016] 图7A-C各自描绘了利用包括根据某些实施例的光收集模块的流式细胞术系统收集来自激光焦斑的光的模拟。

[0017] 图8描绘了由包括光收集模块的流式细胞术系统收集的来自激光焦斑的光的辐照度分布。

[0018] 图9描绘了包含根据某些实施例的光收集模块的流式细胞仪。

[0019] 图10描绘了根据某些实施例的计算系统的框图。

[0020] 图11描绘了根据某些实施例的计算系统的框图。

具体实施方式

[0021] 提供一种包括光收集模块的流式细胞仪。在实施例中，主题流式细胞仪包括光源、物镜和光收集模块，该光源用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒，该物镜用于聚焦颗粒调制的光，该光收集模块用于收集物镜聚焦的光。在一些实施例中，光收集模块包括光纤光传输器和定位在物镜与光纤光传输器之间的折射光学元件。在这样的实施例中，折射光学元件被配置为通过折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播将物镜聚焦的光引导到光纤光传输器的表面上。还提供了流式细胞仪的使用方法。

[0022] 在更详细地描述本发明之前，应当理解，本发明不限于所描述的特定实施例，因此其当然可以变化。还应理解，由于本发明的范围将仅受所附权利要求的限制，这里使用的术语仅用于描述特定实施例的目的，而不旨在限制。

[0023] 在提供值范围的情况下，应当理解，除非上下文另有明确规定，否则在该范围的上限与下限之间的直至其下限单位的十分之一的每个中间值以及在规定范围内的任何其他规定值或中间值都包含在本发明中。这些较小范围的上限和下限可以独立地包含在较小范围内，并且也包含在本发明中，但受所述范围内任何明确排除限制的约束。在所述范围包括一个界限或两个界限的情况下，排除那些包括的限制之一或两个的范围也包括在本发明中。

[0024] 某些范围在本文中以术语“大约”开头的数值呈现。在本文中，术语“大约”用于为其前面的确切数字以及接近或近似该术语前面的数字提供字面支持。在确定数字是否接近或近似于具体列举的数字时，接近或近似的未列举的数字可以是在其呈现的上下文中提供具体列举的数字的实质等效的数字。

[0025] 除非另有定义，否则本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同。尽管与本文所述的那些相似或等效的任何方法和材料也可以用于本发明的实践或测试，但现在仅对代表性的说明性方法和材料进行描述。

[0026] 如同每个单独的出版物或专利都被明确和单独地指示以引用的形式并入本文，并且通过引用并入本文以公开和描述与引用出版物相关的方法和/或材料，本说明书中引用的所有出版物和专利均以引用的方式并入本文。对任何出版物的引用都是针对其在申请日之前的公开，并且不应被解释为承认本发明无权凭借在先发明提前发布。此外，所提供的出版日期可能与实际出版日期不同，这可能需要单独确认。

[0027] 应当注意，除非上下文另有明确规定，否则在本文和所附权利要求中使用的单数形式“一”、“一个”和“所述”包括复数指代物。另外应当注意，可以起草权利要求以排除任何可选元素。因此，本声明旨在作为在陈述权利要求要素或使用“否定”限制时使用“单独”、“仅”等排他性术语的先行依据。

[0028] 如本领域技术人员在阅读本公开后将显而易见的，在不脱离本发明的范围或精神的情况下，本文描述和说明的各个实施例中的每一个都具有分立的部件和特征，这些部件和特征可以容易地与其他几个实施例中任何一个的特征分离或组合。任何所描述的方法都能按照所描述的事件的顺序或任何其他逻辑上可行的顺序来执行。

[0029] 尽管为了语法上的流畅性和功能性解释，已经或将要对设备和方法进行描述，但应明确理解，除非根据35U.S.C. §112明确表述，否则不应将权利要求解释为必须以任何方式通过构建“手段”或“步骤”限制进行限制，而应在等效司法原则下赋予权利要求所提供的

定义的全部范围的含义和等效物,并且在权利要求根据35U.S.C.§112被明确表述的情况下,应被赋予35U.S.C.§112规定的完全法定同效力。

[0030] 包括光收集模块的流式细胞仪

[0031] 如上所述,本发明的各方面都涉及包括光源、物镜和光收集模块的流式细胞仪,该光源用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒,该物镜用于聚焦颗粒调制的光,该光收集模块用于收集物镜聚焦的光。“收集”物镜聚焦的光是指采集流动池中的颗粒在对其进行照射后所调制的光,使得光能够传输到一组检测器以供检测。在一些情况下,颗粒调制的光是前向散射光。“前向散射”光是指沿主要向前的方向穿过或围绕颗粒传播的光。前向散射光的强度通常取决于颗粒的整体大小。在另外一些情况下,颗粒调制的光是侧向散射光。“侧向散射”光是指从颗粒的表面和内部结构折射和反射的光。在另外一些情况下,颗粒调制的光是荧光。“荧光”是指流动池中的颗粒在受到来自光源的光激发后由颗粒发射的光。在另外一些情况下,颗粒调制的光包含前向散射光、侧向散射光和荧光的某种组合。在某些实施例中,由物镜所聚焦并由光收集模块收集的颗粒散射的光包括前向散射光、侧向散射光和荧光。如本文所讨论的,“流动池”在其传统意义上被描述为是指含有用于在鞘液中输送颗粒的液体流的部件,例如吸收池。本文所讨论的“查询点”是指流动池内的一个区域,在该区域内,来自光源的光照射颗粒以供分析。查询点的大小可以根据期望来变化。例如,其中 $0\mu\text{m}$ 表示光源发射的光的光轴线,查询点的范围可以为 $-50\mu\text{m}$ 到 $50\mu\text{m}$,例如 $-25\mu\text{m}$ 到 $40\mu\text{m}$,并且包括 $-15\mu\text{m}$ 到 $30\mu\text{m}$ 。

[0032] 在实施例中,主题光收集模块包括光纤光传输器。如本文所述,“光纤光传输器”是指用于将光从材料的一端传送到另一端的透明材料。在某些实施例中,光纤光传输器被配置为将从流动池收集的颗粒调制的光(例如,前向散射光、侧向散射光和/或荧光)传输到检测器组件中的一个或更多个检测器。在一些实施例中,透明材料包括玻璃。在其它实施例中,透明材料包括塑料。在一些实施例中,光纤光传输器是单模光纤。在其他情况下,光纤光传输器是多模光纤。光纤光传输器的直径可以根据期望变化。在一些实施例中,主题光纤光传输器的直径为 0.1mm 至 3mm ,例如 0.2mm 至 2.5mm 、 0.3mm 至 2.2mm 、 0.4mm 至 2mm 、 0.5mm 至 1.5mm ,并且包括 0.6mm 至 1.2mm 。在一些情况下,光纤光传输器的直径为 0.8mm 。在一些实施例中,光纤光传输器包括单个光纤光传输器。换言之,在主题流式细胞仪包括多个激光器的情况下,来自每个激光器的光被收集使得其被单个光纤光传输器传输到检测器,即,与流式细胞仪包含多个光纤并且每个激光器发射的光被相应的光纤接收的布置相反。

[0033] 在另外的实施例中,主题光收集模块包括折射光学元件。在某些情况下,折射光学元件位于物镜与光纤光传输器之间。在一些实施例中,折射光学元件位于距光纤光传输器 10mm 或更小(例如 5mm 或更小、 2mm 或更小、 1mm 或更小、 0.5mm 或更小、 0.1mm 或更小、 0.05mm 或更小、 0.001mm)的位置,以及包括折射光学元件和光纤光传输器处于物理接触的位置。在这样的实施例中,折射光学元件被配置成收集物镜聚焦的光并将收集的物镜聚焦的光投射到光纤光传输器的表面上,使得光可以被传输到检测器组件中的一个或更多个检测器。如本文所讨论的,“折射”在其传统意义上被描述为是指光在穿过介质后改变其方向。因此,在实施例中,折射光学元件被配置成改变物镜聚焦的光的方向,使得光沿单个光轴线传播并照射光纤光传输器的表面。在一些情况下,物镜聚焦的光被收集,使得物镜聚焦的光中的70%或更多(例如80%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多,并且包括99%或更多)照

射光纤光传输器的表面并且随后被传输到检测器组件中的一个或更多检测器。在实施例中，折射光学元件的折射提供了额外的光功率，用于将物镜聚焦的光耦合到光纤光传输器中。

[0034] 任何方便的折射和收集光的设备都可以用作主题折射光学元件。在一些实施例中，折射光学元件是棱镜。本文所讨论的“棱镜”在其传统意义上被描述为是指配置为折射光的透明光学元件。感兴趣的折射光学元件可以包括任何合适的形状，包括但不限于：直线横截面形状，例如正方形、长方形、梯形、三角形、六边形等；曲线横截面形状，例如圆形、椭圆形等；以及不规则形状，例如耦合到平面顶部的抛物线底部等。在其它实施例中，折射光学元件包括柱面透镜。在这样的实施例中，透镜被配置成收集物镜聚焦的光并将物镜聚焦的光投射到光纤光传输器的表面上。

[0035] 在一些实施例中，折射光学元件的折射率为1到3，例如1.1到2.9，例如1.2到2.8，例如1.3到2.7，例如1.4到2.6，例如1.5到2.7，例如1.6到2.6，例如1.7到2.5，例如1.8到2.4，并且包括1.9到2.3。根据期望的透明度，感兴趣的折射光学元件可以由任何合适的材料形成，包括但不限于玻璃（例如，N-SF10、N-SF11、N-SF57、N-BK7、N-LAK21或N-LAF35玻璃）、二氧化硅（例如，熔融二氧化硅）、石英、晶体（例如，CaF₂晶体）、硒化锌（ZnSe）、F₂、钛酸锆（例如，S-TIH11）、硼硅酸盐（例如，BK7）。在一些实施例中，折射光学元件具有150nm到5μm、180nm到8μm、185nm到2.1μm、200nm到6μm、200nm到11μm、250nm到1.6μm、350nm到2μm、600nm到16μm、1.2μm到8μm、2μm到16μm或其他波长范围的透明窗口。

[0036] 在一些情况下，由折射光学元件折射的光继续沿平行于光源确立的光轴线的轴线传播。在其它实施例中，由折射光学元件折射的光可以沿相对于光源确立的光轴线具有一偏转角度的轴线传播。在这样的实施例中，偏转范围可以为0.001弧分到10弧分，例如0.005弧分到9弧分，例如0.01弧分到8弧分，例如0.05弧分到7弧分，例如0.1弧分到6弧分，例如0.5弧分到5弧分，并且包括1弧分到3弧分。在一些实施例中，光分离部件提供5弧分或更小（例如4弧分或更小，例如3弧分或更小，例如2弧分或更小，例如1弧分或更小，例如0.5弧分或更小，例如0.1弧分或更小，例如0.05弧分或更小，例如0.01弧分或更小，例如0.005弧分或更小，例如0.001弧分或更小，并且包括0.0001弧分或更小）的光束偏转。

[0037] 折射光学元件可以在任何合适的距离处被颗粒调制的光照射，例如在距流动池0.001mm或更远（例如0.005mm或更远，例如0.01mm或更远，例如0.05mm或更远，例如0.1mm或更远，例如0.5mm或更远，例如1mm或更远，例如5mm或更远，例如10mm或更远，例如25mm或更远，并且包括100mm或更远）的距离处。同样地，折射光学元件可以被从流动池发射的颗粒调制的光以任何合适的角度照射，例如照射的入射角度为10°到90°，例如15°到85°，例如20°到80°，例如25°到75°，并且包括30°到60°。

[0038] 如上所述，本发明的各方面还包括光源，该光源被配置成在查询点处照射穿过流动池的颗粒。任何方便的光源都可以用作本文所述的光源。在一些实施例中，光源是激光器。在实施例中，激光器可以是任何方便的激光器，例如连续波激光器。例如，激光器可以是二极管激光器，例如紫外二极管激光器、可见光二极管激光器和近红外二极管激光器。在其它实施例中，激光器可以是氦氖（HeNe）激光器。在一些情况下，激光器是气体激光器，例如氦氖激光器、氩激光器、氪激光器、氙激光器、氮激光器、CO₂激光器、CO激光器、氩氟（ArF）准分子激光器、氪氟（KrF）准分子激光器、氙氟（XeCl）准分子激光器或氙氟（XeF）准分子激光

器或其组合。在其它情况下,主题流式细胞仪包括染料激光器,例如二苯乙烯、香豆素或罗丹明激光器。在其他情况下,感兴趣的激光器包括金属蒸气激光器,例如氦镉(HeCd)激光器、氦汞(HeHg)激光器、氦硒(HeSe)激光器、氦银(HeAg)激光器、镱激光器、氖铜(NeCu)激光器、铜激光器或金激光器及其组合。在另外一些情况下,主题流式细胞仪包括固态激光器,例如红宝石激光器、Nd:YAG激光器、NdCrYAG激光器、Er:YAG激光器、Nd:YLF激光器、Nd:YVO₄激光器、Nd:YCa₄O(BO₃)₃激光器、Nd:YCOB激光器、钛蓝宝石激光器、铥YAG激光器、镱YAG激光器、Yb₂O₃激光器或铈掺杂激光器及其组合。

[0039] 根据某些实施例的激光源还可以包括一个或更多个光学调整部件。在某些实施例中,光学调整部件位于光源与流动池之间,并且可以包括任何能够改变光源照射的空间宽度或改变光源照射的其它特性(例如照射方向、波长、光束宽度、光束强度和焦斑)的设备。光学调整协议可以包括任何方便的调整光源的一个或更多个特性的设备,包括但不限于透镜、反射镜、滤波器、光纤、波长分离器、针孔、狭缝、准直协议及其组合。在某些实施例中,感兴趣的流式细胞仪包括一个或更多个聚焦透镜。在一个示例中,聚焦透镜可以是非放大透镜。在其它实施例中,感兴趣的流式细胞仪包括定位在光源与流动池之间的光纤。

[0040] 在光学调整部件被配置为移动的情况下,光学调整部件可以被配置成连续移动或以不连续的间隔(例如0.01 μ m或更大,例如0.05 μ m或更大,例如0.1 μ m或更大,例如0.5 μ m或更大,例如1 μ m或更大,例如10 μ m或更大,例如100 μ m或更大,例如500 μ m或更大,例如1mm或更大,例如5mm或更大,例如10mm或更大,并且包括25mm或更大的增量)移动。

[0041] 可以采用任何位移协议来使光学调整部件结构移动,例如耦接到可移动支撑平台或直接与电机驱动的平移平台、丝杠平移组件、齿轮平移设备耦接,其例如采用步进电机、伺服电机、无刷电机、有刷直流电机、微步进驱动电机、高分辨率步进电机以及其他类型的电机。

[0042] 光源可以定位成与流动池相距任意合适的距离,例如光源和流动池相隔0.005mm或更大,例如0.01mm或更大,例如0.05mm或更大,例如0.1mm或更大,例如0.5mm或更大,例如1mm或更大,例如5mm或更大,例如10mm或更大,例如25mm或更大,并且包括100mm或更大。此外,光源可以定位成与流动池成任何合适的角度,例如10°到90°,例如15°到85°,例如20°到80°,例如25°到75°,并且包括30°到60°,例如90°。

[0043] 如上所述,主题流式细胞仪可以包括一个或更多个物镜,该物镜包括准直透镜、聚焦透镜、放大透镜、非放大透镜或其它透镜中的一种或其组合,这些透镜被配置为从流动池的查询区接收光并生成透射到光分离部件的成像光。能够使用任何方便的光收集系统,这些光收集系统被配置为从流动池的查询区生成物镜聚焦的光。可以采用的光收集系统的示例包括美国专利No.3,960,449、No.4,347,935、No.4,667,830、No.5,245,318、No.5,464,581、No.5,483,469、No.5,602,039、No.5,643,796、No.5,700,692、No.6,372,506和No.6,809,804中描述的光收集系统,这些专利的公开内容通过引用并入本文。

[0044] 图3描绘了根据本发明的某些实施例的光收集模块的图示。如图3所示,穿过流动池301的颗粒被来自光源(未示出)的光照射。随后,来自流动池的颗粒调制的光被物镜302聚焦以生成物镜聚焦的光303。物镜聚焦的光303随后照射折射光学元件(即,棱镜304),该折射光学元件收集物镜聚焦的光303并将其投射到光纤光传输器305的表面上。

[0045] 图4呈现了经由本文描述的光收集模块收集物镜聚焦的光的模拟。如图4所示,穿

过流动池401的颗粒被来自光源(未示出)的光照射。随后,来自流动池的颗粒调制的光被物镜402聚焦以生成物镜聚焦的光403。物镜聚焦的光403随后照射折射光学元件(即,棱镜404),该折射光学元件收集物镜聚焦的光403并将其投射到光纤光传输器405的表面上。

[0046] 在另外的实施例中,主题光源包括多个激光器,例如,使得利用多个不同波长的光照射流动池中的颗粒。可以包括任何方便数量的激光器。在一些实施例中,感兴趣的光源包括1个或更多个激光器,例如2个或更多个激光器,例如3个或更多个激光器,例如4个或更多个激光器,例如5个或更多个激光器,例如10个或更多个激光器,例如15个或更多个激光器,例如25个或更多个激光器,并且包括50个或更多个激光器,这些激光器被配置为提供用于照射流动流的激光。在使用不止一个激光器的情况下,可以利用激光器同时照射或依次照射或以其组合照射样品。例如,可以利用激光器中的每个同时照射样品。在其他实施例中,利用激光器中的每个依次照射流动流。在采用不止一个光源依次照射样品的情况下,每个光源照射样品的时间可以独立地为0.001微秒或更长,例如0.01微秒或更长,例如0.1微秒或更长,例如1微秒或更长,例如5微秒或更长,例如10微秒或更长,例如30微秒或更长,并且包括60微秒或更长。例如,方法可以包括利用光源(例如,激光)照射样品,持续时间为0.001微秒到100微秒,例如0.01微秒到75微秒,例如0.1微秒到50微秒,例如1微秒到25微秒,并且包括5微秒到10微秒。在利用两个或更多个光源依次照射样品的实施例中,每个光源照射样品的持续时间可以相同或不同。

[0047] 每个激光器照射之间的时间段也可以根据期望进行变化,独立地相隔0.001微秒或更长,例如0.01微秒或更长,例如0.1微秒或更长,例如1微秒或更长,例如5微秒或更长,例如10微秒或更长,例如15微秒或更长,例如30微秒或更长,并且包括60微秒或更长的延迟。例如,每个激光器照射之间的时间段可以为0.001微秒到60微秒,例如0.01微秒到50微秒,例如0.1微秒到35微秒,例如1微秒到25微秒,并且包括5微秒到10微秒。在某些实施例中,每个激光照射之间的时间段为10微秒。在两个以上(即,3个或更多个)激光器依次照射样品的实施例中,每个激光器照射之间的延迟可以相同或不同。

[0048] 在本发明的光源包括多个激光器的实施例中,颗粒调制的光和由此生成的相应的物镜聚焦的光可以包括来自多个焦斑的光。“焦斑”是指流动池的查询区中的被主题光源中的一个或更多个激光器照射的特定区域。换言之,激光器中的每个将光聚焦在流动池的不同区域上,从而产生一系列焦斑。在一些实施例中,激光焦斑具有椭圆光束形状。在这样的实施例中,焦斑的椭圆形状使所得到的激光轮廓变平,使得流动池被峰值激光强度照射的区域变宽,从而确保流动池中的激光强度均匀。在一些实施例中,本文所述的椭圆形状焦斑是由美国临时申请No.63/094,111中描述的倾斜光束整形光学部件产生的,该临时申请的公开内容通过全文引用其并入本文。当颗粒穿过流动池查询点内的焦斑时,每个焦斑内的光被颗粒调制,由此产生对应于每个焦斑的颗粒调制的光并将其收集(例如,如上所述)。在一些实施例中,焦斑的高度为5 μm 到40 μm ,例如10 μm 到20 μm ,并且包括14 μm 到16 μm 。在一些实施例中,焦斑的高度为15 μm 。在某些实施例中,焦斑的高度被配置成使得给定大小的颗粒不会同时存在于两个焦斑中或与两个焦斑重叠。在一些实施例中,激光焦斑之间的距离不小于颗粒的大小,以防止颗粒被多个激光器同时激发。在一些实施例中,本发明涉及利用2个或更多个焦斑(例如3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、9个或更多个以及包括10个或更多个焦斑)照射流动池。因此,在一些实施例中,焦斑的数量

为2到6个,例如2个、3个、4个、5个和6个焦斑。

[0049] 例如,图5描绘了焦斑的几何形状。颗粒503被示出为位于两个焦斑501与502之间。焦斑501和焦斑502的特征均为 $15\mu\text{m}$ 的高度,而颗粒503的高度为 $5\mu\text{m}$ 。

[0050] 图6描绘了利用根据本发明的某些实施例的光收集模块收集穿过6个不同焦斑的颗粒生成的光的模拟。在流动池的查询区601中示出的激光光斑的每个具有 $15\mu\text{m}$ 的高度,并且与相邻焦斑间隔 $5\mu\text{m}$ (例如,如图5所示)。穿过焦斑中的每个的颗粒调制的光被光收集模块602收集(例如,如上所述)以供检测。

[0051] 图7A-C呈现了展示对穿过上述关于图6的6个不同焦斑中的每个的颗粒的光的不同检测的模拟。如图7A所示,穿过查询点601所示的三个顶部焦斑的颗粒引起的颗粒散射的光被折射光学元件折射并被引导到光纤光传输器上(中间面板),所得到的辐照度分布示出在右面板中。类似地,在图7B中,穿过查询点601所示的三个底部焦斑的颗粒引起的颗粒散射的光被折射光学元件折射并被引导到光纤光传输器上(中间面板),所得到的辐照度分布示出在右面板中。在图7C中,穿过查询点601所示的全部六个焦斑的颗粒引起的颗粒散射的光被折射光学元件折射并被引导到光纤光传输器上(中间面板),所得到的辐照度分布示出在右面板中。

[0052] 图8描绘了图6所示的光收集模块602的光纤光传输器的输入面处的辐照度分布。如图8所示,来自四个不同焦斑的光在辐照度分布中是很明显的。

[0053] 本发明的各方面还包括可操作地耦接到光纤光传输器的检测器组件。如上所述,主题光收集模块被配置为调制并检测颗粒调制的光(即,前向散射光、侧向散射光和荧光)。因此,在期望的情况下,上述部件可以在前向散射光通道、侧向散射光通道或荧光通道中实现。在一些实施例中,所有波长的光(例如,包括前向散射光、侧向散射光和荧光)被本文所述的光收集元件收集并且随后被引导到相关的检测器。因此,主题检测器组件可以根据期望包括前向散射光检测器、侧向散射光检测器和荧光检测器的任意组合。

[0054] 因此,流式细胞仪的各方面可以包括被配置为检测前向散射光的前向散射检测器。主题流式细胞仪中的前向散射检测器的数量可以根据期望变化。例如,主题流式细胞仪可以包括1个前向散射检测器或多个前向散射检测器,例如2个或更多个,例如3个或更多个,例如4个或更多个,以及包括5个或更多个前向散射检测器。在某些实施例中,流式细胞仪包括1个前向散射检测器。在其他实施例中,流式细胞仪包括2个前向散射检测器。

[0055] 任何方便的用于检测收集的光的检测器都可以用于本文所述的前向散射检测器。感兴趣的检测器可以包括但不限于光学传感器或检测器,例如有源像素传感器(APS)、雪崩光电二极管、图像传感器、电荷耦合设备(CCD)、增强电荷耦合设备(ICCD)、发光二极管、光子计数器、辐射热计、热电检测器、光敏电阻、光伏电池、光电二极管、光电倍增管(PMT)、光电晶体管、量子点光电导体或量子点光电二极管及其组合等。在某些实施例中,利用电荷耦合设备(CCD)、半导体电荷耦合设备(CCD)、有源像素传感器(APS)、互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器或N型金属氧化物半导体(NMOS)图像传感器来测量收集的光。在某些实施例中,检测器是光电倍增管,例如每个区域的有源检测表面积为 0.01cm^2 到 10cm^2 (例如 0.05cm^2 到 9cm^2 ,例如 0.1cm^2 到 8cm^2 ,例如 0.5cm^2 到 7cm^2 并且包括 1cm^2 到 5cm^2)的光电倍增管。

[0056] 在流式细胞仪包括多个前向散射检测器的情况下,每个检测器可以是相同的,或者检测器的集合可以是不同类型检测器的组合。例如,在主题流式细胞仪包括两个前向散

射检测器的情况下,在一些实施例中,第一前向散射检测器是CCD型设备,而第二前向散射检测器(或成像传感器)是CMOS型设备。在其他实施例中,第一前向散射检测器和第二前向散射检测器都是CCD型设备。在另外一些实施例中,第一前向散射检测器和第二前向散射检测器都是CMOS型设备。在另外一些实施例中,第一前向散射检测器是CCD型设备,而第二前向散射检测器是光电倍增管(PMT)。在另外一些实施例中,第一前向散射检测器是CMOS型设备,而第二前向散射检测器是光电倍增管。在另外一些实施例中,第一前向散射检测器和第二前向散射检测器都是光电倍增管。

[0057] 在实施例中,前向散射检测器被配置为连续测量或以不连续的间隔测量光。在一些情况下,感兴趣的检测器被配置为对收集的光进行连续测量。在其他情况下,感兴趣的检测器被配置为以不连续的间隔进行测量,例如每0.001毫秒、每0.01毫秒、每0.1毫秒、每1毫秒、每10毫秒、每100毫秒以及包括每1000毫秒或以其他间隔测量光。

[0058] 本发明的实施例还包括定位在光收集模块与前向散射检测器之间的光散射/分离器模块。感兴趣的光散射设备包括但不限于彩色玻璃、带通滤波器、干涉滤波器、二向色镜、衍射光栅、单色器及其组合,以及其他波长分离设备。在一些实施例中,带通滤波器定位在光检测模块与前向散射检测器之间。在其他实施例中,不止一个(例如2个或更多个、3个或更多个、4个或更多个,以及包括5个或更多个)带通滤波器定位在光检测模块与前向散射检测器之间。在实施例中,带通滤波器具有2nm到100nm(例如3nm到95nm,例如5nm到95nm,例如10nm到90nm,例如12nm到85nm,例如15nm到80nm,并且包括20nm到50nm)波长范围的最小带宽并且将具有其他波长的光反射到前向散射检测器。

[0059] 本发明的某些实施方案包括被配置成检测光(例如,从颗粒的表面和内部结构折射和反射的光)的侧向散射波长的侧向散射检测器。在其他实施例中,流式细胞仪包括多个侧向散射检测器,例如2个或更多个,例如3个或更多个,例如4个或更多个,以及包括5个或更多个侧向散射检测器。

[0060] 任何方便的用于检测收集的光的检测器都可以用于本文所述的侧向散射检测器。感兴趣的检测器可以包括但不限于光学传感器或检测器,例如有源像素传感器(APS)、雪崩光电二极管、图像传感器、电荷耦合设备(CCD)、增强电荷耦合设备(ICCD)、发光二极管、光子计数器、辐射热计、热电检测器、光敏电阻、光伏电池、光电二极管、光电倍增管(PMT)、光电晶体管、量子点光电导体或量子点光电二极管及其组合等。在某些实施例中,利用电荷耦合设备(CCD)、半导体电荷耦合设备(CCD)、有源像素传感器(APS)、互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器或N型金属氧化物半导体(NMOS)图像传感器来测量收集的光。在某些实施例中,检测器是光电倍增管,例如每个区域的有源检测表面积为 0.01cm^2 至 10cm^2 (例如从 0.05cm^2 至 9cm^2 ,例如从 0.1cm^2 至 8cm^2 ,例如从 0.5cm^2 至 7cm^2 并且包括从 1cm^2 至 5cm^2)的光电倍增管。

[0061] 在主题流式细胞仪包括多个侧向散射检测器的情况下,每个侧向散射检测器可以是相同的,或者侧向散射检测器的集合可以是不同类型检测器的组合。例如,在主题流式细胞仪包括两个侧向散射检测器的情况下,在一些实施例中,第一侧向散射检测器是CCD型设备,而第二侧向散射检测器(或成像传感器)是CMOS型设备。在其他实施例中,第一侧向散射检测器和第二侧向散射检测器都是CCD型设备。在另外一些实施例中,第一侧向散射检测器和第二侧向散射检测器都是CMOS型设备。在另外一些实施例中,第一侧向散射检测器是CCD

型设备,而第二侧向散射检测器是光电倍增管(PMT)。在另外一些实施例中,第一侧向散射检测器是CMOS型设备,而第二侧向散射检测器是光电倍增管。在另外一些实施例中,第一侧向散射检测器和第二侧向散射检测器都是光电倍增管。

[0062] 本发明的实施例还包括定位在光检测模块与侧向散射检测器之间的光散射/分离器模块。感兴趣的光散射器件包括但不限于彩色玻璃、带通滤波器、干涉滤波器、二向色镜、衍射光栅、单色器及其组合,以及其他波长分离设备。

[0063] 在实施例中,主题流式细胞仪还包括被配置为检测光的一个或更多个荧光波长的荧光检测器。在其他实施例中,流式细胞仪包括多个荧光检测器,例如2个或更多个,例如3个或更多个,例如4个或更多个,5个或更多个,10个或更多个,15个或更多个,以及包括20个或更多个荧光检测器。

[0064] 任何方便的用于检测收集的光的检测器都可以用于本文所述的荧光检测器。感兴趣的检测器可以包括但不限于光学传感器或检测器,例如有源像素传感器(APS)、雪崩光电二极管、图像传感器、电荷耦合设备(CCD)、增强电荷耦合设备(ICCD)、发光二极管、光子计数器、辐射热计、热电检测器、光敏电阻、光伏电池、光电二极管、光电倍增管(PMT)、光电晶体管、量子点光电导体或量子点光电二极管及其组合等。在某些实施例中,利用电荷耦合设备(CCD)、半导体电荷耦合设备(CCD)、有源像素传感器(APS)、互补金属氧化物半导体(CMOS)图像传感器或N型金属氧化物半导体(NMOS)图像传感器来测量收集的光。在某些实施例中,检测器是光电倍增管,例如每个区域的有源检测表面积为 0.01cm^2 到 10cm^2 (例如 0.05cm^2 到 9cm^2 ,例如 0.1cm^2 到 8cm^2 ,例如 0.5cm^2 到 7cm^2 并且包括 1cm^2 到 5cm^2)的光电倍增管。

[0065] 在主题流式细胞仪包括多个荧光检测器的情况下,每个荧光检测器可以是相同的,或者荧光检测器的集合可以是不同类型检测器的组合。例如,在主题流式细胞仪包括两个荧光检测器的情况下,在一些实施例中,第一荧光检测器是CCD型设备,而第二荧光检测器(或成像传感器)是CMOS型设备。在其他实施例中,第一荧光检测器和第二荧光检测器都是CCD型设备。在另外一些实施例中,第一荧光检测器和第二荧光检测器都是CMOS型设备。在另外一些实施例中,第一荧光检测器是CCD型设备,而第二荧光检测器是光电倍增管(PMT)。在另外一些实施例中,第一荧光检测器是CMOS型设备,而第二荧光检测器是光电倍增管。在另外一些实施例中,第一荧光检测器和第二荧光检测器都是光电倍增管。

[0066] 本发明的实施例还包括定位在光检测模块与荧光检测器之间的光散射/分离器模块。感兴趣的光散射器件包括但不限于彩色玻璃、带通滤波器、干涉滤波器、二向色镜、衍射光栅、单色器及其组合,以及其他波长分离设备。

[0067] 在本公开的实施例中,感兴趣的荧光检测器被配置成测量在一个或更多个波长下的收集的光,例如在2个或更多个波长下,例如在5个或更多个不同波长下,例如在10个或更多个不同波长下,例如在25个或更多个不同波长下,例如在50个或更多个不同波长下,例如在100个或更多个不同波长下,例如在200个或更多个不同波长下,例如在300个或更多个不同波长下的收集的光,以及包括测量流动流中的样品发射的在400个或更多个不同波长下的光。在一些实施例中,如本文所述的流式细胞仪中的2个或更多个检测器被配置成测量相同波长或重叠波长的收集的光。

[0068] 在一些实施例中,感兴趣的荧光检测器被配置为测量一定波长范围(例如,200nm-1000nm)内的收集的光。在某些实施例中,感兴趣的检测器被配置成收集一定波长范围内的

光的光谱。例如,流式细胞仪可以包括一个或更多个检测器,这些检测器被配置为收集200nm-1000nm的一个或更多个波长范围内的光的光谱。在另外一些实施例中,感兴趣的检测器被配置为测量流动流中的样品发出的在一个或更多个特定波长下的光。例如,流式细胞仪可以包括一个或更多个检测器,这些检测器被配置为测量在450nm、518nm、519nm、561nm、578nm、605nm、607nm、625nm、650nm、660nm、667nm、670nm、668nm、695nm、710nm、723nm、780nm、785nm、647nm、617nm及其任意组合中的一个或更多个波长下的光。在某些实施例中,一个或更多个检测器可以被配置成与特定荧光团配对,例如与在荧光分析中与样品一起使用的特定荧光团配对。

[0069] 合适的流式细胞术系统可以包括但不限于在Ormerod(ed.),Flow Cytometry:A Practical Approach,Oxford Univ.Press(1997)、Jaroszeski et al.(eds.),Flow Cytometry Protocols,Methods in Molecular Biology No.91,Humana Press(1997)、Practical Flow Cytometry,3rd ed.,Wiley-Liss(1995)、Virgo,et al.(2012)Ann Clin Biochem.Jan;49(pt 1):17-28、Linden,et.al.,Semin Throm Hemost.2004Oct;30(5):502-11、Alison,et al.J Pathol,2010Dec;222(4):335-344以及Herbig,et al.(2007) Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.24(3):203-255中描述的流式细胞术系统,这些文献的内容通过引用并入本文。在某些情况下,感兴趣的流式细胞术系统包括:BD Biosciences FACSCanto™流式细胞仪、BD Biosciences FACSCanto™ II流式细胞仪、BD Accuri™流式细胞仪、BD Accuri™ C6 Plus流式细胞仪、BD Biosciences FACSCelesta™流式细胞仪、BD Biosciences FACSLyric™流式细胞仪、BD Biosciences FACSVerse™流式细胞仪、BD Biosciences FACSymphony™流式细胞仪、BD Biosciences LSRFortessa™流式细胞仪、BD Biosciences LSRFortessa™ X-20流式细胞仪、BD Biosciences FACSPresto™流式细胞仪、BD Biosciences FACSVia™流式细胞仪和BD Biosciences FACSCalibur™细胞分选仪、BD Biosciences FACSCount™细胞分选仪、BD Biosciences FACSLyric™细胞分选仪、BD Biosciences Via™细胞分选仪、BD Biosciences Influx™细胞分选仪、BD Biosciences Jazz™细胞分选仪、BD Biosciences Aria™细胞分选仪、BD Biosciences FACS Aria™ II细胞分选仪、BD Biosciences FACS Aria™ III细胞分选仪、BD Biosciences FACS Aria™ Fusion细胞分选仪和BD Biosciences FACSMelody™细胞分选仪、BD Biosciences FACSymphony™ S6细胞分选仪等。

[0070] 在一些实施例中,主题系统是流式细胞术系统,例如在美国专利No.10,663,476、No.10,620,111、No.10,613,017、No.10,605,713、No.10,585,031、No.10,578,542、No.10,578,469、No.10,481,074、No.10,302,545、No.10,145,793、No.10,113,967、No.10,006,852、No.9,952,076、No.9,933,341、No.9,726,527、No.9,453,789、No.9,200,334、No.9,097,640、No.9,095,494、No.9,092,034、No.8,975,595、No.8,753,573、No.8,233,146、No.8,140,300、No.7,544,326、No.7,201,875、No.7,129,505、No.6,821,740、No.6,813,017、No.6,809,804、No.6,372,506、No.5,700,692、No.5,643,796、No.5,627,040、No.5,620,842、No.5,602,039、No.4,987,086、No.4,498,766中描述的流式细胞术系统,这些专利的公开内容通过全文引用并入本文。

[0071] 在某些情况下,本发明的流式细胞术系统被配置为通过使用射频标记发射(FIRE)荧光成像来对流动流中的颗粒进行成像,例如在Diebold,etal.Nature Photonics Vol.7

(10); 806-810 (2013) 以及美国专利No. 9,423,353、No. 9,784,661、No. 9,983,132、No. 10,006,852、No. 10,078,045、No. 10,036,699、No. 10,222,316、No. 10,288,546、No. 10,324,019、No. 10,408,758、No. 10,451,538、No. 10,620,111以及美国专利公开No. 2017/0133857、No. 2017/0328826、No. 2017/0350803、No. 2018/0275042、No. 2019/0376895和No. 2019/0376894中所描述的,这些公开内容通过引用并入本文。

[0072] 图9示出了根据本发明的说明性实施例的用于流式细胞术的系统900。系统900包括流式细胞仪910、控制器/处理器990和存储器995。流式细胞仪910包括一个或更多个激发激光器915a-915c、流动池925、物镜901、折射光学元件902、光纤光传输器903、前向散射检测器930、侧向散射检测器935、荧光收集透镜940、一个或更多个分束器945a-945g、一个或更多个带通滤波器950a-950e、一个或更多个长通(“LP”)滤波器955a-955b以及一个或更多个荧光检测器960a-960f。

[0073] 激发激光器915a-915c发射激光束形式的光。在图9的示例系统中,从激发激光器915a-915c发射的激光束的波长分别为488nm、633nm和325nm。激光束首先被引导穿过分束器945a和945b中的一个或更多个。分束器945a透射488nm的光并反射633nm的光。分束器945b透射UV光(波长为10至400nm的光)并反射488nm和633nm的光。

[0074] 然后,激光束被引导到流动池925内流体流的样品颗粒所在的部分上。例如,如上所述,激光束在流动池的查询点内产生焦斑。流动池是流体系统的一部分,其将流中的颗粒(通常一次一个)引导到聚焦的激光束以供查询。

[0075] 来自激光束的光与样品中的颗粒通过衍射、折射、反射、散射和吸收相互作用,根据颗粒的特性(例如其大小、内部结构以及附接至颗粒或自然存在于颗粒上或颗粒中的一个或更多个荧光分子的存在)以各种不同的波长再发射。以这种方式被颗粒调制的激光随后被物镜901聚焦到折射光学元件902上,该折射光学元件收集物镜聚焦的光并将其投射到光纤光传输器903上。荧光发射以及衍射光、折射光、反射光和散射光可以经由光纤光传输器903穿过分束器945a-945g、带通滤波器950a-950e、长通滤波器955a-955b和荧光收集透镜940中的一个或更多个发送至前向散射检测器930、侧向散射检测器935中的一个或更多个以及一个或更多个荧光检测器960a-960f。

[0076] 荧光收集透镜940收集来自颗粒-激光束相互作用而发射的光,朝向一个或更多个分束器和滤波器发送该光。带通滤波器(例如带通滤波器950a-950e)允许窄范围的波长通过滤波器。例如,带通滤波器950a是510/20滤波器。第一个数字表示光谱带的中心。第二个数字提供光谱带的范围。因此,510/20滤波器在光谱带中心的每一侧延伸10nm,或者从500nm延伸到520nm。短通滤波器透射波长等于或小于指定波长的光。长通滤波器(例如长通滤波器955a-955b)透射波长等于或大于指定波长的光。例如,长通滤波器955a是670nm长通滤波器,其透射等于或大于670nm的光。通常选择滤波器以优化检测器对特定荧光染料的特异性。滤波器能够被配置为使得透射到检测器的光的光谱带接近荧光染料的发射峰。

[0077] 分束器将不同波长的光沿不同方向引导。分束器能够通过诸如短通和长通的滤波器特性来表征。例如,分束器945g是620SP分束器,这意味着分束器945g透射波长为620nm或更短的光,并沿不同方向反射波长大于620nm的光。在一个实施例中,分束器945a-945g能够包括光学反射镜,例如二向色镜。

[0078] 前向散射检测器930被定位成轴偏离穿过流动池的直射光束,并且被配置成检测

衍射光,主要沿前向方向穿过或围绕颗粒传播的激发光。前向散射检测器检测到的光的强度取决于颗粒的整体大小。前向散射检测器能够包括光电二极管。侧向散射检测器935被配置成检测来自颗粒表面和内部结构的折射光和反射光,并且倾向于随着颗粒结构复杂性的增加而增加。来自与颗粒相关联的荧光分子的荧光发射能够由一个或更多个荧光检测器960a-960f检测。侧向散射检测器935和荧光检测器能够包括光电倍增管。在前向散射检测器930、侧向散射检测器935和荧光检测器处检测到的信号能够由检测器转换成电子信号(电压)。该数据能够提供有关样品的信息。

[0079] 在操作中,细胞仪操作由控制器/处理器990控制,并且来自检测器的测量数据能够存储在存储器995中并由控制器/处理器990处理。尽管未明确示出,但控制器/处理器990耦合到检测器以从检测器接收输出信号,并且还可以耦合到流式细胞仪900的电气和机电部件以控制激光器、流体流动参数等。还可以在系统中提供输入/输出(I/O)能力997。存储器995、控制器/处理器990和I/O 997可以完全作为流式细胞仪910的集成部分提供。在这样的实施例中,显示器还可以形成用于向细胞仪900的用户呈现实验数据的I/O能力997的一部分。替代地,存储器995和控制器/处理器990以及I/O能力中的一些或全部可以是一个或更多个外部设备(例如通用计算机)的一部分。在一些实施例中,存储器995和控制器/处理器990中的一些或全部能够与细胞仪910进行无线通信或有线通信。控制器/处理器990连同存储器995和I/O 997能够被配置成执行与流式细胞仪实验的准备和分析相关的各种功能。

[0080] 图9所示的系统包括六个不同的检测器,这些检测器检测在如由从流动池925到每个检测器的光束路径中的滤波器和/或分离器的配置所定义的六个不同波长带(这里可以称为给定检测器的“滤波窗”)中的荧光。用于流式细胞仪实验的不同荧光分子会发射在其自身的特征波长带中的光。用于实验的特定荧光标签及其相关联的荧光发射带可以被选择为大体上与检测器的滤波窗一致。然而,随着提供更多的检测器,以及使用更多的标签,滤波窗和荧光发射光谱之间的完美对应是不可能的。一般来说,尽管特定荧光分子的发射光谱的峰可能位于一个特定检测器的滤波窗内,但该标签的一些发射光谱也会与一个或更多个其他检测器的滤波窗重叠。可以将这称为溢出。I/O 997能被配置成接收关于流式细胞仪实验的数据,该流式细胞仪实验具有一组荧光标签和具有多个标记的多个细胞群,每个细胞群具有多个标记的子集。I/O 997还能够被配置成接收将一个或更多个标记分配给一个或更多个细胞群的生物数据、标记密度数据、发射光谱数据、将标签分配给一个或更多个标记的数据以及细胞仪配置数据。流式细胞仪实验数据(例如标签光谱特性和流式细胞仪配置数据)也能够存储在存储器995中。控制器/处理器990能够被配置成评估标签对标记的一个或更多个分配。

[0081] 本领域技术人员将认识到,根据本发明的实施例的流式细胞仪不限于图9所示的流式细胞仪,而是能够包括本领域已知的任何流式细胞仪。例如,流式细胞仪可以具有任意数量的各种波长和各种不同配置的激光器、分束器、滤波器和检测器。

[0082] 图10示出了用于分析和显示数据的处理器1000的一个示例的功能框图。处理器1000能够被配置成实现用于控制生物事件的图形显示的各种过程。流式细胞仪1002能够被配置成通过分析生物样品(例如,如上所述)来获取流式细胞仪数据。流式细胞仪能被配置成向处理器1000提供生物事件数据。能够在流式细胞仪1002与处理器1000之间包括数据通信通道。能够经由数据通信通道向处理器1000提供数据。处理器1000能被配置成向显示器

1006提供包括图表(例如,如上所述)的图形显示。处理器1000还能被配置成渲染在由显示设备1006示出的流式细胞仪数据群周围的门,例如叠加在图表上。在一些实施例中,门能够是在单个参数直方图或双变量图表上绘制的一个或更多个感兴趣图形区域的逻辑组合。在一些实施例中,显示器能够用于显示分析物参数或饱和检测器数据。

[0083] 处理器1000还能被配置成与门外的生物事件数据中的其他事件不同地在显示设备1006上显示门内的生物事件数据。例如,处理器1000能被配置成对包含在门内的流式细胞仪数据的颜色进行渲染,以区别于门外的流式细胞仪数据的颜色。以这种方式,处理器1000可以被配置成渲染不同的颜色以表示每个独特的数据群。显示设备1006能够被实现为监视器、平板电脑、智能手机或被配置成呈现图形界面的其它电子设备。

[0084] 处理器1000能被配置成从第一输入设备接收识别门的门选择信号。例如,第一输入设备能够被实现为鼠标1010。鼠标1010能够向处理器1000发起门选择信号,以识别要显示在显示设备1006上显示或经由显示设备1006操纵的群体(例如,当光标定位在期望门处时,通过在期望门上或期望门内点击)。在一些实施方式中,第一输入设备能够被实现为键盘1008或用于向处理器1000提供输入信号的其它装置,例如触摸屏、触控笔、光学检测器或语音识别系统。一些输入设备能够包含多个输入功能。在这样的实施方式中,输入功能能够均被视为输入设备。例如,如图10所示,鼠标1010能够包括鼠标右键和鼠标左键,该鼠标右键和该鼠标左键中的每个能够生成触发事件。

[0085] 触发事件能够使处理器1000改变荧光流式细胞仪数据的显示方式(数据的哪些部分被实际显示在显示设备1006上)和/或向另外的处理提供输入(例如选择感兴趣的群体以供分析)。

[0086] 在一些实施例中,处理器1000能被配置成检测何时鼠标1010发起门选择。处理器1000还能被配置成自动修改图表可视化以促进门控过程。修改能够基于处理器1000接收的数据的特定分布。

[0087] 处理器1000能够连接到存储设备1004。存储设备1004能够被配置成从处理器1000接收并存储数据。存储设备1004还能被配置成允许处理器1000检索数据(例如,流式细胞仪数据)。

[0088] 显示设备1006能被配置成从处理器1000接收显示数据。显示数据能够包括荧光流式细胞仪数据的图表和概述图表部分的门。显示设备1006还能够被配置成根据从处理器1000接收的输入并结合来自仪器1002、存储设备1004、键盘1008和/或鼠标1010的输入来改变所呈现的信息。

[0089] 在一些实施方式中,处理器1000能够生成用户界面以接收用于分选的示例事件。例如,用户界面能够包括用于接收示例事件或示例图像的控件。能够在收集样品的事件数据之前或者基于样品的一部分的初始事件集提供示例事件或示例图像或示例门。

[0090] 在包括光收集模块的流式细胞仪中分析样品的方法

[0091] 本公开的各方面包括在流式细胞仪中分析样品的方法,该流式细胞仪具有光源、物镜和光收集模块,该光源用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒,该物镜用于聚焦颗粒调制的光,该光收集模块用于收集物镜聚焦的光。在某些实施例中,用于收集物镜聚焦的光的光收集模块包括光纤光传输器和定位在物镜与光纤光传输器之间的折射光学元件。

[0092] 在一些情况下,在本方法中分析的样品是生物样品。术语“生物样品”以其常规含

义使用,是指整个生物体、植物、真菌或者在某些情况下可在血液、粘液、淋巴液、滑液、脑脊液、唾液、支气管肺泡灌洗液、羊水、羊脐带血、尿液、阴道液和精液中发现的动物组织、细胞或组成部分的子集。因此,“生物样品”既指天然生物体或其组织的子集,也指从生物体或其组织的子集制备的匀浆、裂解物或提取物,包括但不限于例如血浆、血清、脊髓液、淋巴液、皮肤切片、呼吸道、胃肠道、心血管以及泌尿生殖道、眼泪、唾液、奶、血细胞、肿瘤、器官。生物样品可以是任何类型的有机体组织,包括健康组织和患病组织(例如,癌性组织、恶性组织、坏死组织等)。在某些实施例中,生物样品是液体样品,例如血液或血液衍生物,例如血浆、眼泪、尿液、精液等,其中在一些情况下,样品是血液样品,包括全血,例如从静脉穿刺或指尖获得的血液(血液可能会或可能不会在测定前与任何试剂(例如,防腐剂、抗凝剂等)混合)。

[0093] 在某些实施例中,样品的来源是“哺乳动物”或“哺乳类动物”,其中这些术语广泛用于描述属于哺乳动物纲的生物体,包括食肉动物(例如,狗和猫)、啮齿动物(例如,小鼠、豚鼠和大鼠)和灵长类动物(例如,人类、黑猩猩和猴子)。在一些情况下,受试者是人类。该方法可以应用于从两种性别以及处于任何发育阶段(即,新生儿、婴儿、少年、青少年、成人)的人类受试者获得的样品,其中在某些实施例中,人类受试者是少年、青少年或成人。虽然本发明可以应用于来自人类受试者的样品,但应当理解,这些方法也可以在来自其他动物受试者(即,在“非人类受试者”中)的样品上进行,例如但不限于鸟、小鼠、大鼠、狗、猫、家畜和马。

[0094] 如上所述,本发明的各方面涉及在流式细胞仪中分析样品,该流式细胞仪包括光源、物镜和光收集模块,该光源用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒,该物镜用于聚焦颗粒调制的光,该光收集模块用于收集物镜聚焦的光。“收集”物镜聚焦的光是指采集流动池中的颗粒在对其进行照射后所调制的光,使得光能够传输到一组检测器以供检测。在一些情况下,颗粒调制的光是前向散射光。在另外一些情况下,颗粒调制的光是侧向散射光。在另外一些情况下,颗粒调制的光是荧光。在另外一些情况下,颗粒调制的光包含前向散射光、侧向散射光和荧光的某种组合。在某些实施例中,由物镜所聚焦并由光收集模块收集的颗粒散射的光包括前向散射光、侧向散射光和荧光。如本文所讨论的,“流动池”在其传统意义上被描述为是指含有用于在鞘液中输送颗粒的液体流的部件,例如吸收池。本文所讨论的“查询点”是指流动池内的一个区域,在该区域内,来自光源的光照射颗粒以供分析。查询点的大小可以根据期望来变化。例如,其中 $0\mu\text{m}$ 表示光源发射的光的光轴线,查询点的范围可以为 $-50\mu\text{m}$ 到 $50\mu\text{m}$,例如 $-25\mu\text{m}$ 到 $40\mu\text{m}$,并且包括 $-15\mu\text{m}$ 到 $30\mu\text{m}$ 。

[0095] 在实施例中,主题光收集模块包括光纤光传输器。如本文所述,“光纤光传输器”在其传统意义上被描述为是指用于将光从材料的一端传送到另一端的透明材料。在某些实施例中,光纤光传输器被配置为将从自流动池收集的颗粒调制的光(例如,前向散射光、侧向散射光和/或荧光)传输到一个或更多个检测器。在一些实施例中,透明材料包括玻璃。在其它实施例中,透明材料包括塑料。在一些实施例中,光纤光传输器是单模光纤。在其他情况下,光纤光传输器是多模光纤。光纤光传输器的直径可以根据期望变化。在一些实施例中,主题光纤光传输器的直径范围为 0.1mm 至 3mm ,例如 0.2mm 至 2.5mm 、 0.3mm 至 2.2mm 、 0.4mm 至 2mm 、 0.5mm 至 1.5mm ,并且包括 0.6mm 至 1.2mm 。在一些情况下,光纤光传输器的直径为 0.8mm 。在一些实施例中,光纤光传输器包括单个光纤光传输器。换言之,在主题流式细胞仪包括多

个激光器的情况下,来自每个激光器的光被收集使得其被单个光纤光传输器传输到检测器,即,与流式细胞仪包含多个光纤并且每个激光器发射的光被相应的光纤接收的布置相反。

[0096] 在另外的实施例中,主题光收集模块包括折射光学元件。在某些情况下,折射光学元件定位在物镜与光纤光传输器之间。在一些实施例中,折射光学元件位于距光纤光传输器10mm或更小(例如5mm或更小、2mm或更小、1mm或更小、0.5mm或更小、0.1mm或更小、0.05mm或更小、0.001mm)的位置,以及包括折射光学元件和光纤光传输器处于物理接触的位置。在这样的实施例中,折射光学元件被配置成收集物镜聚焦的光并将收集的物镜聚焦的光投射到光纤光传输器的表面上,使得光可以被传输到检测器组件中的一个或更多检测器。如本文所讨论的,“折射”在其传统意义上被描述为是指光在穿过介质后改变其方向。因此,在实施例中,折射光学元件被配置成改变物镜聚焦的光的方向,使得光沿单个光轴线传播并照射光纤光传输器的表面。在一些情况下,物镜聚焦的光被收集,使得物镜聚焦的光中的70%或更多(例如80%或更多、90%或更多、95%或更多、97%或更多,并且包括99%或更多)照射光纤光传输器的表面并且随后被传输到检测器组件中的一个或更多检测器。在实施例中,折射光学元件的折射提供了额外的光功率,用于将物镜聚焦的光耦合到光纤光传输器中。

[0097] 任何方便的折射和收集光的设备都可以用作主题折射光学元件。在一些实施例中,折射光学元件是棱镜。本文所讨论的“棱镜”在其传统意义上被描述为是指被配置为折射光的透明光学元件。感兴趣的折射光学元件可以包括任何合适的形状,包括但不限于:直线横截面形状,例如正方形、长方形、梯形、三角形、六边形等;曲线横截面形状,例如圆形、椭圆形等;以及不规则形状,例如耦合到平面顶部的抛物线底部等。在其它实施例中,折射光学元件包括柱面透镜。在这样的实施例中,透镜被配置成收集物镜聚焦的光并将物镜聚焦的光投射到光纤光传输器的表面上。

[0098] 在一些实施例中,折射光学元件的折射率为从1至3,例如1.1到2.9,例如1.2到2.8,例如1.3到2.7,例如1.4到2.6,例如1.5到2.7,例如1.6到2.6,例如1.7到2.5,例如1.8到2.4,并且包括1.9到2.3。根据期望的透明度,感兴趣的折射光学元件可以由任何合适的材料形成,包括但不限于玻璃(例如,N-SF10、N-SF11、N-SF57、N-BK7、N-LAK21或N-LAF35玻璃)、二氧化硅(例如,熔融二氧化硅)、石英、晶体(例如,CaF₂晶体)、硒化锌(ZnSe)、F₂、钛酸锆(例如,S-TIH11)、硼硅酸盐(例如,BK7)。在一些实施例中,折射光学元件具有150nm到5 μ m、180nm到8 μ m、185nm到2.1 μ m、200nm到6 μ m、200nm到11 μ m、250nm到1.6 μ m、350nm到2 μ m、600nm到16 μ m、1.2 μ m到8 μ m、2 μ m到16 μ m或其他波长范围的透明窗口。

[0099] 在一些情况下,由折射光学元件折射的光继续沿平行于光源确立的光轴线的轴线传播。在其它实施例中,由折射光学元件折射的光可以沿相对于光源确立的光轴线具有一偏转角度的轴线传播。在这样的实施例中,偏转范围可以为0.001弧分到10弧分,例如0.005弧分到9弧分,例如0.01弧分到8弧分,例如0.05弧分到7弧分,例如0.1弧分到6弧分,例如0.5弧分到5弧分,并且包括1弧分到3弧分。在一些实施例中,光分离部件提供5弧分或更小(例如4弧分或更小,例如3弧分或更小,例如2弧分或更小,例如1弧分或更小,例如0.5弧分或更小,例如0.1弧分或更小,例如0.05弧分或更小,例如0.01弧分或更小,例如0.005弧分或更小,例如0.001弧分或更小,并且包括0.0001弧分或更小)的光束偏转。

[0100] 折射光学元件可以在任何合适的距离处被颗粒调制的光照射,例如在距流动池0.001mm或更远(例如0.005mm或更远,例如0.01mm或更远,例如0.05mm或更远,例如0.1mm或更远,例如0.5mm或更远,例如1mm或更远,例如5mm或更远,例如10mm或更远,例如25mm或更远,并且包括100mm或更远)的距离处。同样地,折射光学元件可以被流动池发射的颗粒调制的光以任何合适的角度照射,例如照射的入射角度为 10° 到 90° ,例如 15° 到 85° ,例如 20° 到 80° ,例如 25° 到 75° ,并且包括 30° 到 60° 。

[0101] 如上所述,本发明的各方面还包括利用光源照射样品。任何方便的光源都可以用作本文所述的光源。在一些实施例中,光源是激光器。在实施例中,激光器可以是任何方便的激光器,例如连续波激光器。例如,激光器可以是二极管激光器,例如紫外二极管激光器、可见光二极管激光器和近红外二极管激光器。在其它实施例中,激光器可以是氦氖(HeNe)激光器。在一些情况下,激光器是气体激光器,例如氦氖激光器、氩激光器、氦激光器、氩激光器、氦激光器、 CO_2 激光器、CO激光器、氩氟(ArF)准分子激光器、氪氟(KrF)准分子激光器、氙氟(XeCl)准分子激光器或氙氟(XeF)准分子激光器或其组合。在其它情况下,主题流式细胞仪包括染料激光器,例如二苯乙烯、香豆素或罗丹明激光器。在其他情况下,感兴趣的激光器包括金属蒸气激光器,例如氦镉(HeCd)激光器、氦汞(HeHg)激光器、氦硒(HeSe)激光器、氦银(HeAg)激光器、铯激光器、氖铜(NeCu)激光器、铜激光器或金激光器及其组合。在另外一些情况下,主题流式细胞仪包括固态激光器,例如红宝石激光器、Nd:YAG激光器、NdCrYAG激光器、Er:YAG激光器、Nd:YLF激光器、Nd:YVO₄激光器、Nd:YCa₄O(BO₃)₃激光器、Nd:YCOB激光器、钛蓝宝石激光器、铥YAG激光器、镱YAG激光器、Yb₂O₃激光器或铈掺杂激光器及其组合。

[0102] 根据某些实施例的激光源还可以包括一个或更多个光学调整部件。在某些实施例中,光学调整部件位于光源与流动池之间,并且可以包括任何能够改变光源照射的空间宽度或改变光源照射的其它特性(例如照射方向、波长、光束宽度、光束强度和焦斑)的设备。光学调整协议可以包括任何方便的调整光源的一个或更多个特性的设备,包括但不限于透镜、反射镜、滤波器、光纤、波长分离器、针孔、狭缝、准直协议及其组合。在某些实施例中,感兴趣的流式细胞仪包括一个或更多个聚焦透镜。在一个示例中,聚焦透镜可以是非放大透镜。在其它实施例中,感兴趣的流式细胞仪包括定位在光源与流动池之间的光纤。

[0103] 在光学调整部件被配置为移动的情况下,光学调整部件可以被配置为连续移动或以不连续的间隔(例如0.01 μm 或更大,例如0.05 μm 或更大,例如0.1 μm 或更大,例如0.5 μm 或更大,例如1 μm 或更大,例如10 μm 或更大,例如100 μm 或更大,例如500 μm 或更大,例如1mm或更大,例如5mm或更大,例如10mm或更大,并且包括25mm或更大的增量)移动。

[0104] 可以采用任何位移协议来使光学调整部件结构移动,例如耦接到可移动支撑平台或直接与电机驱动的平移平台、丝杠平移组件、齿轮平移设备耦接,其是例如采用步进电机、伺服电机、无刷电机、有刷直流电机、微步进驱动电机、高分辨率步进电机以及其他类型的电机。

[0105] 激光器定位成与流动池相距任意合适的距离,例如光源和流动池相隔0.005mm或更大,例如0.01mm或更大,例如0.05mm或更大,例如0.1mm或更大,例如0.5mm或更大,例如1mm或更大,例如5mm或更大,例如10mm或更大,例如25mm或更大,并且包括100mm或更大。此外,光源可以定位成与流动池成任何合适的角度,例如 10° 到 90° ,例如 15° 到 85° ,例如 20° 到

80°,例如25°到75°,并且包括30°到60°,例如90°。

[0106] 在另外的实施例中,方法包括利用多个激光器照射样品,例如,使得利用多个不同波长的光照射流动池中的颗粒。可以包括任何方便数量的激光器。在一些实施例中,感兴趣的光源包括1个或更多个激光器,例如2个或更多个激光器,例如3个或更多个激光器,例如4个或更多个激光器,例如5个或更多个激光器,例如10个或更多个激光器,例如15个或更多个激光器,例如25个或更多个激光器,并且包括50个或更多个激光器,这些激光器被配置为提供用于照射流动流的激光。在使用不止一个激光器的情况下,可以利用激光器同时照射或依次照射或以其组合照射样品。例如,可以利用激光器中的每个同时照射样品。在其他实施例中,利用激光器中的每个依次照射流动流。在采用不止一个光源依次照射样品的情况下,每个光源照射样品的时间可以独立地为0.001微秒或更长,例如0.01微秒或更长,例如0.1微秒或更长,例如1微秒或更长,例如5微秒或更长,例如10微秒或更长,例如30微秒或更长,并且包括60微秒或更长。例如,方法可以包括利用光源(例如,激光)照射样品,持续时间为0.001微秒到100微秒,例如0.01微秒到75微秒,例如0.1微秒到50微秒,例如1微秒到25微秒,并且包括5微秒到10微秒。在利用两个或更多个光源依次照射样品的实施例中,每个光源照射样品的持续时间可以相同或不同。

[0107] 每个激光器照射之间的时间段也可以根据期望进行变化,独立地相隔0.001微秒或更长,例如0.01微秒或更长,例如0.1微秒或更长,例如1微秒或更长,例如5微秒或更长,例如10微秒或更长,例如15微秒或更长,例如30微秒或更长,并且包括60微秒或更长的延迟。例如,每个激光器照射之间的时间段可以为0.001微秒到60微秒,例如0.01微秒到50微秒,例如0.1微秒到35微秒,例如1微秒到25微秒,并且包括5微秒到10微秒。在某些实施例中,每个激光照射之间的时间段为10微秒。在两个以上(即,3个或更多个)激光器依次照射样品的实施例中,每个激光器照射之间的延迟可以相同或不同。

[0108] 在本发明的光源包括多个激光器的实施例中,颗粒调制的光和由此生成的相应的物镜聚焦的光可以包括来自多个焦斑的光。“焦斑”是指流动池的查询区中的被主题光源中的一个或更多个激光器照射的特定区域。换言之,激光器中的每个将光聚焦在流动池的不同区域上,从而产生一系列焦斑。在一些实施例中,激光焦斑具有椭圆光束形状。在这样的实施例中,焦斑的椭圆形状使所得到激光轮廓变平,使得流动池被峰值激光强度照射的区域变宽,从而确保流动池中的激光强度均匀。在一些实施例中,本文所述的椭圆形状焦斑是由美国临时申请No.63/094,111中描述的倾斜光束整形光学部件产生的,该临时申请的公开内容通过全文引用并入本文。当颗粒穿过流动池查询点内的焦斑时,每个焦斑内的光被颗粒调制,由此产生对应于每个焦斑的颗粒调制的光并将其收集(例如,如上所述)。在一些实施例中,焦斑的高度为5 μm 到40 μm ,例如10 μm 到20 μm ,并且包括14 μm 到16 μm 。在一些实施例中,焦斑的高度为15 μm 。在某些实施例中,焦斑的高度被配置成使得给定大小的颗粒不会同时存在于两个焦斑中或与两个焦斑重叠。在一些实施例中,激光焦斑之间的距离不小于颗粒的大小,以防止颗粒被多个激光器同时激发。在一些实施例中,本发明涉及利用2个或更多个焦斑照射流动池(例如使用3个或更多个、4个或更多个、5个或更多个、6个或更多个、7个或更多个、9个或更多个以及包括10个或更多个焦斑)照射流动池。因此,在一些实施例中,焦斑的数量为2到6个,例如2个、3个、4个、5个和6个焦斑。

[0109] 本发明的各方面还包括经由检测器组件检测由光收集模块收集的光。如上所述,

主题光收集模块被配置为调制并检测颗粒调制的光(即,前向散射光、侧向散射光和荧光)。因此,在期望的情况下,上述部件可以在前向散射光通道、侧向散射光通道或荧光通道中实现。在一些实施例中,所有波长的光(例如,包括前向散射光、侧向散射光和荧光)被本文所述的光收集模块收集并且随后被引导到相关的检测器。因此,主题检测器组件可以根据期望包括前向散射光检测器、侧向散射光检测器和荧光检测器的任意组合。

[0110] 计算机控制系统

[0111] 本公开的各方面还包括计算机控制系统,其中系统还包括用于完全自动化或部分自动化的一个或更多个计算机。在一些实施例中,系统包括具有计算机可读存储介质的计算机,该计算机可读存储介质上存储有计算机程序,其中计算机程序在加载到计算机上时包括用于接收和分析流式细胞仪数据的指令,该流式细胞仪数据是从流式细胞仪中的颗粒照射中收集的,该流式细胞仪包括具有光纤光传输器和折射光学元件的光收集模块。

[0112] 在实施例中,系统包括输入模块,处理模块和输出模块。主题系统可以包括硬件部件和软件部件,其中硬件部件可以采取一个或更多个平台的形式(例如服务器的形式),使得功能性元件,即执行系统的特定任务(例如管理信息的输入和输出、处理信息等)的系统的那些元件可以通过在由系统表示的一个或更多个计算机平台上并且跨一个或更多个计算机平台执行软件应用来进行。

[0113] 系统可以包括显示器和操作员输入设备。操作员输入设备可以是例如键盘、鼠标等。处理模块包括处理器,该处理器可以访问存储器,该存储器具有在其上存储的用于执行主题方法的步骤的指令。处理模块可以包括操作系统、图形用户界面(GUI)控制器、系统存储器、存储器存储设备和输入输出控制器、高速缓冲存储器、数据备份单元以及许多其他设备。处理器可以是市售处理器,也可以是已经或将要可用的其他处理器之一。处理器以众所周知的方式执行操作系统和操作系统与固件和硬件的接口,并便于处理器协调和执行各种计算机程序的功能,这些计算机程序可以用本领域已知的各种编程语言(例如Java、Perl、C++、其他高级或低级语言,以及它们的组合)编写。操作系统(通常与处理器协作)协调并执行计算机的其他部件的功能。操作系统还根据已知技术提供调度、输入输出控制、文件和数据管理、存储器管理以及通信控制和相关服务。处理器可以是任何合适的模拟或数字系统。在一些实施例中,处理器包括模拟电子器件,该模拟电子器件允许用户基于第一光信号和第二光信号将光源与流动流手动地对齐。在一些实施例中,处理器包括提供反馈控制(例如负反馈控制)的模拟电子器件。

[0114] 系统存储器可以是各种已知或未来的存储器存储设备中的任何一种。示例包括任何常用的随机存取存储器(RAM)、磁介质(例如常驻(resident)硬盘或磁带)、光学介质(例如读写光盘)、闪存设备或其他存储器存储设备。存储器存储设备可以是各种已知的或未来的设备中的任何一种,包括光盘驱动器、磁带驱动器、可移动硬盘驱动器或软盘驱动器。这种类型的存储器存储设备通常从程序存储介质(未示出)读取和/或向程序存储介质写入,例如,分别为光盘、磁带、可移动硬盘或软盘。这些程序存储介质中的任何一种或现在使用或将来可能开发的其他程序存储介质都可以被认为是计算机程序产品。应当理解,这些程序存储介质通常存储计算机软件程序和/或数据。计算机软件程序(也称为计算机控制逻辑)通常存储在系统存储器和/或与存储器存储设备结合使用的程序存储设备中。

[0115] 在一些实施例中,描述了计算机程序产品,包括其中存储有控制逻辑(计算机软件

程序,包括程序代码)的计算机可用介质。控制逻辑在由计算机处理器执行时使处理器执行本文描述的功能。在其他实施例中,一些功能主要使用例如硬件状态机在硬件中实现。实现硬件状态机以执行本文所述的功能对于相关领域的技术人员来说将是显而易见的。

[0116] 存储器可以是处理器能够在其中存储和检索数据的任何合适的设备,例如磁、光或固态存储设备(包括磁盘或光盘或磁带或RAM,或任何其他合适的设备,无论是固定的还是便携式的)。处理器可以包括通用数字微处理器,该通用微处理器从携带必要程序代码的计算机可读介质适当编程。编程能够通过通信信道远程提供给处理器,或者预先保存在计算机程序产品中,例如使用与存储器连接的那些设备的任一个的一些其他便携式或固定计算机可读存储介质或存储器。例如,磁盘或光盘可以携载编制程序,并且能够由磁盘写入器/读取器读取。本发明的系统还包括编程(例如,用于实践上述方法的计算机程序产品、算法形式的编程)。根据本发明的编程能够记录在计算机可读介质上(例如记录在能够由计算机直接读取和访问的任何介质上)。此类介质包括但不限于:磁存储介质,如软盘、硬盘存储介质和磁带;光存储介质,如CD-ROM;电存储介质,如RAM和ROM;便携式闪存驱动器;以及这些类别的混合,例如磁/光存储介质。

[0117] 处理器还可以访问通信信道以与远程位置的用户通信。远程位置是指用户不直接与系统接触,并将输入信息从外部设备(例如连接到广域网(WAN)、电话网络、卫星网络或任何其他合适的通信信道的计算机,包括移动电话(即智能手机))中继到输入管理器。

[0118] 在一些实施例中,根据本公开的系统可以被配置为包括通信接口。在一些实施例中,通信接口包括用于与网络和/或另一设备通信的接收器和/或发射器。通信接口能够被配置用于有线或无线通信,包括但不限于射频(RF)通信(例如,射频识别(RFID))、Zigbee通信协议、WiFi、红外、无线通用串行总线(USB)、超宽带(UWB)、**Bluetooth®**通信协议和蜂窝通信(例如码分多址(CDMA)或全球移动通信系统(GSM))。

[0119] 在一个实施例中,通信接口被配置为包括一个或更多个通信端口,例如物理端口或接口(如USB端口、RS-232端口或任何其他合适的电气连接端口),以允许主题系统与其他外部设备(例如配置用于类似的补充数据通信的计算机终端(例如,在医生办公室或医院环境中))之间的数据通信。

[0120] 在一个实施例中,通信接口被配置用于红外通信、**Bluetooth®**通信或任何其他合适的无线通信协议,以使主题系统能够与其他设备(例如计算机终端和/或网络、支持通信的移动电话、个人数字助手,或者用户可以结合使用的任何其他通信设备)通信。

[0121] 在一个实施例中,通信接口被配置为提供连接,该连接通过蜂窝电话网络、短消息服务(SMS)、连接到互联网的局域网(LAN)上的个人计算机(PC)的无线连接或在WiFi热点处的与互联网的WiFi连接,利用互联网协议(IP)进行数据传输。

[0122] 在一个实施例中,主题系统被配置为通过通信接口(例如,使用诸如802.11或**Bluetooth®RF**协议或IrDA红外协议的通用标准)与服务器设备无线通信。服务器设备可以是另一个便携式设备,例如智能电话、个人数字助手(PDA)或笔记本电脑;或大型设备,例如台式电脑、电器等。在一些实施例中,服务器设备具有显示器(例如液晶显示器(LCD))以及输入设备(例如按钮、键盘、鼠标或触摸屏)。

[0123] 在一些实施例中,通信接口被配置为使用上述通信协议和/或机制中的一个或更多个与网络或服务器设备自动或半自动地传送存储在主题系统中(例如存储在可选数据存

储单元中)的数据。

[0124] 输出控制器可以包括用于向用户(无论是人还是机器,无论是本地的还是远程的)呈现信息的各种已知显示设备中的任何一种的控制器。如果显示设备之一提供了视觉信息,则该信息通常可以逻辑上和/或物理上被组织为图片元素的阵列。图形用户界面(GUI)控制器可以包括用于在系统与用户之间提供图形输入和输出界面以及用于处理用户输入的各种已知或未来软件程序中的任何一种。计算机的功能元件可以经由系统总线彼此通信。这些通信中的一些可以在替代实施例中使用网络或其他类型的远程通信来实现。根据已知技术,输出管理器还可以例如通过互联网、电话或卫星网络向远程位置的用户提供由处理模块生成的信息。输出管理器对数据的呈现可以根据各种已知技术来实现。作为一些示例,数据可以包括SQL、HTML或XML文档、电子邮件或其他文件,或其他形式的数据。数据可以包括互联网URL地址,使得用户可以从远程源检索附加的SQL、HTML、XML或其他文档或数据。主题系统中存在的一个或多个平台可以是任何类型的已知计算机平台或将要开发的类型,尽管它们通常将是计算机的一类(通常称为服务器)。然而,它们也可以是大型计算机、工作站或其他计算机类型。它们可以通过任何已知或未来类型的线缆或包括无线系统的其他通信系统连接,无论是联网的还是以其他方式。它们可以是同地的,也可以在物理上分开。可能取决于所选择的计算机平台的类型和/或品牌,可以在任何计算机平台上采用各种操作系统。适当的操作系统包括Windows NT、Windows XP、Windows 7、Windows 8、iOS、Oracle Solaris、Linux、OS/400、Compaq Tru64 Unix、SGI IRIX、Siemens Reliant Unix等。

[0125] 图11描绘了根据某些实施例的示例计算设备1100的总体架构。图11中描绘的计算设备1100的总体架构包括计算机硬件和软件部件的布置。然而,为了提供有利的公开,没有必要示出所有这些通常常规的元件。如图所示,计算设备1100包括处理单元1110、网络接口1120、计算机可读介质驱动器1130、输入/输出设备接口1140、显示器1150和输入设备1160,所有这些都可以通过通信总线相互通信。网络接口1120可以提供与一个或多个网络或计算系统的连接性。处理单元1110因此可以经由网络从其它计算系统或服务接收信息和指令。处理单元1110还可以与存储器1170通信,并且还可以经由输入/输出设备接口1140为可选的显示器1150提供输出信息。例如,作为可执行指令存储在分析系统的非暂时性存储器中的分析软件(例如,数据分析软件或程序(诸如FlowJo®))能够向用户显示流式细胞术事件数据。输入/输出设备接口1140还可以接收来自可选输入设备1160(例如键盘、鼠标、数字笔、麦克风、触摸屏、手势识别系统、语音识别系统、游戏手柄、加速度计、陀螺仪或其它输入设备)的输入。

[0126] 存储器1170可以包含处理单元1110执行以实现一个或多个实施例的计算机程序指令(在一些实施例中被分组为模块或部件)。存储器1170通常包括RAM、ROM和/或其他永久性、辅助性或非暂时性计算机可读介质。存储器1170可以储存操作系统1172,该操作系统提供计算机程序指令以供处理单元1110在计算设备1100的一般管理和操作中使用。数据可以被存储在数据存储设备1190中。存储器1170还可以包括用于实现本公开的各方面的计算机程序指令和其它信息。

[0127] 实用性

[0128] 主题流式细胞仪和方法可用于各种应用,在这些应用中期望提高确定生物样品中

分析物(例如,细胞、颗粒)参数的分辨率和准确性。主题流式细胞仪和方法特别适用于期望通过提供更小的系统尺寸、更小的系统重量和更低的功耗来降低流式细胞仪复杂性。例如,本公开能够用于减少光收集和检测所需的光纤部件的数量。主题流式细胞仪和方法还可用于在具有多个焦斑的流动池中分析颗粒,这通过确保激光光斑之间的距离不小于颗粒的大小来防止来自多个激光器的同时激发,并将来自流动池的颗粒调制的光收集到单个光纤光传输器中。

[0129] 本公开能够用来表征许多类型的分析物,特别是与医学诊断或护理患者的方案相关的分析物,包括但不限于:蛋白质(包括游离蛋白质和结合到结构(例如,细胞)表面的蛋白质)、核酸、病毒颗粒等。此外,样品能够来自体外或体内,并且样品能够是诊断样品。

[0130] 套件

[0131] 本公开的各方面还包括套件,其中套件包括具有折射光学元件和光纤光传输器的一个或多个光收集模块。在一些实施例中,主题套件包括用于在现有流式细胞术系统中实现的折射光学元件和光纤传输器。在这样的实施例中,套件可以包括用于移除现有流式细胞术系统中的光学部件(例如,光纤组)的指令,使得这些光学部件可以被具有折射光学元件和光纤光传输器的主题光收集模块取代。包含在套件中的指令还可以提供将光纤光传输器可操作地耦接到检测器组件中的一个或多个检测器的指令,使得由光纤光传输器传输的光被检测。

[0132] 本文所描述的指令可以包括在存储介质上,例如软盘、硬盘、光盘、磁光盘、CD-ROM、CD-R、磁带、非易失性存储卡、ROM、DVD-ROM、蓝光盘、固态盘和网络连接存储(NAS)上。这些程序存储介质中的任何一种或现在正在使用或以后可能开发的其他介质都可以包括在主题套件中。这些指令可以以多种形式存在于主题套件中,这些形式中的一种或更多种可以存在于套件中。这些指令可以呈现的一种形式是作为合适的介质或基材(例如,在套件的包装中、在包装插页中等其上印刷有信息的一张或多张纸)上的打印信息。这些指令的另一种形式是记录有信息的计算机可读介质,例如软盘、光盘(CD)、便携式闪存驱动器等。这些指令可以呈现的另一种形式是网站地址,该网站地址可以通过互联网访问被移除的站点的信息。

[0133] 尽管有所附权利要求,本公开还由以下条款定义:

[0134] 1. 一种流式细胞仪,包括:

[0135] 光源,用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒;

[0136] 物镜,用于聚焦颗粒调制的光;和

[0137] 光收集模块,用于收集物镜聚焦的光,其中所述光收集模块包括:

[0138] 光纤光传输器;和

[0139] 定位在所述物镜与所述光纤光传输器之间的折射光学元件,其中所述折射光学元件被配置为将物镜聚焦的光引导到所述光纤光传输器的表面上。

[0140] 2. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中所述折射光学元件为棱镜。

[0141] 3. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中所述折射光学元件为柱面透镜。

[0142] 4. 根据条款1至3中任一项所述的流式细胞仪,其中所述折射光学元件与所述流动池相隔一距离,所述距离为40mm到200mm。

[0143] 5. 根据条款1至4中任一项所述的流式细胞仪,其中所述折射光学元件被配置为折

射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播。

[0144] 6. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中所述光纤光传输器的直径为0.6mm到1.2mm。

[0145] 7. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中所述光源被配置为在查询点处同时照射穿过所述流动池的多个颗粒。

[0146] 8. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括来自位于所述流动池的查询点内的多个焦斑的光。

[0147] 9. 根据条款8所述的流式细胞仪,其中所述多个焦斑为2到6个焦斑。

[0148] 10. 根据条款8或9所述的流式细胞仪,其中来自所述多个焦斑中的每个的光被引导到所述光纤光传输器的表面上。

[0149] 11. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括荧光。

[0150] 12. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括前向散射光。

[0151] 13. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中物镜聚焦的光包括侧向散射光。

[0152] 14. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中所述光收集模块还包括可操作地耦接到所述光纤光传输器的检测器组件。

[0153] 15. 根据条款14所述的流式细胞仪,其中所述检测器组件包括荧光检测器。

[0154] 16. 根据条款15所述的流式细胞仪,其中所述检测器组件包括第二荧光检测器。

[0155] 17. 根据条款14所述的流式细胞仪,其中所述检测器组件包括前向散射光检测器。

[0156] 18. 根据条款14所述的流式细胞仪,其中所述检测器组件包括侧向散射光检测器。

[0157] 19. 根据条款1所述的流式细胞仪,其中所述光源包括激光器。

[0158] 20. 根据条款19所述的流式细胞仪,其中所述光源包括第二激光器。

[0159] 21. 一种分析样品的方法,所述方法包括:

[0160] (a) 将样品引入流式细胞仪中,所述流式细胞仪包括:

[0161] 光源,用于在查询点处照射穿过流动池的颗粒;

[0162] 物镜,用于聚焦颗粒调制的光;和

[0163] 光收集模块,用于收集物镜聚焦的光,其中所述光收集模块包括:

[0164] 光纤光传输器;和

[0165] 定位在所述物镜与所述光纤光传输器之间的折射光学元件,其中所述折射光学元件被配置为将物镜聚焦的光引导到所述光纤光传输器的表面上;和

[0166] (b) 对所述样品进行流式细胞术分析。

[0167] 22. 根据条款21所述的方法,其中所述折射光学元件为棱镜。

[0168] 23. 根据条款21所述的方法,其中所述折射光学元件为柱面透镜。

[0169] 24. 根据条款21至23中任一项所述的方法,其中所述折射光学元件与所述流动池相隔一距离,所述距离为40mm到200mm。

[0170] 25. 根据条款21至24中任一项所述的方法,其中所述折射光学元件被配置为折射物镜聚焦的光使其沿单个光轴线传播。

[0171] 26. 根据条款21所述的方法,其中所述光纤光传输器的直径为0.6mm到1.2mm。

[0172] 27. 根据条款21所述的方法,其中所述光源被配置为在查询点处同时照射穿过所述流动池的多个颗粒。

[0173] 28. 根据条款21所述的方法,其中物镜聚焦的光包括来自位于所述流动池的查询

点内的多个焦斑的光。

[0174] 29. 根据条款28所述的方法,其中所述多个焦斑为2到6个焦斑。

[0175] 30. 根据条款28或29所述的方法,其中来自所述多个焦斑中的每个的光被引导到所述光纤光传输器的表面上。

[0176] 31. 根据条款1所述的方法,其中物镜聚焦的光包括荧光。

[0177] 32. 根据条款1所述的方法,其中物镜聚焦的光包括前向散射光。

[0178] 33. 根据条款1所述的方法,其中物镜聚焦的光包括侧向散射光。

[0179] 34. 根据条款1所述的方法,其中所述光收集模块还包括可操作地耦接到所述光纤光传输器的检测器组件。

[0180] 35. 根据条款34所述的方法,其中所述检测器组件包括荧光检测器。

[0181] 36. 根据条款35所述的方法,其中所述检测器组件包括第二荧光检测器。

[0182] 37. 根据条款34所述的方法,其中所述检测器组件包括前向散射光检测器。

[0183] 38. 根据条款34所述的方法,其中所述检测器组件包括侧向散射光检测器。

[0184] 39. 根据条款21所述的方法,其中所述光源包括激光器。

[0185] 40. 根据条款39所述的方法,其中所述光源包括第二激光器。

[0186] 尽管为了清楚理解的目的,已经通过图示和示例的方式对上述发明进行了一些详细描述,但是根据本发明的教导,对于本领域普通技术人员来说显而易见的是,在不脱离所附权利要求的精神或范围的情况下,可以对其进行一些改变和修改。

[0187] 因此,前面仅说明了本发明的原理。应当理解,本领域技术人员将能够设计出各种装置,这些装置尽管本文没有明确地描述或示出,但体现了本发明的原理并且被包括在其精神和范围内。此外,本文中列举的所有示例和条件语言主要旨在帮助读者理解本发明的原理和发明人为促进本领域而贡献的概念,并且应被解释为不限于这些具体列举的示例和条件。此外,本文中引用本发明的原理、方面和实施例及其具体示例的所有陈述旨在涵盖其结构和功能等效物。此外,这些等效物旨在包括当前已知的等效物和未来开发的等效物,即,所开发的执行相同功能的任何元件,无论结构如何。此外,无论本文公开内容是否在权利要求中明确记载,本文所公开的任何内容均不旨在献给公众。

[0188] 因此,本发明的范围不旨在限于本文所示和描述的示例性实施例。相反,本发明的范围和精神由所附权利要求书体现。在权利要求书中,35U.S.C. §112(f) 或35U.S.C. §112(6) 被明确定义为仅当权利要求书的此类限制开始引用确切短语“用于…的装置”或确切短语“用于…的步骤”时,才援引权利要求中的限制;如果在权利要求中的限制中没有使用这样的确切短语,则不援引35U.S.C. §112(f) 或35U.S.C. §112(6)。

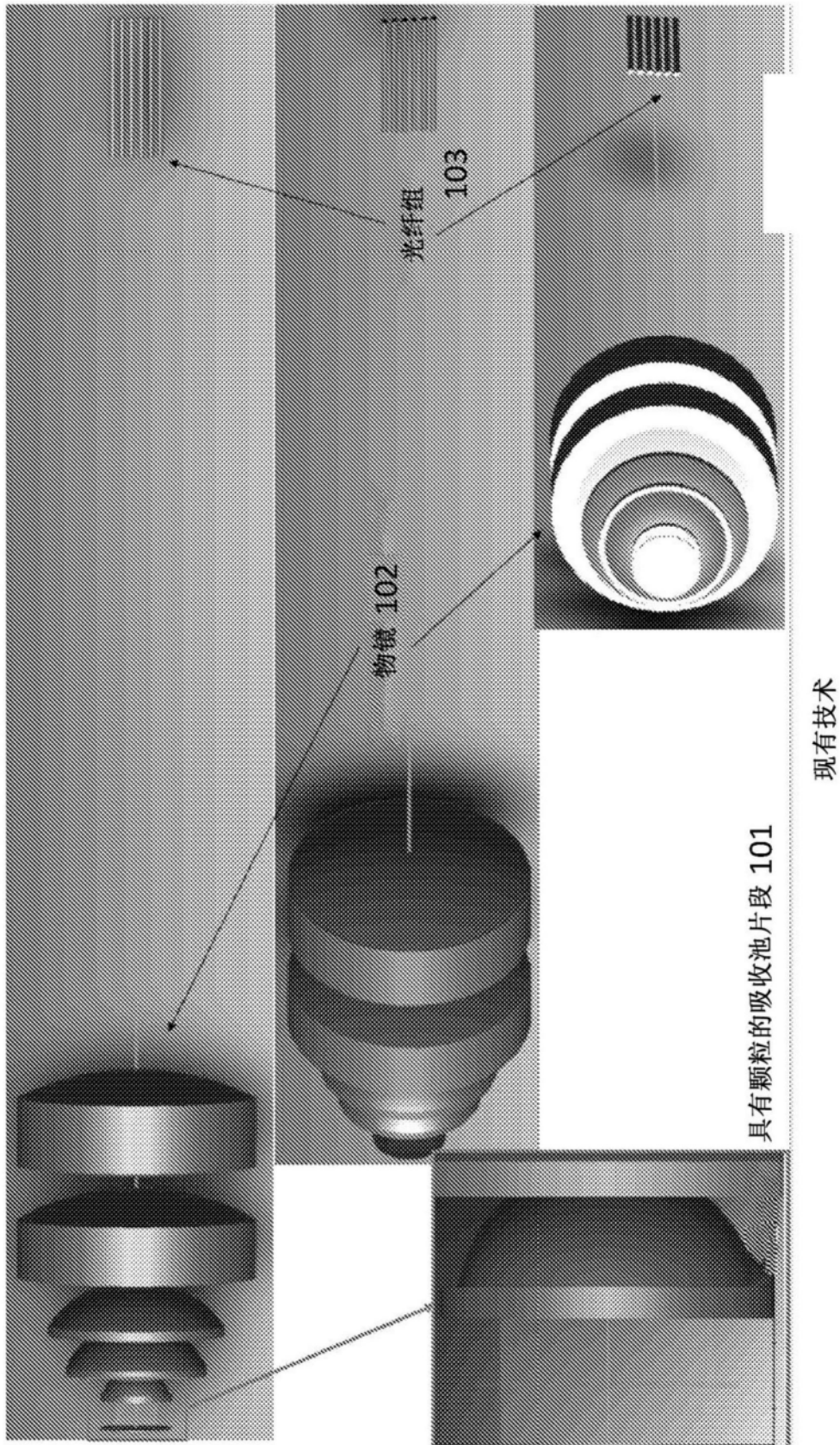


图1

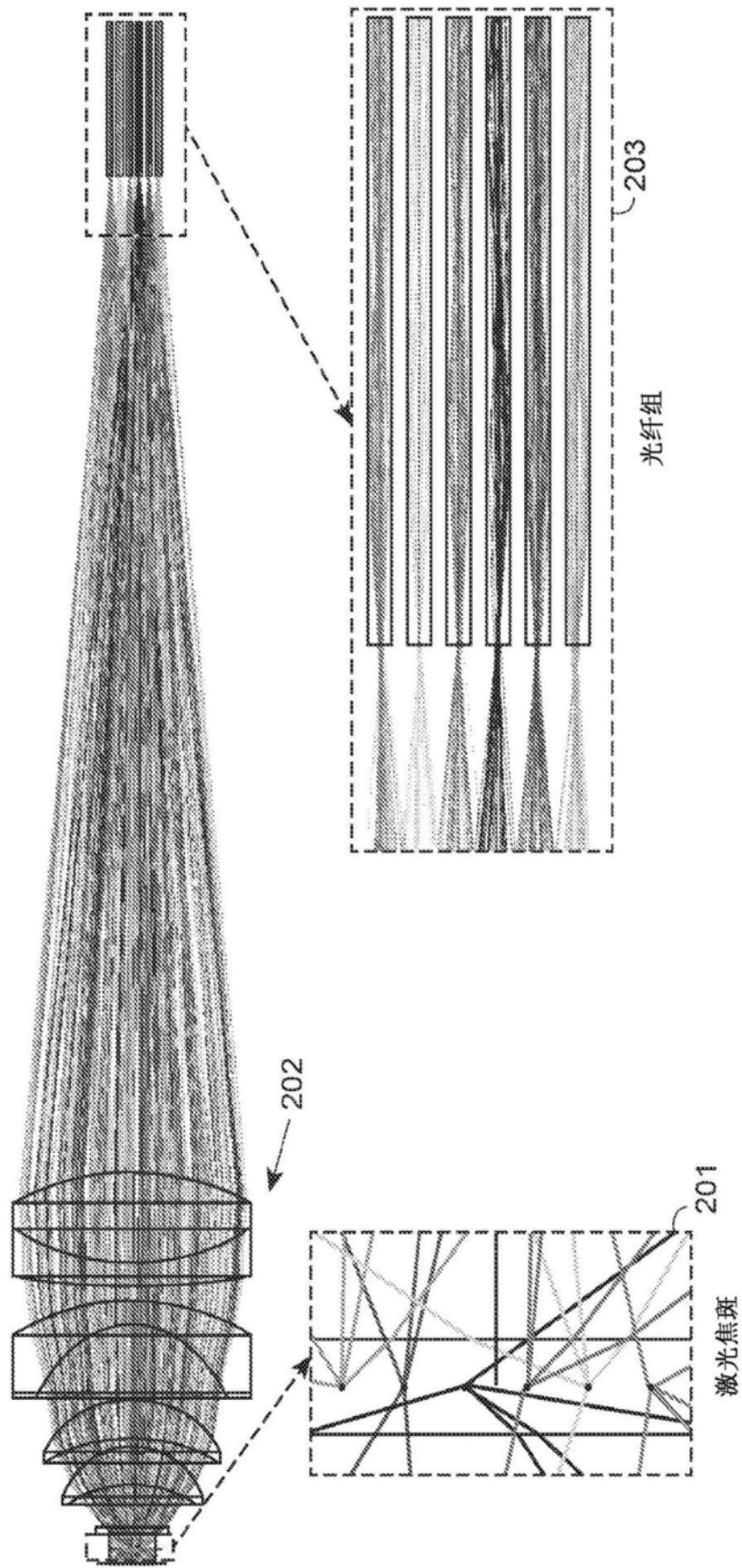


图2

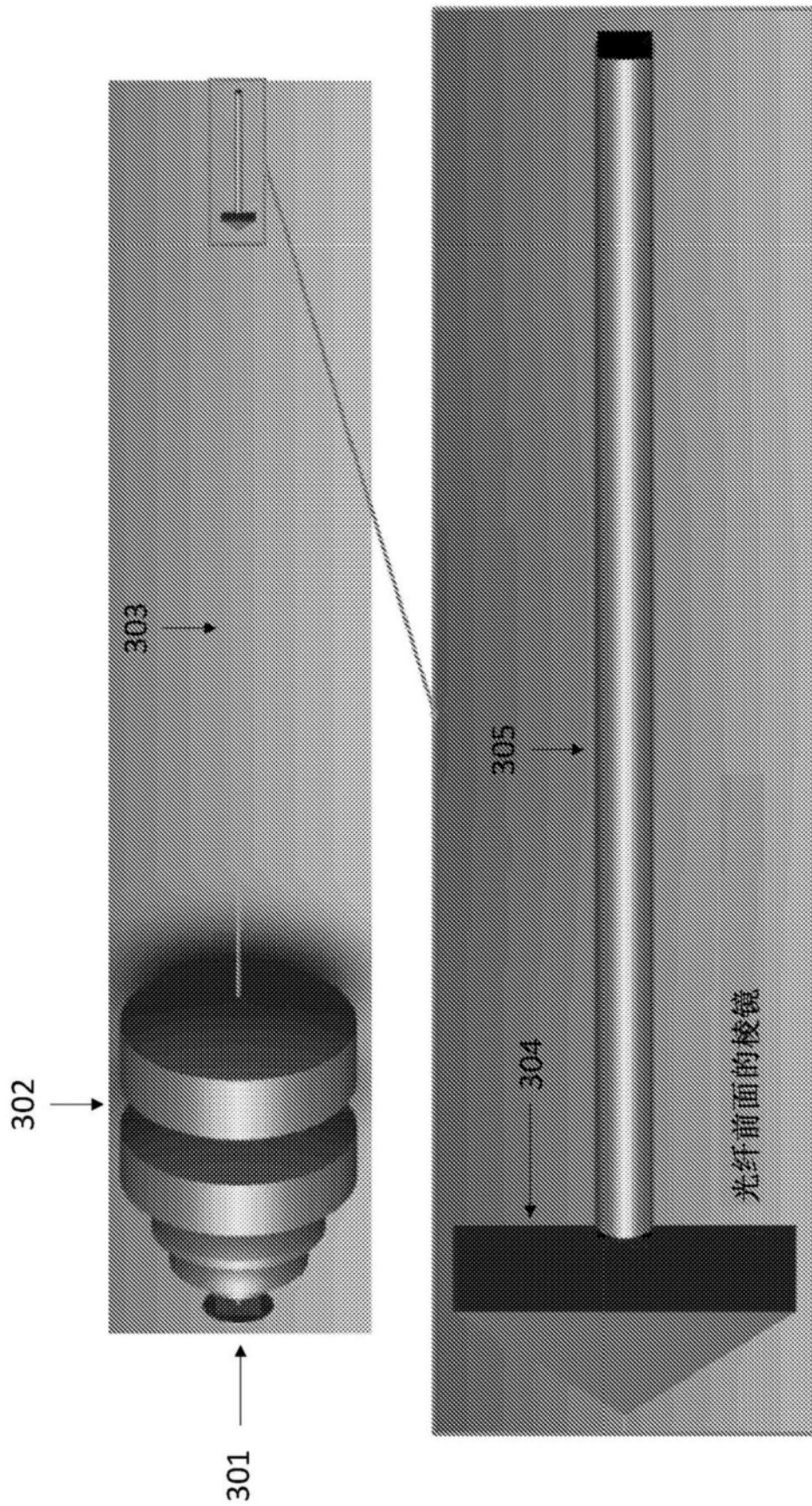


图3

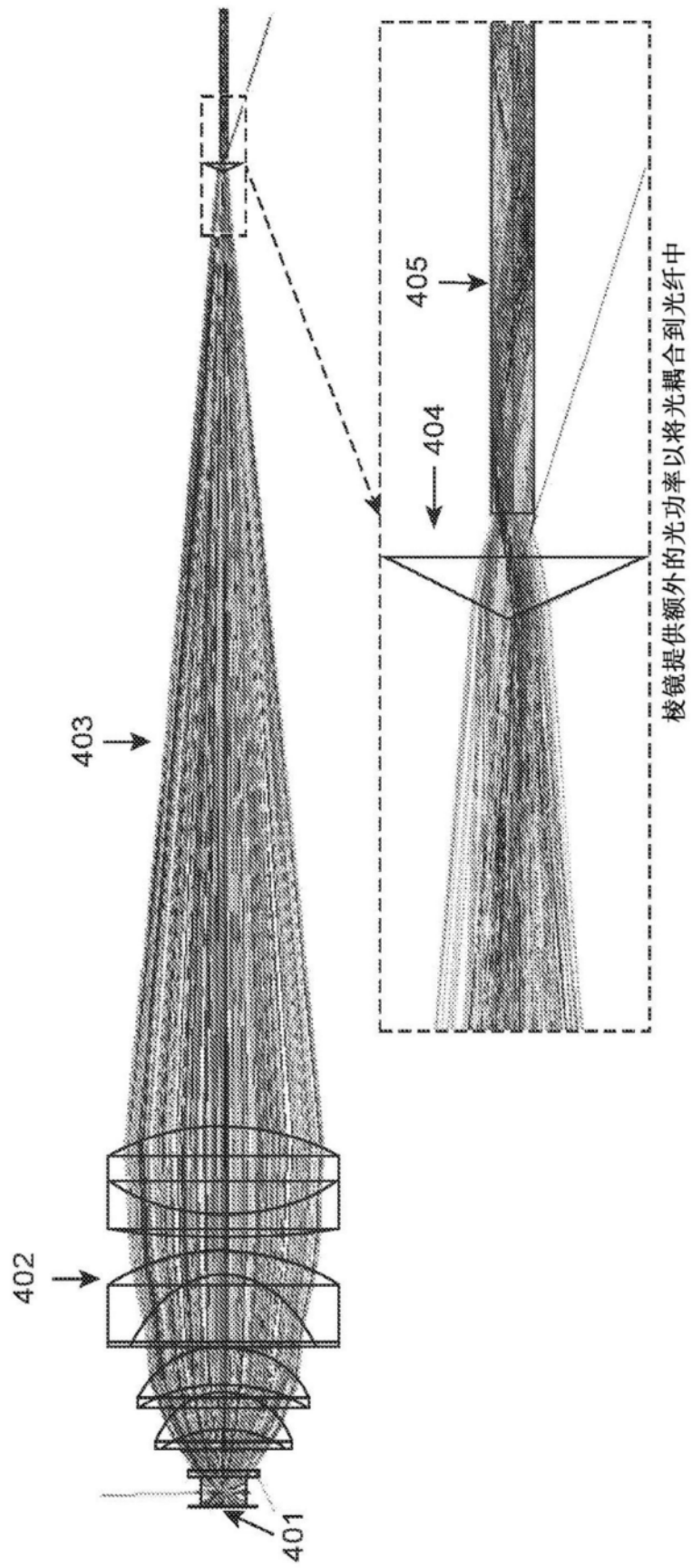


图4

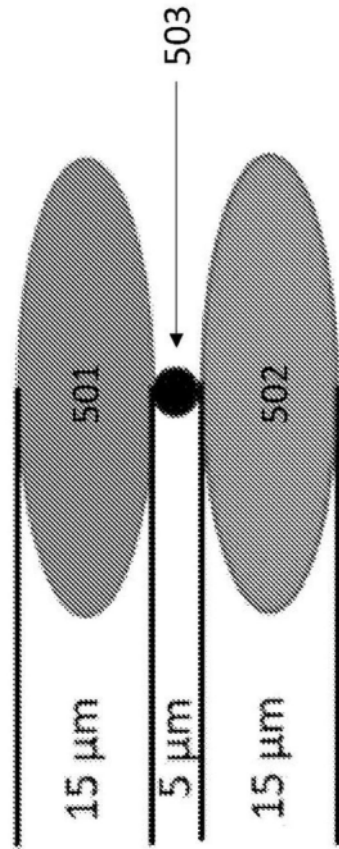


图5

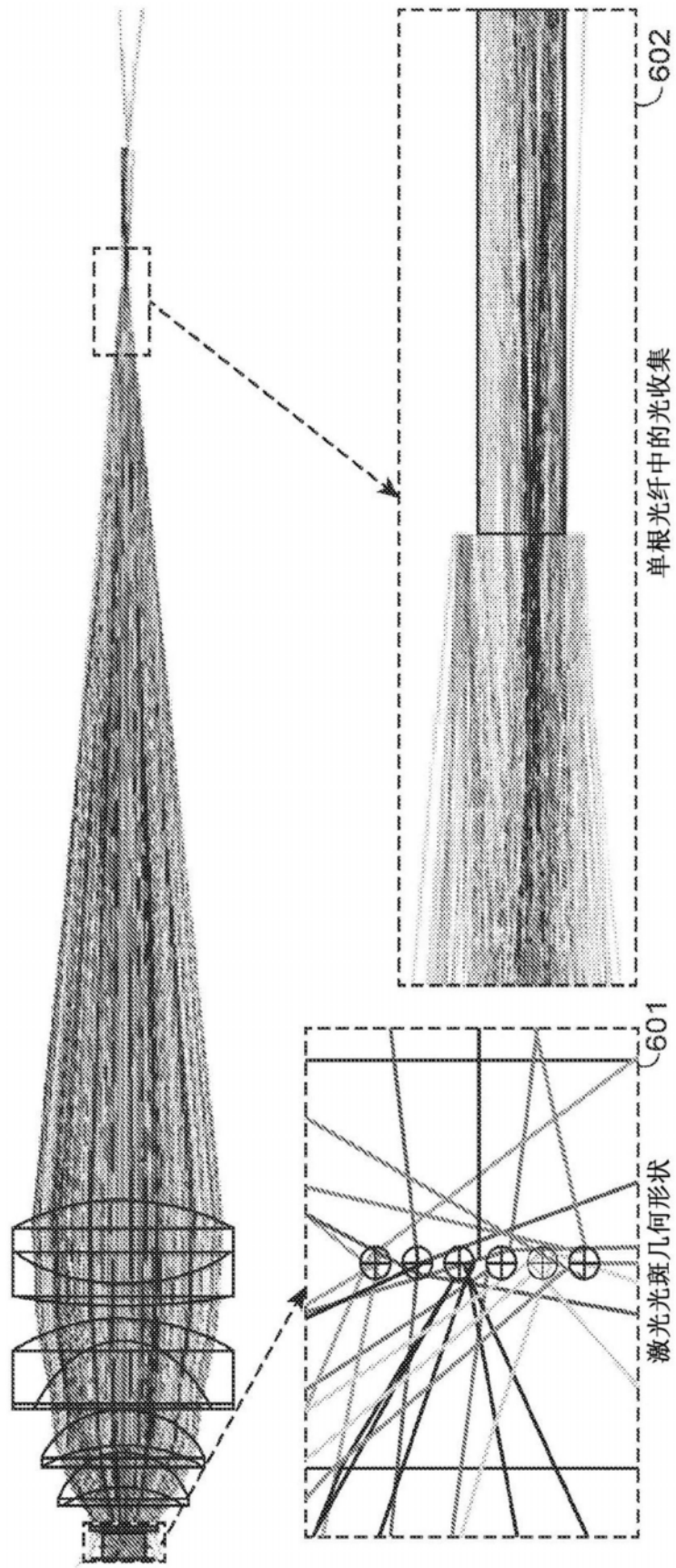


图6

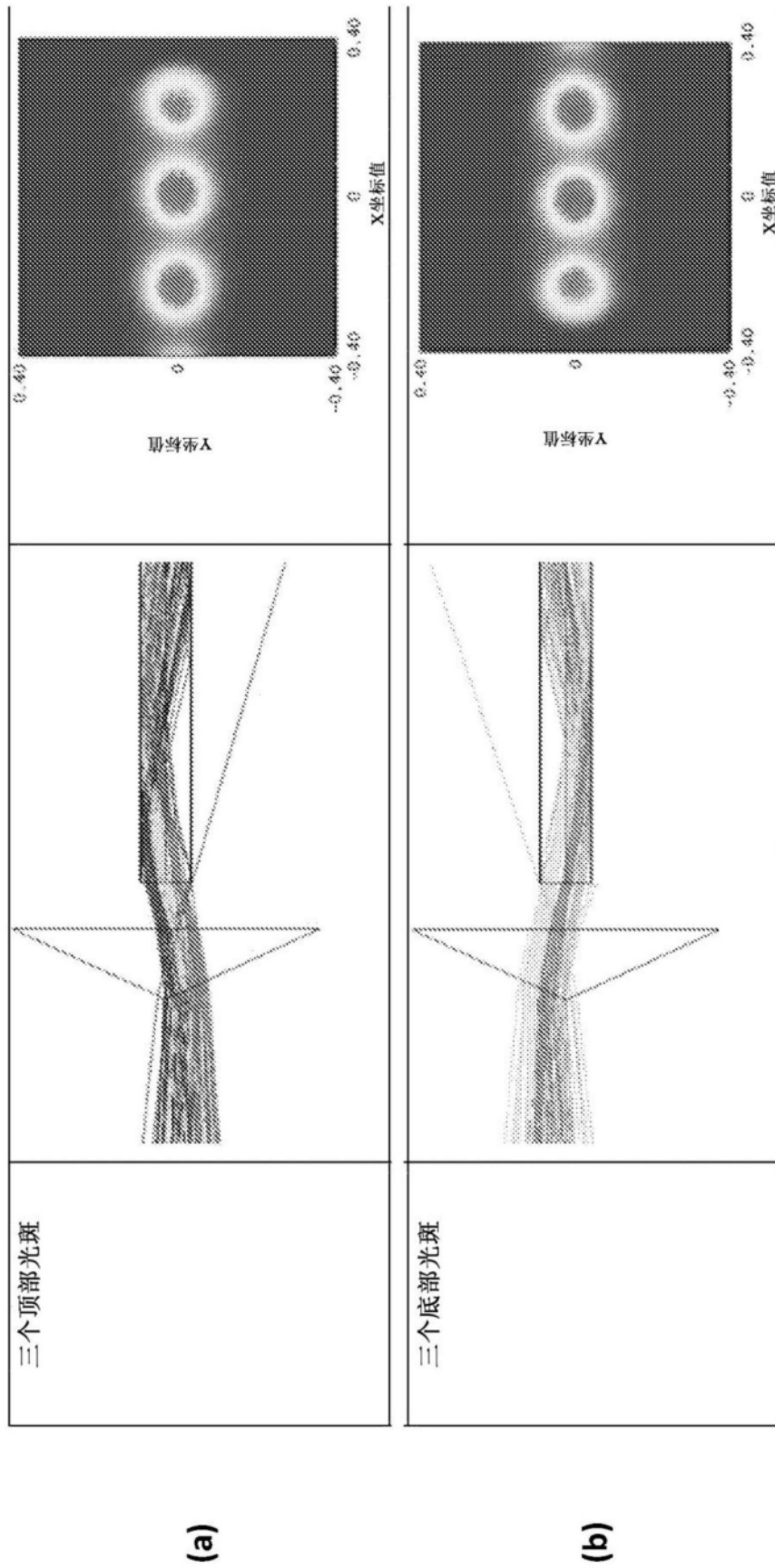
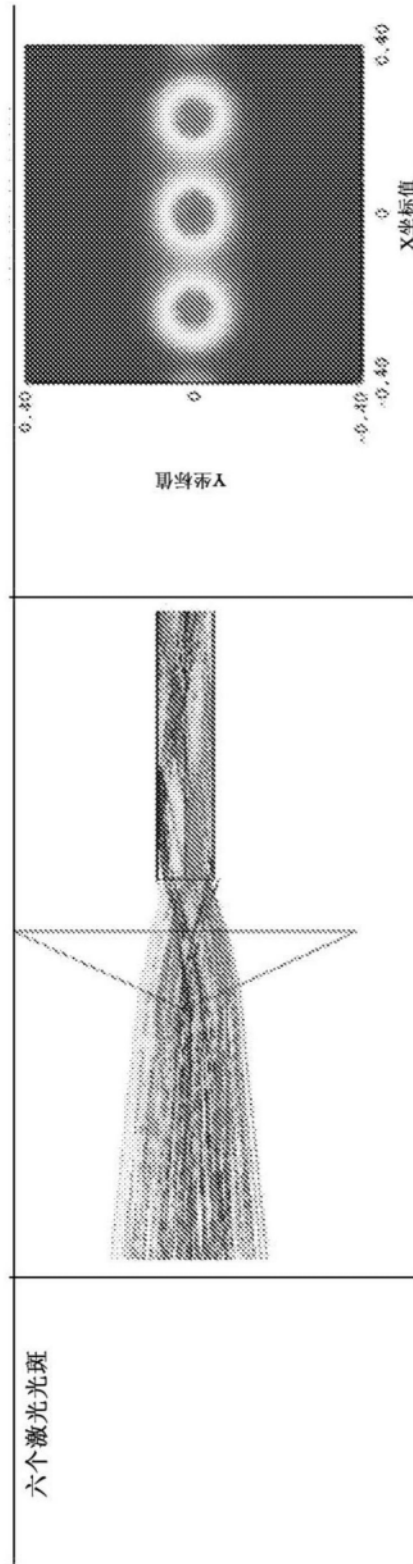


图7



(c)

图7(续)

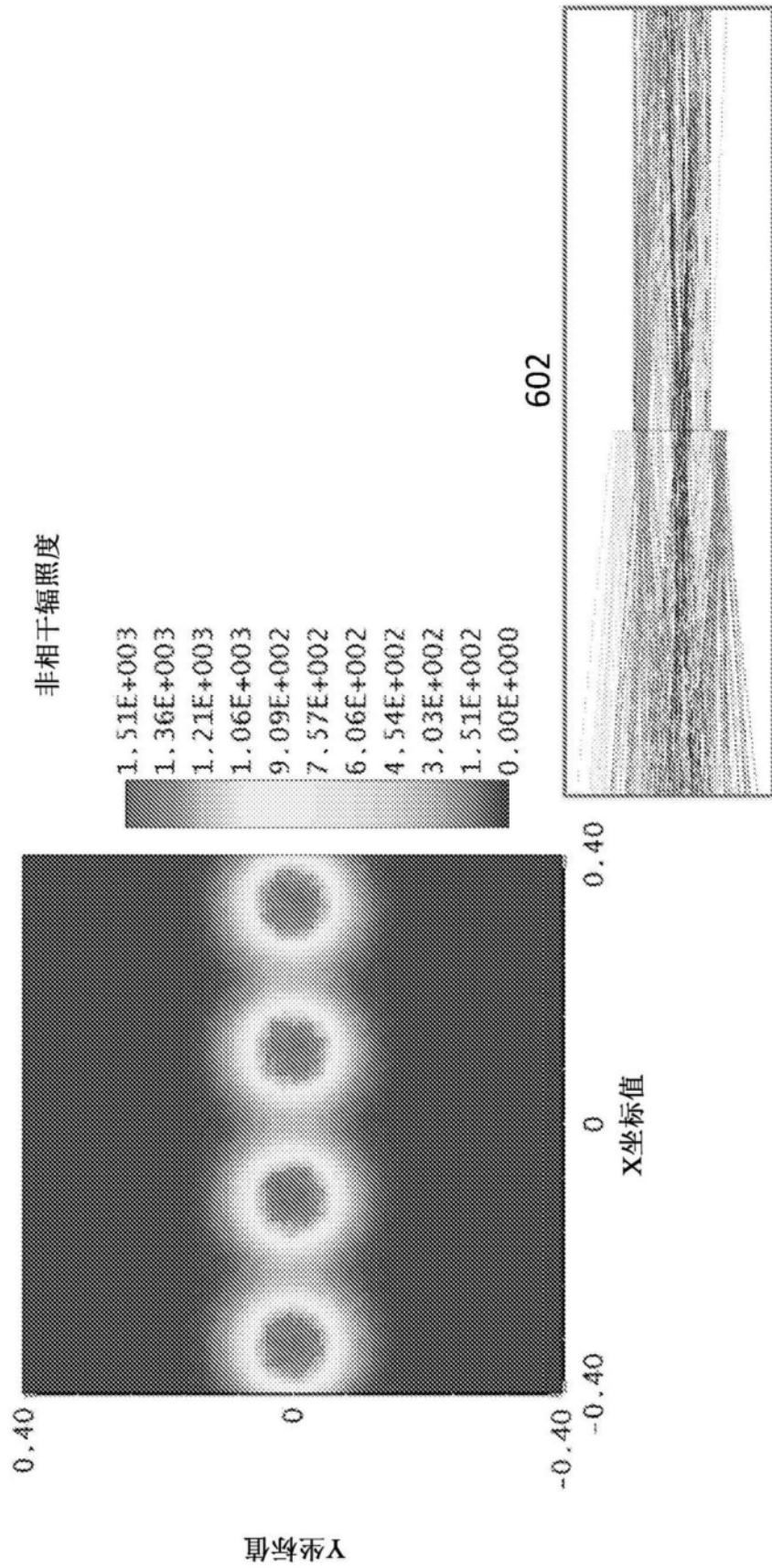


图8

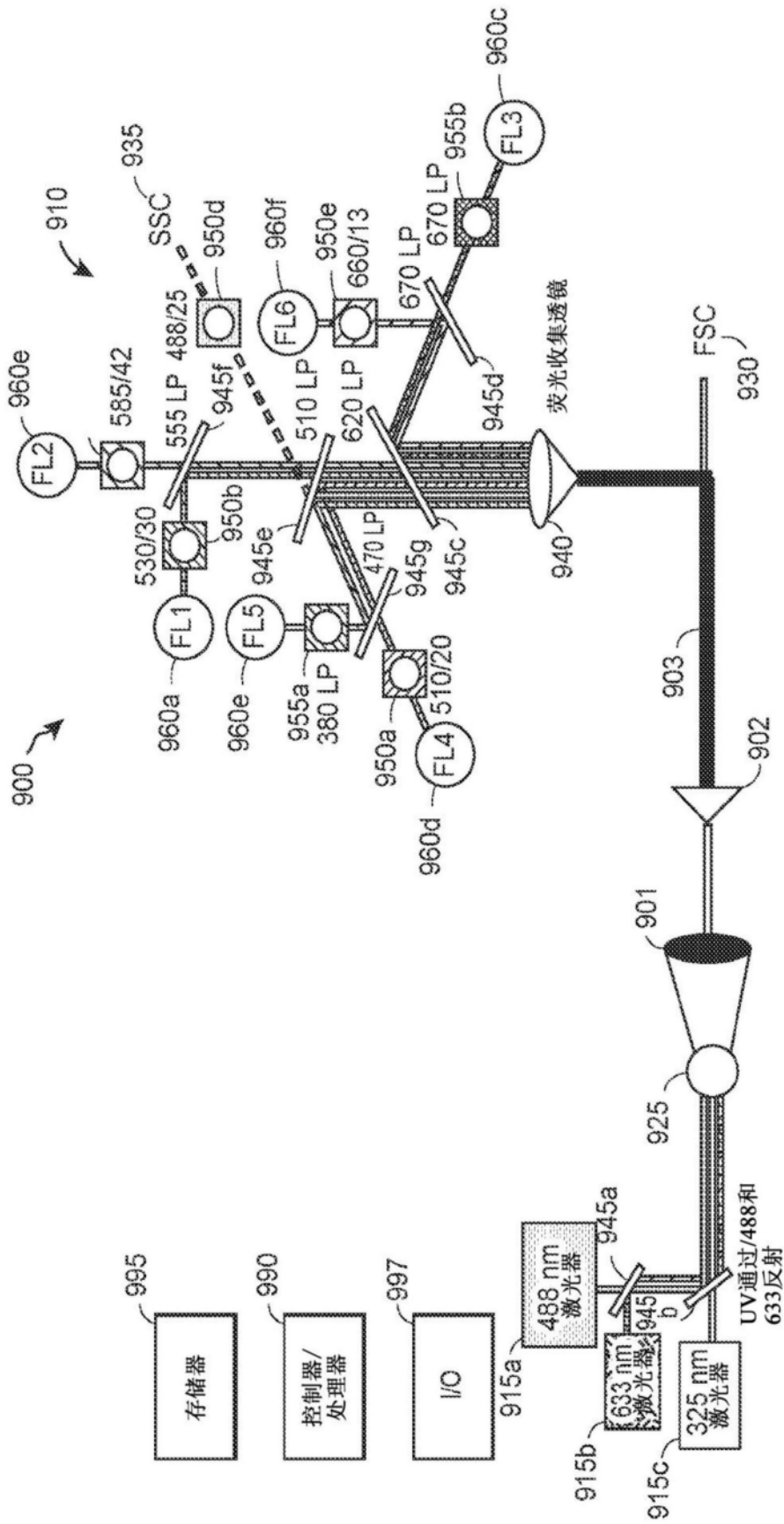


图9

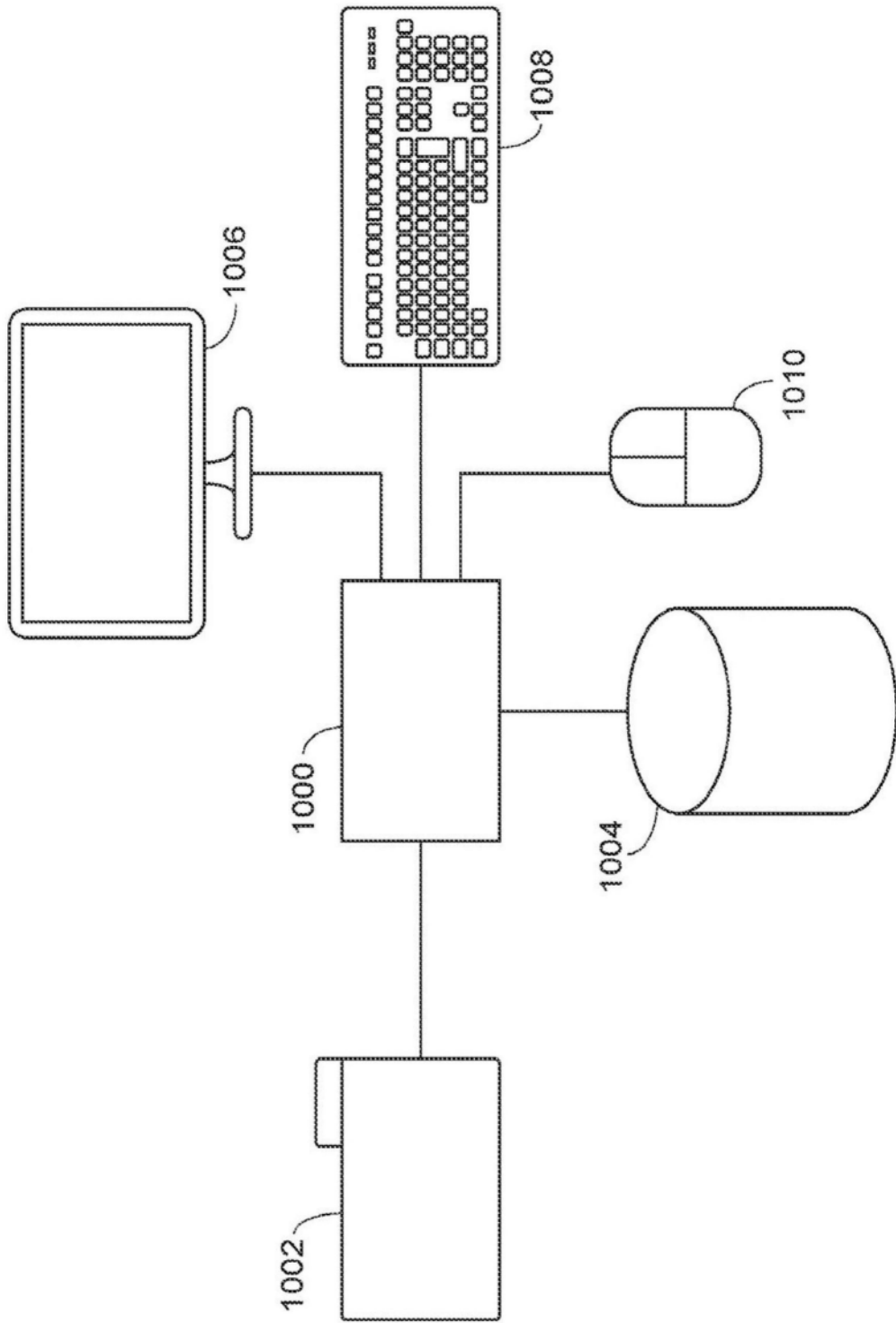


图10

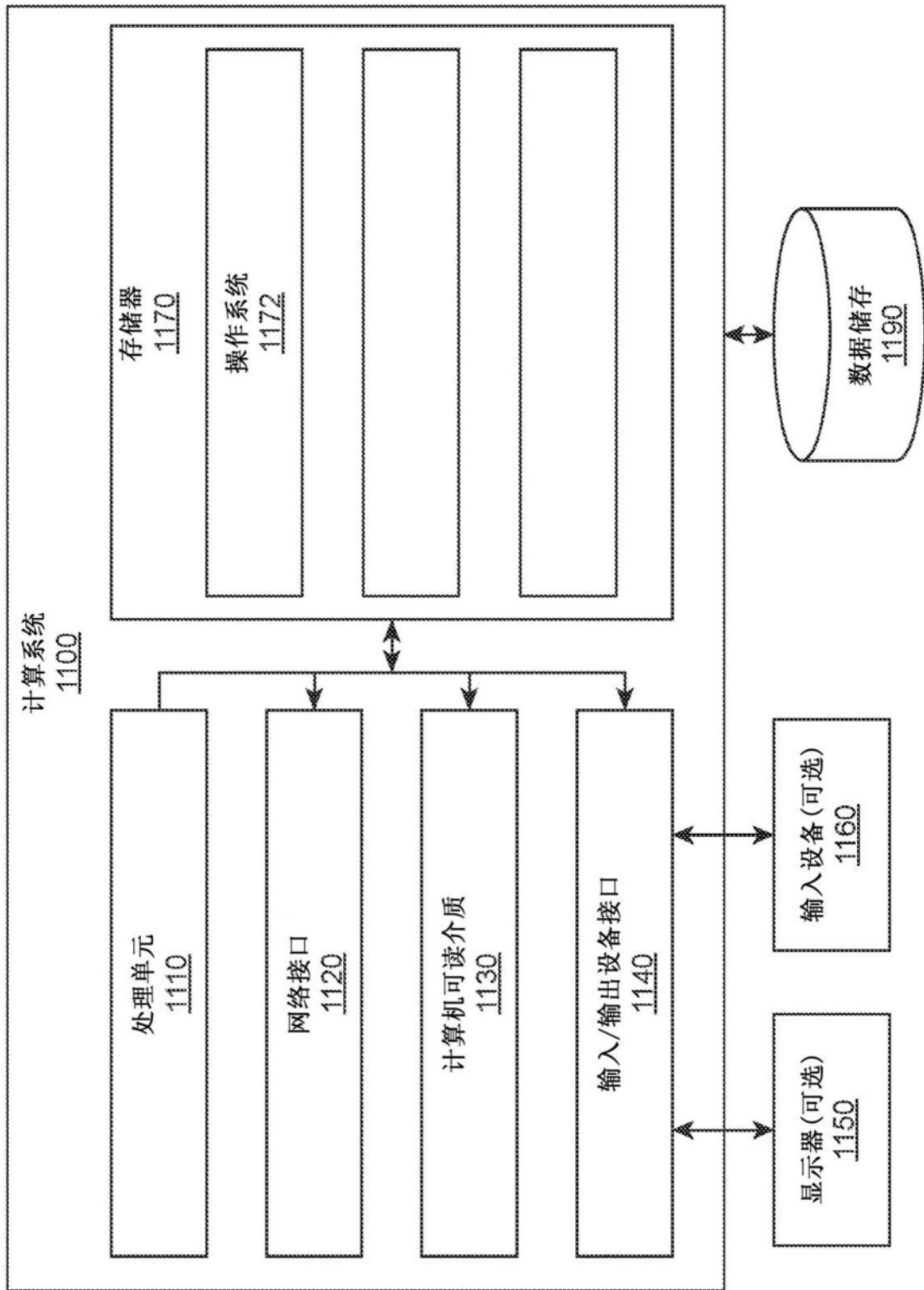


图11