



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106461530 B

(45) 授权公告日 2020.12.18

(21) 申请号 201580010805.7

M·沃德

(22) 申请日 2015.01.28

(74) 专利代理机构 北京派特恩知识产权代理有限公司 11270

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 康艳青 姚开丽

申请公布号 CN 106461530 A

(51) Int.CI.

G01N 15/14 (2006.01)

G01N 21/17 (2006.01)

(43) 申请公布日 2017.02.22

(56) 对比文件

US 5999250 A, 1999.12.07

(30) 优先权数据

US 2002093641 A1, 2002.07.18

61/946,579 2014.02.28 US

CN 101403739 A, 2009.04.08

62/041,806 2014.08.26 US

Robert J.Olson等.“An automated

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

submersible flow cytometer for analyzing
pico- and nanophytoplankton:FlowCytobot”.
《DEEP SEA RESEARCH I》.2003, 第50卷(第2期),
第301-315页.

2016.08.26

审查员 孙昕

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2015/013279 2015.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02015/130423 EN 2015.09.03

(73) 专利权人 生命科技股份有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 G·科达查克 W·史密斯

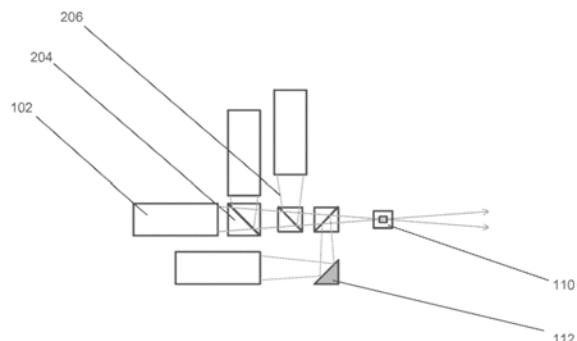
权利要求书2页 说明书17页 附图4页

(54) 发明名称

用于流式细胞仪中的光学系统的系统、方法
和设备

(57) 摘要

当前组实施例涉及一种用于流式细胞仪中的光学配置的系统、方法和设备，其允许针对每一光源的聚焦的独立调整。这些系统、方法和设备需要在接近光学链的开始移动最终聚焦元件，且在所述最终聚焦元件之后到来的每一光学元件经配置以适应汇聚光束，同时使向那些射束中引入的像差最小化。



1. 一种用于流式细胞仪的光学系统,该光学系统包括:
流动池,其包含粒子询问区;以及
至少两个光学子单元,其各自包括:
光源,其产生光束;以及
汇聚元件,其经配置以将所述光束转换为汇聚光束;并且
该光学系统还包括,具有立方体结构的至少一个二向色元件,该至少一个二向色元件配置为将所述至少两个光学子单元的所述汇聚光束引导到所述流动池并防止向所述汇聚光束中引入像差,
其中,所述汇聚光束在进入所述流动池的所述粒子询问区后在空间上是彼此分离的。
2. 根据权利要求1所述的光学系统,其中所述光学子单元中各自附着到光学-机械安装件,其中每一光学-机械安装件可操作以调整通过所述粒子询问区的所述汇聚光束的空间分离。
3. 根据权利要求2所述的光学系统,其中每一光学-机械安装件可经调整以将相应的汇聚光束的焦点对准在所述粒子询问区上。
4. 根据权利要求1所述的光学系统,其中所述至少一个二向色元件包括两个邻接棱镜和定位在所述邻接棱镜之间的波长选择性涂层。
5. 根据权利要求4所述的光学系统,其中所述波长选择性涂层经配置以充当长通滤波器。
6. 根据权利要求4所述的光学系统,其中所述波长选择性涂层经配置以充当短通滤波器。
7. 根据权利要求1所述的光学系统,其中所述流动池经配置以含有流体流,且其中所述流动池经配置以使粒子流动。
8. 根据权利要求7所述的光学系统,其中所述粒子配置为由所述汇聚光束中的每一者询问。
9. 根据权利要求1所述的光学系统,其中所述汇聚元件为凸面透镜。
10. 根据权利要求2所述的光学系统,其中所述空间分离在80微米到200微米之间。
11. 根据权利要求2所述的光学系统,其中所述空间分离在10微米到100微米之间。
12. 根据权利要求1所述的光学系统,其中所述汇聚光束具有平坦顶部强度剖面。
13. 根据权利要求1所述的光学系统,其中所述光束为单色。
14. 一种引导流式细胞仪中的光束的方法,该方法包括:
提供至少两个光束;
使所述光束中的每一者以每汇聚元件一个光束的比率通过汇聚元件,其中离开所述汇聚元件的所述光束是汇聚光束;
使所述汇聚光束中的至少一者通过具有立方体结构的至少一个二向色元件,其中,所述至少一个二向色元件配置为防止向所述汇聚光束中引入像差;以及
在进入流动池内的询问区后,使所述汇聚光束彼此空间上分离。
15. 根据权利要求14所述的方法,其中所述汇聚光束在进入所述询问区后彼此空间上分离80微米到200微米之间的距离。
16. 根据权利要求14所述的方法,其中所述汇聚光束在进入所述询问区后彼此空间上

分离10微米到100微米之间的距离。

17. 根据权利要求14所述的方法,其中所述汇聚光束具有平坦顶部强度剖面。

18. 一种流式细胞仪光学对准方法,其包括:

产生至少两个汇聚光束,其中通过使由光源产生的光束通过汇聚元件来产生所述汇聚光束中的每一者,其中所述光源和所述汇聚元件附着到光学-机械安装件;

使所述汇聚光束中的至少一者通过二向色元件,其中,所述二向色元件具有立方体结构,并配置为防止向所述汇聚光束中引入像差;

使所述汇聚光束中的每一者在一组空间上相异的第一位置中通过流动池;

调整所述光学-机械安装件中的至少一者以再定位至少一个光源和至少一个汇聚元件;

使所述汇聚光束中的每一者在一组空间上相异的第二位置中通过所述流动池。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中调整至少一个所述光学-机械安装件在x、y和z坐标系上发生。

20. 根据权利要求18所述的方法,其进一步包括使粒子通过所述流动池,其中所述粒子由所述汇聚光束询问。

21. 根据权利要求18所述的方法,其进一步包含从所述流动池的询问区收集散射光以产生数据集的步骤。

22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述数据集具有小于10%的变化系数。

23. 根据权利要求21所述的方法,其中所述数据集具有小于5%的变化系数。

24. 根据权利要求21所述的方法,其中所述数据集具有小于3%的变化系数。

25. 根据权利要求21所述的方法,其中所述询问区内的所述光束具有平坦顶部剖面,和在90%光束强度处或之上的40到60微米之间的宽度。

26. 根据权利要求21所述的方法,其中所述询问区内的所述光束具有平坦顶部剖面,和在90%射束强度处或之上的45到55微米之间的宽度。

用于流式细胞仪中的光学系统的系统、方法和设备

[0001] 相关申请案的交叉参考

[0002] 本申请案主张2014年8月26日申请的第62/041,806号美国申请案以及2014年2月28日申请的第61/9469,579号美国申请案的优先权，所述申请案的揭示内容全文以引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本发明大体上涉及流式细胞仪中的光学系统。

背景技术

[0004] 流式细胞测量术是用于主要在生物科学的研究和医学方面的大量应用中粒子和细胞的分析的强大的工具。所述技术的分析强度在于其能够使单一粒子(包含生物粒子，例如细胞、细菌和病毒)快速连续地以高达数千粒子/秒的速率游行穿过通常来自激光的聚焦光点。此焦点处的高光子通量通过粒子产生光的散射和/或从粒子或附接到可收集和分析的粒子的标签产生光的发射。此给予用户关于个别粒子的大量信息，此可快速与关于粒子或细胞的群体的统计信息结合。

[0005] 在流式细胞测量术中，通常使用多射束多波长激励来增加可充当光学报导子的荧光团的可用数目。增加的频谱空间允许针对个别目标的较大程度的测定多路复用。

[0006] 多射束流式细胞测量术可以若干不同方式实施。最简单的方式是，沿着相同光轴协同定位射束。在此情况下，多路复用受到由协同定位射束的波长激励的荧光团的频谱重叠限制。在大多数系统中，射束以堆叠方式递送到流动池，射束之间具有小距离。此允许针对每一激光或其它类型的光的空间上分离的询问区。在这些系统中，空间分离的量值经选择以减小邻近激光之间的串扰，同时最小化归因于流体系统的波动的粒子位置的不确定性。随着空间分离增加，串扰减小，但粒子位置的不确定性增加。

[0007] 归因于要求高粒子分析速率和高照明强度的系统要求，需要目标处的小激光点大小。在大多数系统中，需要汇聚射束来实现目标上的此水平的聚焦。汇聚射束通常通过扩展激光(例如准直或部分准直)且随后使其传播穿过聚焦透镜来产生。对于具有多个激光的系统，准直光束可堆叠，存在几百微米的位移以产生所述次序中的最终光点分离。准直射束随后穿过单一聚焦透镜，如图1中所见，且随后传播到询问区，粒子在询问区传递。

[0008] 单透镜方法已经证实是有效的且好几十年一直是主流。它的缺点是，聚焦透镜同时耦合到系统中的所有射束。单一聚焦透镜的调整或实施其它透镜操纵来改进一个射束的聚焦会使邻近射束的聚焦降级。此系统可产生较低质量数据，需要更多工作来校准聚焦，并且还使光源(例如激光)的互换性极其困难。

[0009] 如本文呈现的这些缺点的解决方案是一种系统，在所述系统中汇聚射束可代替准直射束传播穿过光学链，且不引入像差。参看图2。此系统将允许调整每一激光束，而不干扰邻近激光束的光学路径，且实现改进的数据和结果。

发明内容

[0010] 在一个方面中，揭示一种用于流式细胞仪的光学系统。所述光学系统可包含流动池，其包含粒子询问区。所述光学系统可包含至少两个光学子单元，其包括产生光束的光源和经配置以将光束转换为汇聚光束的汇聚元件。

[0011] 在一个方面中，揭示一种组合流式细胞仪中的光束的方法。所述方法可包含提供至少两个光束。所述方法可包含使所述光束中的每一者以每汇聚元件一个光束的比率通过汇聚元件，其中离开汇聚元件的光束为汇聚光束。所述方法可包含使汇聚光束中的至少一者通过至少一个二向色元件。所述方法可包含在进入流动池内的询问区后使汇聚光束彼此空间上分离。

[0012] 在一个方面中，揭示一种流式细胞仪光学对准方法。所述方法可包含产生至少两个汇聚光束，其中所述汇聚光束中的每一者通过使光源产生的光束通过汇聚元件而产生，其中光源和汇聚元件附着到光学-机械安装件。所述方法可包含使汇聚光束中的至少一者通过二向色元件。所述方法可包含使汇聚光束中的每一者在一组空间上相异的第一位置中通过流动池。所述方法可包含调整光学-机械安装件中的至少一者以再定位至少一个光源和至少一个汇聚元件。所述方法可包含使汇聚光束中的每一者在一组空间上相异的第二位置中通过流动池。

附图说明

[0013] 为了更加全面地理解本文中所揭示的原理以及其优点，现在参考结合附图所作的以下描述，附图中：

[0014] 图1为根据现有技术的用于流式细胞仪的光学系统的说明。

[0015] 图2为根据各种实施例中的一者用于流式细胞仪的光学系统的说明。

[0016] 图3为根据各种实施例中的一者用于流式细胞仪的光学系统的一部分的特写视图的说明。

[0017] 图4说明根据各种实施例中的一者的流程图。

[0018] 图5A为根据使用准直射束的现有技术的用于流式细胞仪的光学系统的说明。

[0019] 图5B为根据使用汇聚射束的各种实施例中的一者的用于流式细胞仪的光学系统的说明。

[0020] 虽然结合各种实施例来描述本发明教示，但是并不打算将本发明教示限于这类实施例。相反，如所属领域的技术人员应了解，本教示涵盖各种替代方案、修改和等效物。

[0021] 此外，在描述各种实施例时，本说明书可能将方法和/或过程呈现为特定序列的步骤。然而，在方法或过程不依赖于本文阐述的步骤的特定次序的程度上，方法或过程不应限于所描述的步骤的特定序列。如所属领域的一般技术人员将了解，步骤的其它序列可以是可能的。因此，在说明书中阐述的步骤的特定次序不应理解为对权利要求书的限制。另外，针对方法和/或过程的权利要求书不应限于以书写的次序进行其步骤，并且所属领域的技术人员可以易于了解的是所述序列可以变化并且仍保持在各种实施例的精神和范围内。

[0022] 为了更容易理解本发明，首先界定特定术语。贯穿具体实施方式陈述额外定义。

具体实施方式

[0023] 随附描述和图式(其包含展现1)中描述用于流式细胞仪中的光学系统的系统、方法和设备的实施例。图式中,陈述许多特定细节以提供对某些实施例的彻底理解。熟练的技术人员将能够理解,本文中所描述的光学系统可用于使用光学链的多种工具中,包含(但不限于)流式细胞仪。另外,熟练的技术人员将理解,可在没有这些特定细节的情况下实践某些实施例。此外,所属领域的技术人员可容易理解,方法得以呈现和执行的特定序列是说明性的,且预期所述序列可变化且仍保持在某些实施例的精神和范围内。

[0024] 虽然结合各种实施例来描述本发明教示,但是并不打算将本发明教示限于这类实施例。相反,如所属领域的技术人员应了解,本教示涵盖各种替代方案、修改和等效物。

[0025] 此外,在描述各种实施例时,本说明书可能将方法和/或过程呈现为特定序列的步骤。然而,在方法或过程不依赖于本文阐述的步骤的特定次序的程度上,方法或过程不应限于所描述的步骤的特定序列。如所属领域的一般技术人员将了解,步骤的其它序列可以是可能的。因此,在说明书中阐述的步骤的特定次序不应理解为对权利要求书的限制。另外,针对方法和/或过程的权利要求书不应限于以书写的次序进行其步骤,并且所属领域的技术人员可以易于了解的是所述序列可以变化并且仍保持在各种实施例的精神和范围内。

[0026] 为了可更容易理解本发明,首先界定特定术语。贯穿具体实施方式陈述额外定义。

[0027] 如本文所使用,“约”意味着正或负20%,更优选地正或负10%,更优选地正或负5%,最优选地正或负2%。

[0028] 如本文所使用,“二向色”意味着波长选择性地反射元件。

[0029] 如本文所使用,“流动池”意味着具有选自以下形状的内部形状的通道、腔室或毛细管:矩形、正方形、椭圆形、扁球形、圆形、八边形、七边形、六边形、五边形和三角形。

[0030] 如本文所使用,“通道”意味着具有至少一入口和优选地一出口的路线、路径或导管,其可含有一定量的流体且具有选自以下形状的内部形状:矩形、正方形、椭圆形、扁球形、圆形、八边形、七边形、六边形、五边形和三角形。

[0031] 如本文所使用,“粒子”意味着小单元的物质,包含(但不限于):生物细胞,例如真核和原核细胞、古菌、细菌、霉菌、植物细胞、酵母、原虫、阿米巴、原生生物、动物细胞;细胞器;有机/无机元素或分子;微球体;以及例如水包油等不可混溶的流体的液滴。

[0032] 如本文所使用,“分析物”意味着待分析的物质或材料。

[0033] 如本文所使用,“探针”意味着经标记或以其它方式标示且用于检测或识别流体或样本中的另一物质的物质。

[0034] 如本文所使用,“目标”意味着将与汇聚射束接触的任何事物

[0035] 如本文所使用,“询问区”是其中光束(例如激光)与粒子相交的点,或光学系统检测到光散射和荧光的地点。

[0036] 如本文所使用,“最终聚焦透镜”意味着位于光学链中某处的汇聚元件。

[0037] 如本文所使用,“流体流”意味着携载和对准粒子使得其成一列纵队穿过光束的流。

[0038] 在各种实施例中,本申请案中所揭示的光学系统可与关于流式细胞测量术的各种设备、系统和方法结合使用。参看第12/239,390和12/209,084号美国专利申请案,其两者全文以引用的方式并入本文中。

[0039] 在流式细胞测量术中,常常采用多射束激励来增加可用作光学报导子的荧光团的可用数目。增加的频谱空间允许针对个别目标的较大幅度的测定多路复用。多射束流式细胞测量术可以若干不同方式实施。最简单的方式是,沿着相同光轴协同定位射束。然而,所属领域的技术人员将理解,干扰、频谱重叠和串扰将限制多路复用的程度。为缓解此问题,射束以堆叠方式递送到流动池。

[0040] 参看图1,展示流式细胞测量术领域中的现有技术光学系统的示意图。此系统包括产生准直光束104的至少一个光源102。现有技术系统使用板二向色元件106,准直光束104穿过所述元件。准直光束104在其穿过二向色元件106时保持准直以便聚焦在光学链的末端。准直的一个效应是,其最小化当光束穿过板二向色元件106时像差的引入。如果使用汇聚射束,那么这些像差将导致较差数据质量且是例如流式细胞测量术中使用的光学系统等光学系统中的重要担忧。当光束命中询问区内的目标或粒子时,射束剖面具有通常被称为“光斑尺寸”的区域。通常,如果光束可配合到较小空间,那么其射束强度增加,这导致相对于背景噪声的较高信号发射。为了使激光的光斑尺寸具有高信号与背景噪声比率,在光学链的末端使用汇聚元件108以减小射束的光斑尺寸且增加目标的询问之前的射束强度。正如几乎所有光学系统中的情况,像差的降低和恰当聚焦是合乎需要的。在流式细胞测量术中常常空间上分离(堆叠)光束使得目标可由不同光源102在不同时间询问,且光源102不会彼此干扰或形成涉及串扰的问题。如图1中所展示的系统的最大问题是,若干准直光束104正以堆叠方式进入准直汇聚元件108,且为了恰当地聚焦个别光束,汇聚元件108可能需要移动。射束经由汇聚元件108耦合,且移动透镜以调整一个射束可不利地影响邻近光束的调整。另外,恰当地校准此光学系统可涉及若干复杂透镜操纵,且尽最大努力也可能仍导致光学系统的不太完美的校准。所得数据的质量可较差,这可能导致在背景噪声上方不可检测到重要信息,且导致基本研究中数据遗漏或医疗应用中的不当诊断。

[0041] 图1中呈现的问题的解决方案的一个实施例在图2、3和5B中说明,其中可通过将最终聚焦元件移动到光学路径前方使每一光源102的光学路径独立于另一光源102。此区别在比较图1和图5B中的汇聚元件108的位置时可看见。此系统可具有与一个光源102成对的一个汇聚元件108。此系统通过使每一个别光源路径内进行的许多透镜操纵解耦而使制造过程中和所属领域中的光学对准简单得多。一种模块化方法,借助所述模块化方法,具有产生聚焦到最终光斑尺寸的汇聚光束206所有光学硬件的完全组装的光学子单元502可安装到仪器中或被移除和更换。因此,光学系统的对准是光学子单元502的简单操纵,借此,一次仅可调整一个光学路径。用于以堆叠或共线方式组合汇聚光束206的标准方法(图1)将利用板二向色元件106来引导汇聚光束206。但,这对于上文描述的在光学路径开始处产生汇聚光束206的光学设置将不可能实现。板二向色元件106将引入像差(散光和慧形像差),借此使激光强度剖面的最终空间分布降级,且借此使仪器的性能降级。由板二向色元件106引入到汇聚光束206的像差在已知技术中描述。J.Bratt,《针对倾斜平面平行板的波前像差系数的分析表达 (Analytical expressions for the wave-front aberration coefficients of a tilted plane-parallel plate)》,应用光学,第36期,8459-8467 (1997)。j.van den Eerenbeemd和S.Stallinga,《针对包括倾斜平面并行板的系统的紧凑型系统描述 (Compact system description for systems comprising a tilted plane parallel plate)》,应用光学,第46期,319-326 (2007)。

[0042] 如图1中所展示,用于流式细胞仪的光学系统可包含流动池110和至少两个光学子单元502,如图5B如中所见。流动池110可包含粒子询问区。大体来说,光束可聚焦到询问区上,在询问区中粒子可穿过聚光束。光学子单元502可包括光源102和汇聚元件108。在各种实施例中,光源102可产生大体上单色光束。在各种实施例中,光源102可产生多色光束。汇聚元件108可经配置以将单色或多色光转换为汇聚光束206。在各种实施例中,汇聚光束可聚焦到约10微米的直径。在各种实施例中,汇聚光束可聚焦到约一微米与20微米之间的直径。在各种实施例中,汇聚光束可聚焦到约五微米与一百微米之间的直径。在各种实施例中,进入汇聚元件108的光束可扩展、汇聚或准直。在各种实施例中,光学子单元502可附着到光学-机械安装件。光学-机械安装件可由操作者操纵以调整汇聚光束206的空间分离,或可经操纵以调整流动池110内汇聚光束206的聚焦。此系统将允许调整每一激光束,而不干扰邻近激光束的光学路径,且实现改进的数据和结果。

[0043] 在各种实施例中,光学系统进一步包括至少一个二向色元件204,其经配置以将汇聚光束206引导到流动池110。二向色元件204可包括两个邻接棱镜304和位于邻接棱镜304之间的波长选择性涂层302。在各种实施例中,可使用三向色或更多向色的元件,且可利用任何数目的棱镜304和任何数目的波长选择性涂层302。在各种实施例中,所使用的二向色元件204可呈立方体的形状。立方体形状可允许进入面近似垂直于传入射束,且退出面可近似垂直于所透射的汇聚光束206。在各种实施例中,立方体结构可减少或几乎消除像差的引入。在各种实施例中,立方体可通过接合两个45度棱镜304来构造。在各种实施例中,波长选择性涂层302可放置在棱镜304之间的邻接表面上。因为汇聚波前穿过立方体的传播允许汇聚光束206中较少和较不明显的像差,所以不必使准直光束104传播穿过二向色立方体。在各种实施例中,多激光系统中的最终聚焦透镜(例如图5B中的汇聚元件108)可在光学路径中较早重定位,其中其可从其它光轴解耦。在此类实施例中,具有独立汇聚元件108的透镜组合件可安装在三轴光学-机械安装件上,具有用于瞄准和聚焦汇聚光束206的独立机械调整。在各种实施例中,可针对每一汇聚光束206个别地调整每一射束腰部和位置的定位,而不影响其它汇聚光束206的聚焦。这些配置还消除色度和球面像差所导致的问题,所述问题在不同波长的若干射束传播穿过相同准直汇聚元件108且具有聚焦在相同平面中的要求时复杂化。在使用二向色立方体(或具有类似特性的其它几何形状)的各种实施例中,可构造多个光源102的汇聚光束206配置,其中每一光束光学路径的光学组件的调整解耦。另外,此类实施例允许创建模块化流式细胞仪。在解耦光束线路的各种实施例中,添加额外光束线路并不需要必须调整耦合的光学组件。此类实施例在所属领域中和制造环境中特别有利。

[0044] 至少两个光学子单元502与至少一个二向色元件204的组合之前尚未实践过。一个原因可为,与含有少得多的材料的板二向色元件204相比,立方体或其它几何形状的形式的二向色元件204的成本增加。另外,光学子单元502的产生更复杂。

[0045] 在各种实施例中,波长选择性涂层302充当长通滤波器。在其它实施例中,波长选择性涂层302充当短通滤波器。在额外实施例中,镜面元件112可用于当前光学系统的各种实施例中。

[0046] 在各种实施例中,可在x、y和z坐标系上调整光学-机械安装件。在光学-机械安装件上放置光学子单元502可允许独立于用于创建恰当聚焦和光斑尺寸的其它光源102调整每一光源102,同时具有特定应用必需的较少和较不明显的像差。过去已经使用板二向色元

件106，因为其对于大部分应用以减少的成本运作良好。然而，当前系统的各种实施例出于上文所描述原因优于透射准直光束104的板二向色系统的各种实施例。

[0047] 在各种实施例中，粒子移动穿过流动池110。在此类实施例中，粒子可由汇聚光束206中的每一者独立地询问。

[0048] 在各种实施例中，汇聚元件108可为凸面透镜。

[0049] 在各种实施例中，当通过询问区时，空间分离可在约80微米到约200微米之间。在各种实施例中，空间分离可在约10微米到约100微米之间。在各种实施例中，空间分离可为约150微米。

[0050] 在各种实施例中，汇聚光束206可具有平坦顶部强度剖面。在各种实施例中，汇聚光束206可具有高斯强度剖面。在各种实施例中，强度剖面可取决于应用而更改。

[0051] 图4为展示根据各种实施例用于流式细胞仪光学对准的方法400的示范性流程图。

[0052] 在步骤402中，可提供至少两个光束。在步骤404中，光束中的每一者可以每汇聚元件一个光束的比率穿过汇聚元件，其中离开汇聚元件的光束可为汇聚光束206。在步骤406中，汇聚光束206中的至少一者可穿过至少一个二向色元件204。在步骤408中，汇聚光束206可在进入流动池110内的询问区后彼此空间上分离。

[0053] 在所述方法的各种实施例中，光束可为单色光发射，且可由光源102产生。在各种实施例中，光源102和汇聚元件108可附着到光学-机械安装件。在各种实施例中，光学-机械安装件可在x、y和z坐标系上调整。在各种实施例中，另一步骤可包含用经配置成以第二波长产生单色发光的第二光源102更换经配置成以第一波长产生单色发光的第一光源102。

[0054] 在所述方法的各种实施例中，二向色元件204可经配置以防止向汇聚光束206中引入像差。在各种实施例中，二向色元件204可呈立方体的形状。在各种实施例中，二向色元件204可为长通滤波器或短通滤波器。在各种实施例中，另一步骤可包含用经配置以通过第二范围的波长的至少一个第二二向色元件204更换经配置以通过第一范围的波长的至少一个第一二向色元件204。

[0055] 在所述方法的各种实施例中，光学-机械安装件的调整可在x、y和z轴上发生。

[0056] 在所述方法的各种实施例中，另一步骤可包含询问粒子，其中所述粒子正在流体流中通过流动池110。在各种实施例中，流体可为液体。在各种实施例中，另一步骤可包含用检测元件检测光散射。在各种实施例中，检测元件可包括光电倍增管。在各种实施例中，可存在当汇聚光束206撞击目标时产生的前向和侧向散射光。在各种实施例中，侧向散射光可通过检测透镜，且随后进入针孔收集纤维阵列，其中每一针孔可对应于已以空间上分离的方式进入流动池110的特定汇聚光束206。在各种实施例中，空间分离可以在约80微米到约200微米的范围内变化。在各种实施例中，空间分离可在约10微米到约100微米之间。在各种实施例中，空间分离可为约150微米。在各种实施例中，光缆可将来自每一针孔的光连接到收集块。在各种实施例中，收集块可包含准直仪、滤波器元件和光电倍增管。在各种实施例中，信号可从模拟数据转换为数字数据，所述数字数据随后可在计算机上存储和分析。在各种实施例中，前向散射光可通过阻挡杆、聚光透镜，且从模拟数据信号转换为数字数据信号。在各种实施例中，数字数据信号可随后在计算机上存储和分析。

[0057] 在各种实施例中，另一步骤可包含向粒子应用流体动力学和/或声学聚焦。

[0058] 在各种系统、设备和方法实施例中，光学子单元502、二向色元件204和收集块可与

第一波长的光相关联。在各种实施例中，上文描述的光学子单元502、二向色元件204和收集块可从流式细胞仪系统的其余部分移除，且随后用与第二波长的光相关联的不同的光学子单元502、二向色元件204和收集块替换。在各种实施例中，其中存储数字数据的计算机可用光学组件的此改变编程，且随后使用新参数集分析数据。

[0059] 在所述方法的各种实施例中，二向色元件204可经配置以防止向汇聚光束206中引入像差。如先前论述，板二向色元件106(如图3中所见)向汇聚光束206而非准直光束104中引入像差。在各种实施例中，二向色元件204可呈立方体的形式，这可允许汇聚光束206的所有部分同时进入立方体，这因此可允许汇聚光束206进入具有不同折射率的新的媒体，且引入极少像差或不引入像差。在这种配置中，退出的汇聚光束206可进入空气或其源于的另一媒体，也不在后端引入像差。

[0060] 在所述方法的各种实施例中，汇聚光束206可具有平坦顶部强度剖面。此平坦顶部强度剖面可允许关于目标的均匀询问：所述目标为粒子、细胞、珠粒还是其它。

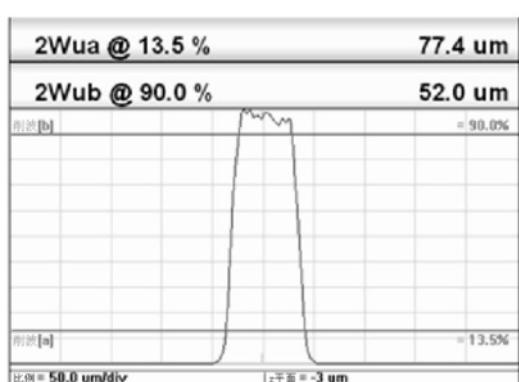
[0061] 现参看图5A和图5B，说明现有技术与本发明的另一比较。在图5A中，可看见光源102产生准直光束104。在一些光束操纵发生(未图示)之后，准直光束104通过汇聚元件108，且随后撞击目标504。在此说明中，存在全部通过单一汇聚元件108的三个光束。每一光束必须通过移动汇聚元件108来聚焦。在此说明中清楚的是，通过改变汇聚元件108的位置聚焦一个光束将影响另外两个光束，因为所有三个光束通过相同汇聚元件108。此系统比不上图5B中所见的系统。

[0062] 图5B描绘用于流式细胞仪的光学系统的一个实例实施例。图5B中，每一汇聚光束206可产生自含有光源102和汇聚元件108两者的光学子单元502。在此系统中，光学子单元502可安装到光学-机械安装件(未图示)以聚焦和调整汇聚光束206。此系统可允许针对每一汇聚光束206独立于其它汇聚光束206调整(通常)聚焦或光斑尺寸。此系统提供较高数据质量、更容易的配置和模块性，如遍及本说明书详述。

[0063] 提供以下实例是为了说明但非限制本文中所揭示的实施例。

[0064] 实例1

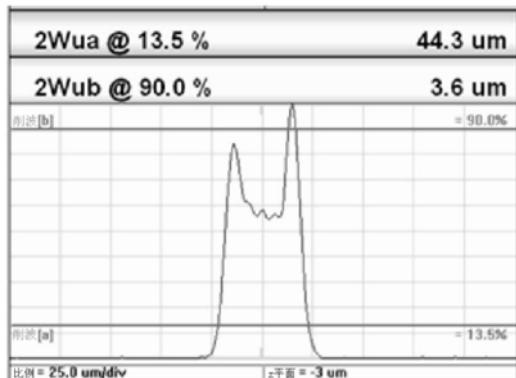
[0065] 通过设定在45度角的平板二向色元件时的平坦顶部汇聚激光束剖面改变



[0066]

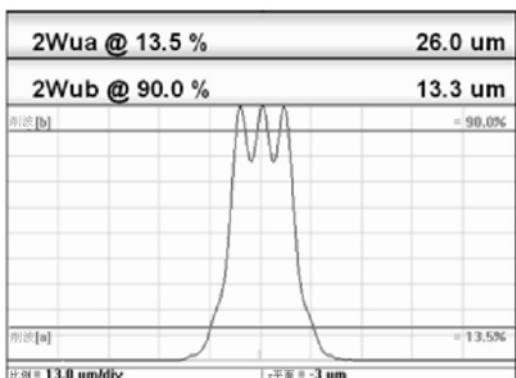
[0067] 0平板二向色元件

[0068]



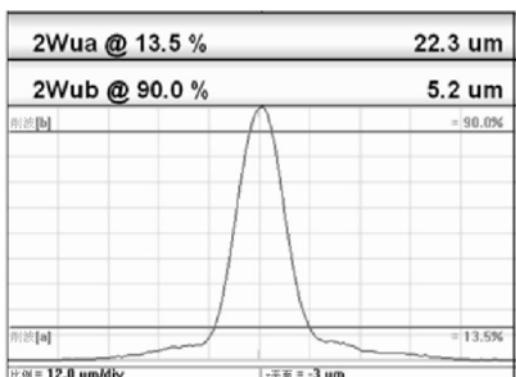
[0069] 1平板二向色元件

[0070]



[0071] 2平板二向色元件

[0072]



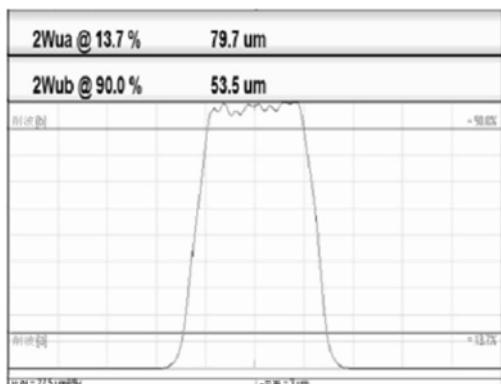
[0073] 3平板二向色元件

[0074] 汇聚激光束在0与3平板二向色元件之间通过,且所得射束通过相机成像。x轴表示射束位置,且y轴表示射束强度。y轴上的强度已正规化到1(或100%),其中1为所达到的最高强度。对于大多数应用,射束宽度应在90%下约跨50微米。在各种实施例中,射束宽度可约跨40微米或约跨10微米,同时维持至少约90%的射束强度。在各种实施例中,射束强度应为至少约80%、至少约70%、至少约60%,或至少约50%,同时维持至少约跨50微米的射束宽度。当使用0二向色板时可看见最佳射束,但当即使添加1平板二向色元件时,也不能满足粒子的最佳询问的条件。

[0075] 此实例说明将汇聚光束206技术与板二向色元件106技术组合并不是最佳的。如上文所论述,汇聚光束206允许产生独立的光学链。因此,另一技术(例如呈棱镜的形式的二向色元件)必须并入到这些各种实施例中。

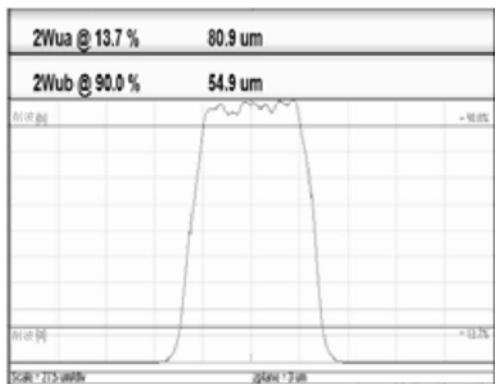
[0076] 实例2

[0077] 通过立方体形状的二向色元件时的平坦顶部汇聚激光束剖面改变



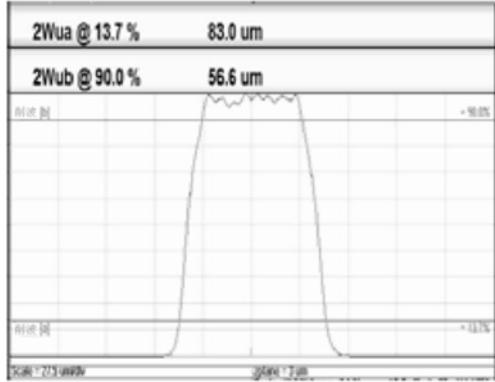
[0078]

[0079] 0立方体二向色元件



[0080]

[0081] 1立方体二向色元件



[0082]

[0083] 2立方体二向色元件

[0084] 汇聚激光束在0与2立方体二向色元件之间通过,且所得射束通过相机成像。x轴表示射束位置,且y轴表示射束强度。y轴上的强度已正规化到1(或100%),其中1为所达到的最大强度。对于最佳询问条件,射束宽度应约跨50微米,且至少约90%强度电平或更高。选择50微米是因为该区域允许足够高的射束强度有效,同时使光斑尺寸最大化。当使用0、1或2二向色立方体时可看见最佳射束。

[0085] 此实例表明与汇聚光束206兼容的二向色解决方案。不同于实例1,几乎不存在可允许产生独立光学路径的射束剖面中的降级。

[0086] 实例3

[0087] 设定在45度角的二向色板的波前像差

[0088]

系数	值 (1/π)	像差
W40	0.0431	最低阶球面像差
W60	0.0004	第六阶球面像差
W22	2.2018	最低阶球面像差
W42	-0.0204	第五阶散光
W31	-0.7685	第三阶线性慧形像差
W51	-0.0065	第五阶线性慧形像差
W33	-0.0443	立方慧形像差

[0089] $T=1\text{mm}; n=1.5145; \lambda=637\text{nm}; \text{光瞳半径}=9\text{mm}; \text{倾角}=45\text{度}; r=1$

$$[0090] \Delta W = \sum_l \sum_m W_{lm} \rho^l \cos m\varphi$$

[0091] 实例3呈现众所周知的计算,其表明为何在汇聚光(例如激光)系统中使用二向色板产生具有显著散光和慧形像差的不可接受的射束剖面。这些像差大大降低数据的质量。 T =所使用的板的厚度; n =折射率; λ =光的波长;光瞳半径=其中发生计算的玻璃上的光斑尺寸;倾角=板的角度;且 r =距光轴(光瞳半径的出口)的距离。

[0092] 实例4

[0093] 用于二向色立方体的波前像差

[0094]

系数	值 (1/π)	像差
W40	0.6345	最低阶球面像差
W60	0.0094	第六阶球面像差
W22	0.000	最低阶球面像差
W42	0.000	第五阶散光
W31	0.000	第三阶线性慧形像差
W51	0.000	第五阶线性慧形像差
W33	0.000	立方慧形像差

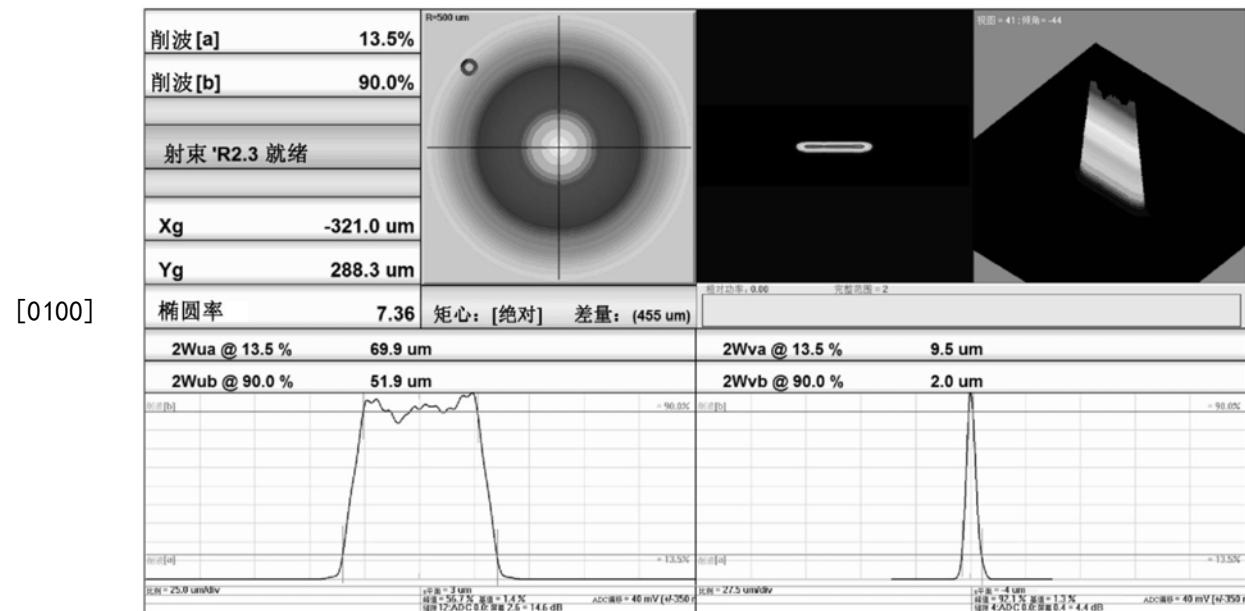
[0095] $T=20\text{mm}; n=1.5145; \lambda=637\text{nm}; \text{光瞳半径}=9\text{mm}; \text{倾角}=0\text{度}; r=1$

[0096] 等式请参看上文

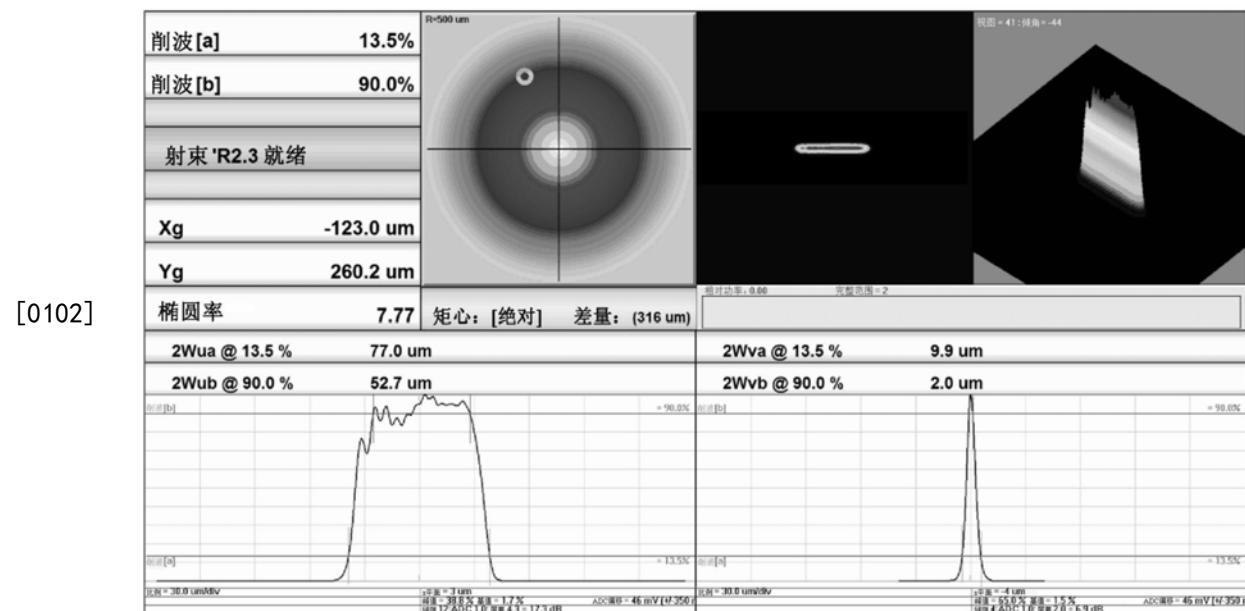
[0097] 实例4呈现众所周知的计算,其表明使用二向色立方体代替二向色板产生零慧形像差或散光。相比于将汇聚光(例如激光)射束并入到二向色板光学系统中的仪器,这些减少产生高得多的质量的数据。

[0098] 实例5-共面聚焦

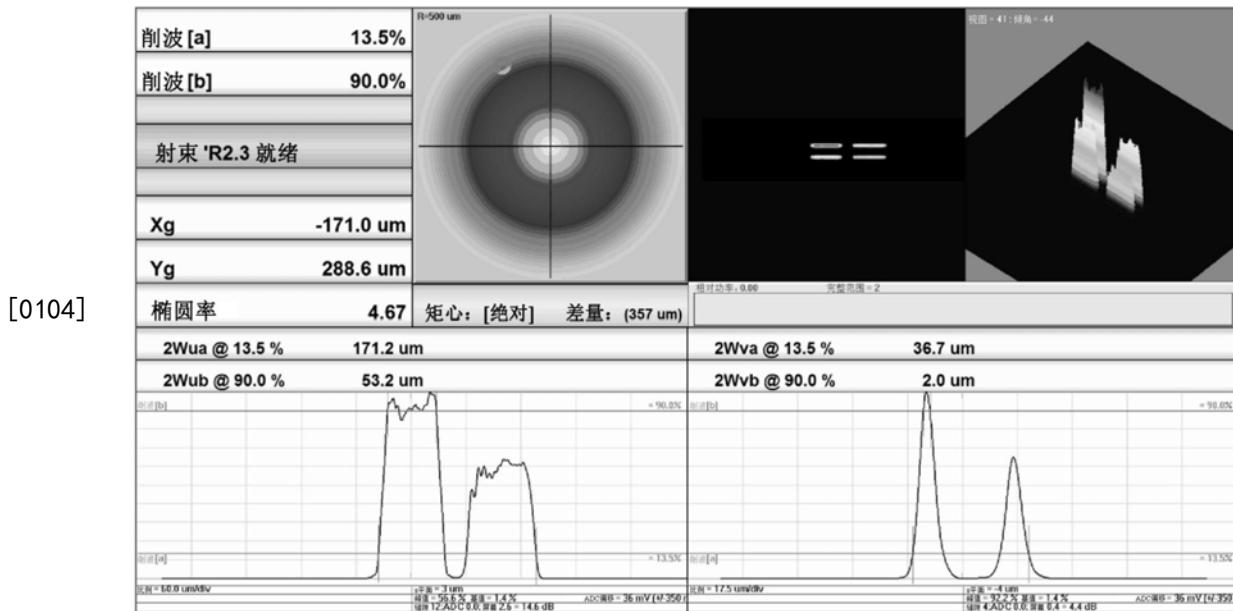
[0099] 蓝激光束聚焦



[0101] 紫激光束聚焦



[0103] 蓝和紫激光束聚焦



[0105] 实例5中的数据呈现使用各自包括光源和汇聚元件的两个光学子单元,其在不使用最终聚焦透镜的情况下独立聚焦。在此实例中的子单元包含可空间上调整的光学-机械安装件。更确切地说,在以上实例中的光源被为蓝激光和紫激光。通过使用光学子单元发生聚焦,其贯穿本发明更详细地论述。

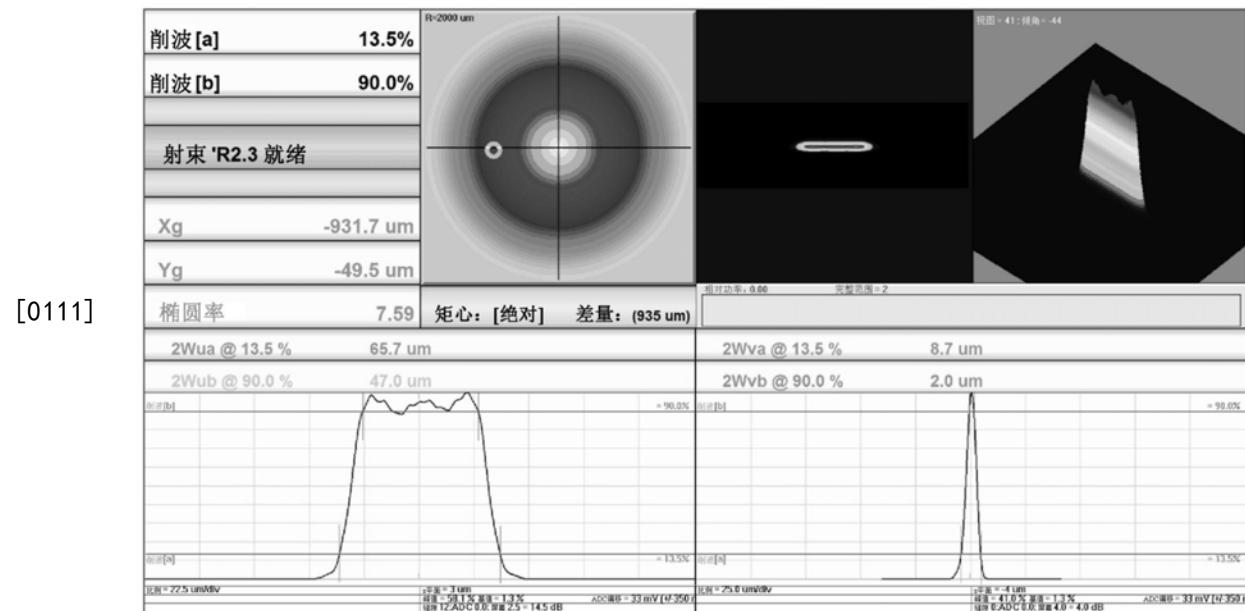
[0106] 标题为“蓝激光束聚焦”的图是两个激光系统,其中蓝激光束已独立于已被阻挡装置阻挡的紫激光束而聚焦到相机中。对于流式细胞仪内的最佳询问条件,射束宽度为约跨50微米,至少约90%强度电平或更高。高斯聚焦约2微米。激光束剖面和聚焦可取决于应用而具有不同最佳配置。

[0107] 标题为“紫激光束聚焦”的图是相同的两个激光系统,其中紫激光束已独立于已被阻挡装置阻挡的蓝激光束而聚焦到相机中。对于流式细胞仪内的最佳询问条件,射束宽度为约跨50微米,至少约90%强度电平或更高。高斯聚焦约2微米。激光束剖面和聚焦可取决于应用而具有不同最佳配置。

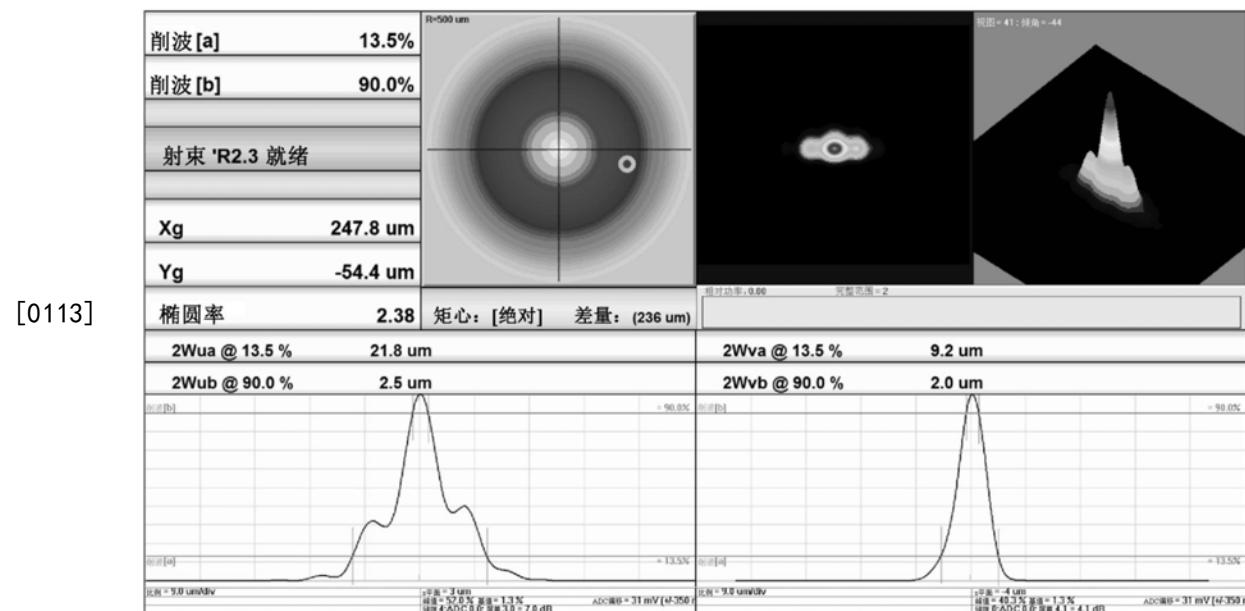
[0108] 标题为“蓝和紫激光束聚焦”的图呈现表明激光束及其射束塑形光学元件两者已经使用包含光学-机械安装件系统的光学子单元独立地聚焦的数据。展示平坦顶部激光束剖面的左下部分已正规化到蓝激光束,这是为何紫激光束展示不跨越曲线的高度的射束强度。然而,展示在已独立调整每一子单元之后,每一激光的强度的约90%在约50微米的射束宽度上发生。针对每一激光束的高斯聚焦为约2微米。使用如现有技术中所使用的最终聚焦透镜的这些调整将不允许独立调整来聚焦每一激光束。对于最终聚焦透镜的批评是,在优化一个激光束剖面的同时,用户可能减少另一激光束剖面的优化。此问题在其中实现独立射束剖面优化的系统中不会发生。

[0109] 实例6-减少像差射束堆叠

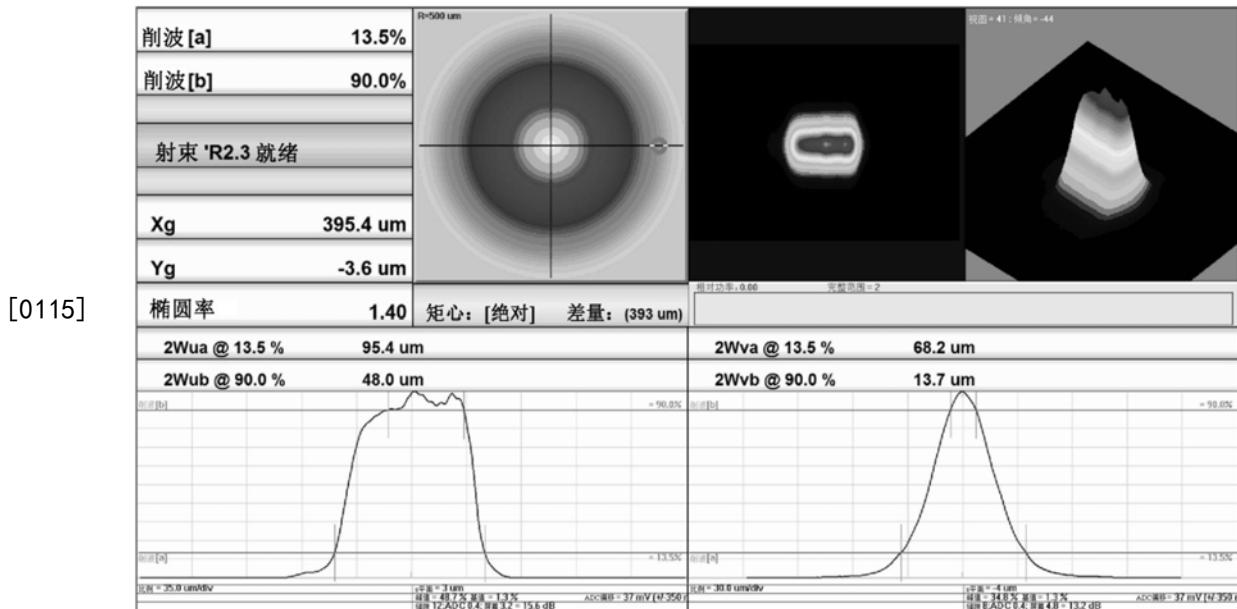
[0110] 蓝激光束聚焦



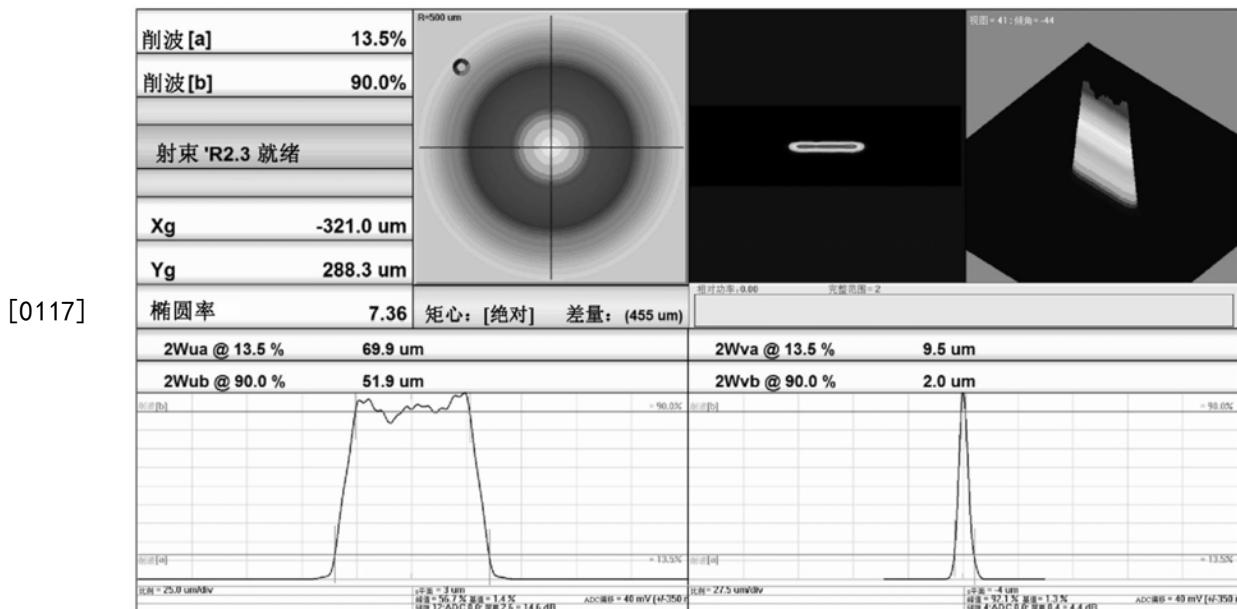
[0112] 具有3mm 45度窗口的蓝激光束-处于高斯聚焦



[0114] 具有3mm 45度窗口的蓝激光束-处于流顶部聚焦



[0116] 蓝激光束以2二向色立方体聚焦



[0118] 实例6将激光束穿过具有3mm宽度的45度平坦窗口(例如二向色板)时引入到光学系统的像差的量和强度与穿过二向色立方体元件、两个二向色立方体或不穿过光学元件时的情况进行比较。

[0119] 标题为“蓝激光束聚焦”的图展示在不使用任何二向色元件的情况下聚焦到相机中的蓝激光束。来自平坦顶部射束的数据在左下曲线中呈现,其中约90%的射束强度覆盖约47微米的平坦顶部宽度。聚焦在高斯轴上为约2微米。

[0120] 标题为“具有3mm 45度窗口的蓝激光束-处于高斯聚焦”的图呈现来自相机处聚焦的蓝激光束的数据,其中玻璃窗以约45度入射到激光源与相机之间的激光束倾斜。玻璃窗约3毫米厚且由玻璃构成。聚焦在高斯轴上为约2微米。左下曲线展示不再存在平坦顶部射束剖面,且射束宽度的仅约2.5微米在约90%射束强度之上延伸。此数据与来自第一图的数据之间的差异是归因于由于使激光束通过光学元件而引入像差。此光学配置并不适于需要

特定光学条件多种仪器,包含流式细胞测量术。当射束剖面呈现此图中展示的特性时,数据内产生大量噪声。

[0121] 标题为“具有3mm 45度窗口的蓝激光束-处于平坦顶部聚焦”的图呈现来自相机处聚焦的蓝激光束的数据,其中玻璃窗以约45度入射到激光束倾斜。玻璃窗约3毫米厚且由玻璃构成。通过最大平坦顶部剖面强度和宽度在何处发生而确定聚焦。相反情况在此图中与上一图一样发生。在此情况下,平坦顶部射束处于约90%强度,延伸约48微米。然而,高斯已在约90%射束强度下约2微米上方较好延伸(到约13.7微米)。此数据与来自第一图的数据之间的差异是归因于由于使激光束通过光学元件而引入像差。所获取数据中的噪声也将随着此射束剖面增加。

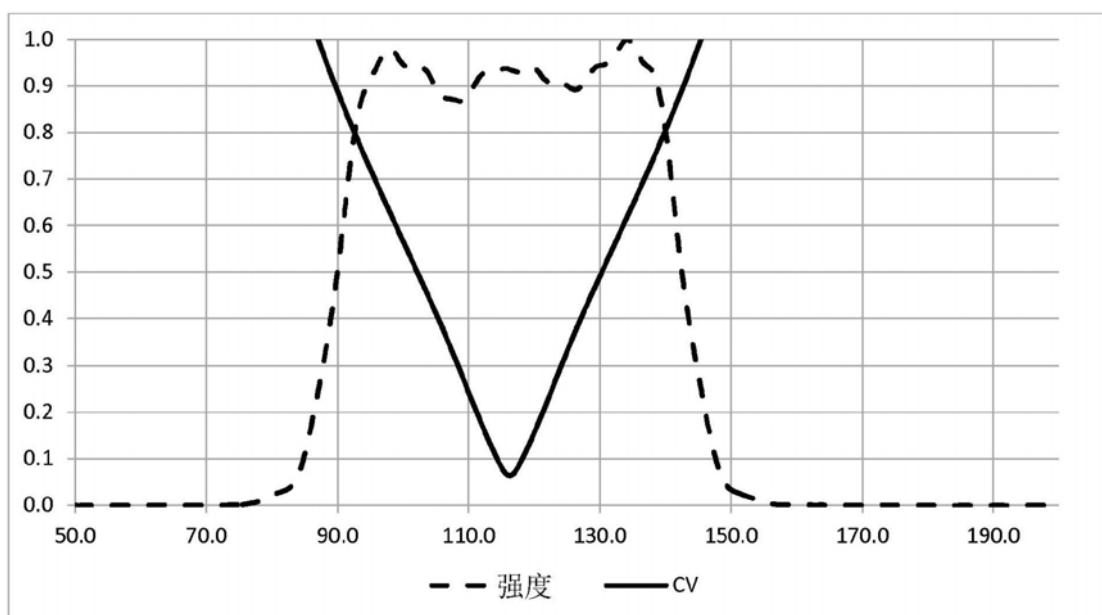
[0122] 标题为“蓝激光束以2二向色立方体聚焦”的图呈现来自穿过两个光学元件(二向色立方体)聚焦且聚焦到相机上的蓝激光的数据。在此实例中相比于第一图,激光束剖面极其紧密地匹配,其展示所述两个二向色立方体已经引入极少像差(如果存在的话)。这是因为当传播穿过两个二向色立方体时维持平坦顶部激光束剖面。平坦顶部聚焦具有约51.9微米的射束宽度,高斯聚焦具有约2微米的宽度。不同于由约3毫米玻璃窗口产生的射束剖面(其将很可能产生流式细胞测量术和其它应用中不可用的数据),此射束剖面将产生高质量数据。

[0123] 实例7-变化的百分比系数

[0124] 在流式细胞测量术中,粒子的复制测量值彼此一致的程度可表征为变化系数(CV)。信号强度的可变性的量度随着粒子重复通过光源(例如激光束)而产生。可变性表达为平均信号强度的百分比。此统计测量值在此项技术中众所周知,且被界定为100乘以标准偏差除以均值。通常,较低CV意味着复制测量值彼此一致。下图中的每一者呈现两个图形曲线。点线曲线显示CV,且虚线曲线显示强度。y轴正规化到百分比,其中1.0为100百分比。x轴具有微米为单位。激光束在这些数据集中的每一者中汇聚。使用数据射线束'R2依次收集数据。通过将射束高度聚焦到约10微米来优化激光聚焦。变化系数(CV)使用约50微米窗口宽度计算。下方的曲线显示正规化强度以及移动窗口CV。

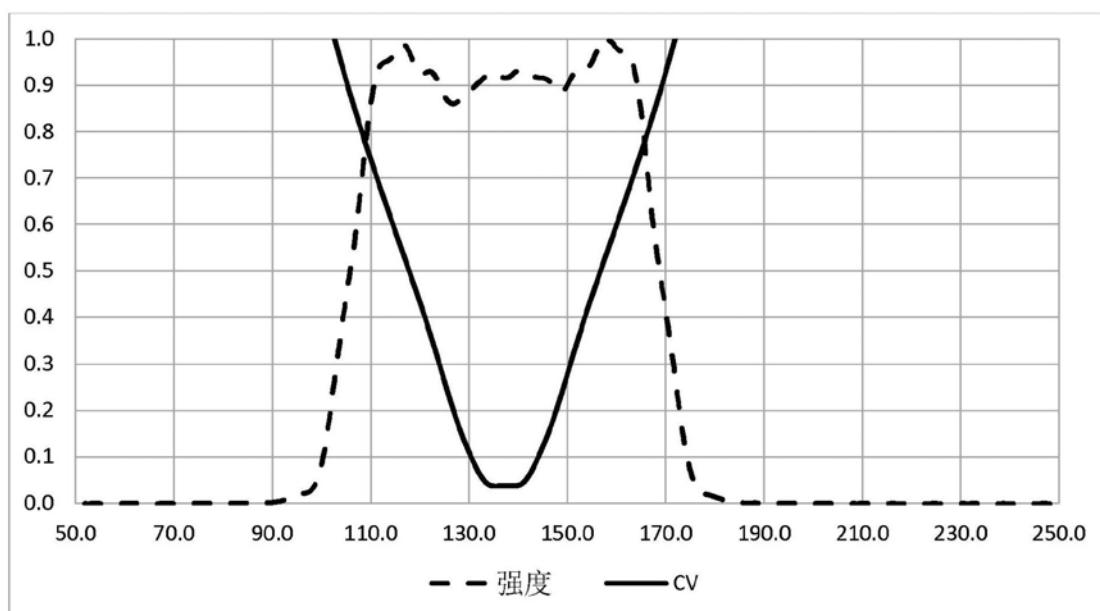
[0125] 针对自由空间中的射束的强度和CV

[0126]



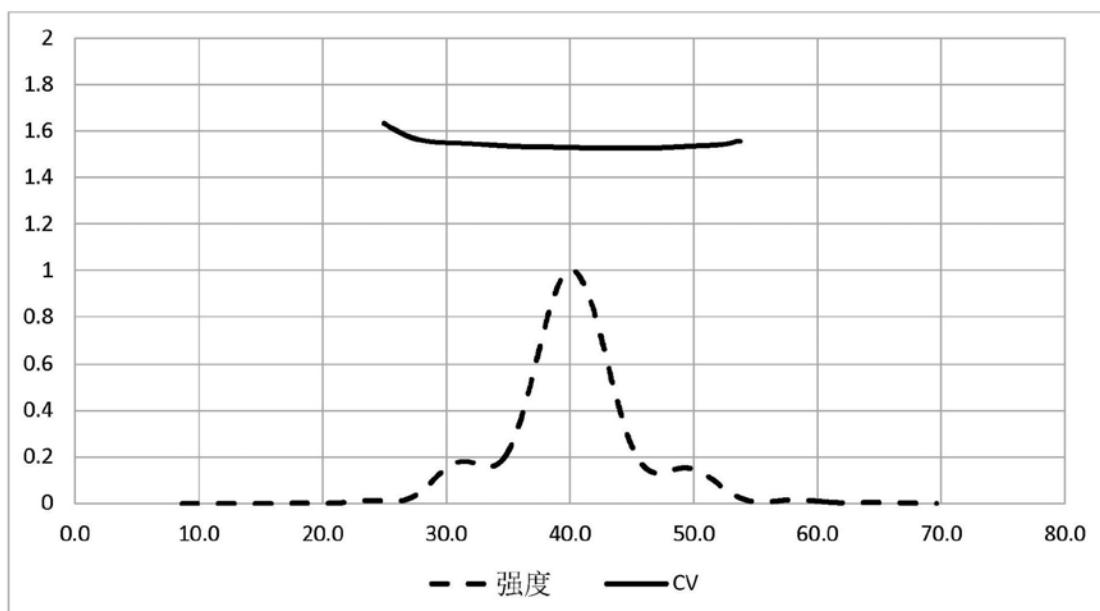
[0127] 针对传播穿过15mm BK7二向色立方体的射束的强度和CV

[0128]



[0129] 针对以45度入射角传播穿过3mm BK7板的射束的强度和CV

[0130]



[0131] 标题为“针对自由空间中的射束的强度和CV”的图中的数据通过将激光束聚焦到相机上来获取,其中光学路径中不具有二向色光学元件。所述数据展示平坦顶部激光束剖面,其中约50微米的激光束在约90%强度电平之上。CV下降到约0.5或约5%。

[0132] 标题为“针对传播穿过约15mm BK7二向色立方体的射束的强度和CV”的图中的数据通过将激光束聚焦到相机上来获取,其中激光束传播穿过约15毫米BK 7二向色立方体。BK7玻璃因其高透射速率和具有约1.5的折射率(取决于正透射的光的波长)而著名。所述数据展示平坦顶部激光束剖面,其中约50微米的激光束在约90%强度电平之上。CV下降到约0.5或约5%。更确切地说,激光束剖面不变,引入极少像差或不引入像差。

[0133] 标题为“针对以约45度入射角传播穿过约3mm BK7板的射束的强度和CV”的图中的数据通过将激光束聚焦到相机上来获取,其中激光束以约45度入射角传播穿过约3毫米BK

7二向色板。所述数据展示激光束剖面，其中约明显小于约50微米的激光束在约90%强度电平之上。CV的质量如此差以至于y轴已更改为适应高CV。例如此激光束剖面的激光束剖面已引入多个严重像差。所收集的数据将含有大量噪声且可能不可用。

[0134] 在此实例中、清楚地展示标准平板二向色板不能够适应此系统中的汇聚激光束。优选CV为约10%或更小。更优选的CV为约9%或更小。更优选的CV为约8%或更小。比8%更优选的CV为约7%或更小。比7%更优选的CV为约6%或更小。比6%更优选的CV为约5%或更小。比5%更优选的CV为约4%或更小。比4%更优选的CV为约3%或更小。比3%更优选的CV为约2%或更小。最优选的CV为约1%或更小。

[0135] 当前光学系统可通过能够在光学链的开始将光源独立地聚焦到汇聚光束且随后使所述汇聚光束穿过二向色立方体而非二向色板(此项技术中随处可见的光学元件,其常常以45度成角入射到入射光源)而从每一个别光源(例如激光束)实现这些CV值。

[0136] 最佳光束剖面具有平坦顶部。最佳光束宽度为约30到约70微米之间。更佳光束宽度在约35到约65微米之间。更佳光束宽度在约40到约60微米之间。更佳光束宽度在约45到约55微米之间。

[0137] 光学链可包括一或多个二向色立方体、一或多个二向色板、一或多个镜面、一或多个透镜、一或多个自旋盘、一或多个滤光轮、一或多个物镜、能够反射或透射的元件,或此项技术中任何已知的光学元件。另外,光学元件可包括塑料、玻璃,或任何其它已知或有用的材料或材料的组合。举例来说,玻璃表面可涂覆有反射材料,其中所述反射材料可为除玻璃外的材料。

[0138] 虽然结合各种实施例来描述本发明教示,但是并不打算将本发明教示限于这类实施例。相反,如所属领域的技术人员应了解,本教示涵盖各种替代方案、修改和等效物。

[0139] 另外,在描述各种实施例的过程中,说明书可能将方法和/或过程呈现为特定序列的步骤。然而,在方法或过程不依赖于本文阐述的步骤的特定次序的程度上,方法或过程不应限于所描述的步骤的特定序列。如所属领域的一般技术人员将了解,步骤的其它序列可以是可能的。因此,在说明书中阐述的步骤的特定次序不应理解为对权利要求书的限制。另外,针对方法和/或过程的权利要求书不应限于以书写的次序进行其步骤,并且所属领域的技术人员可以易于了解的是所述序列可以变化并且仍保持在各种实施例的精神和范围内。

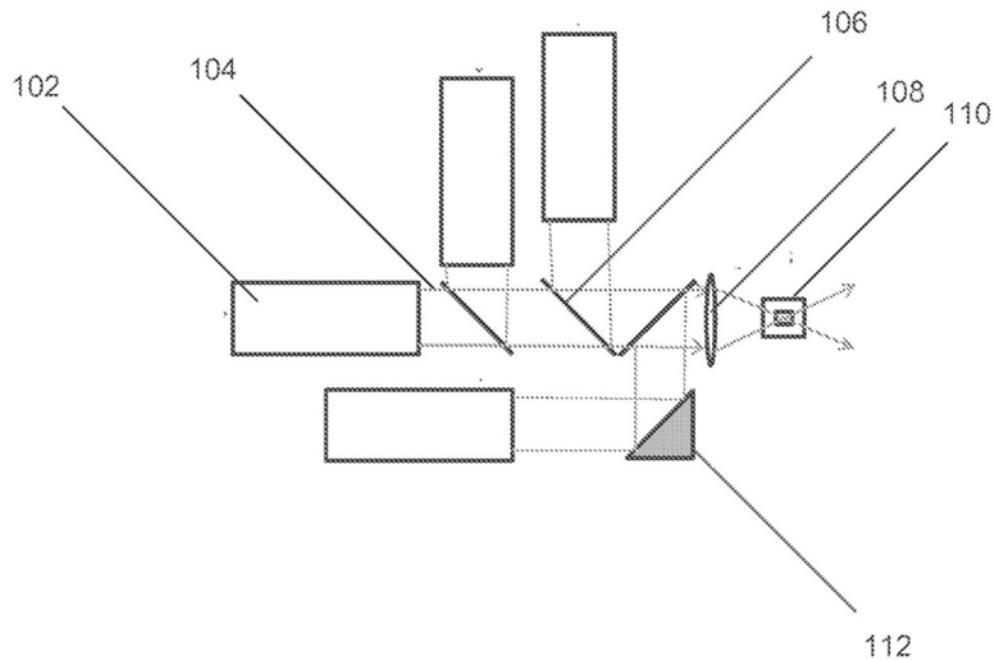


图1
(现有技术)

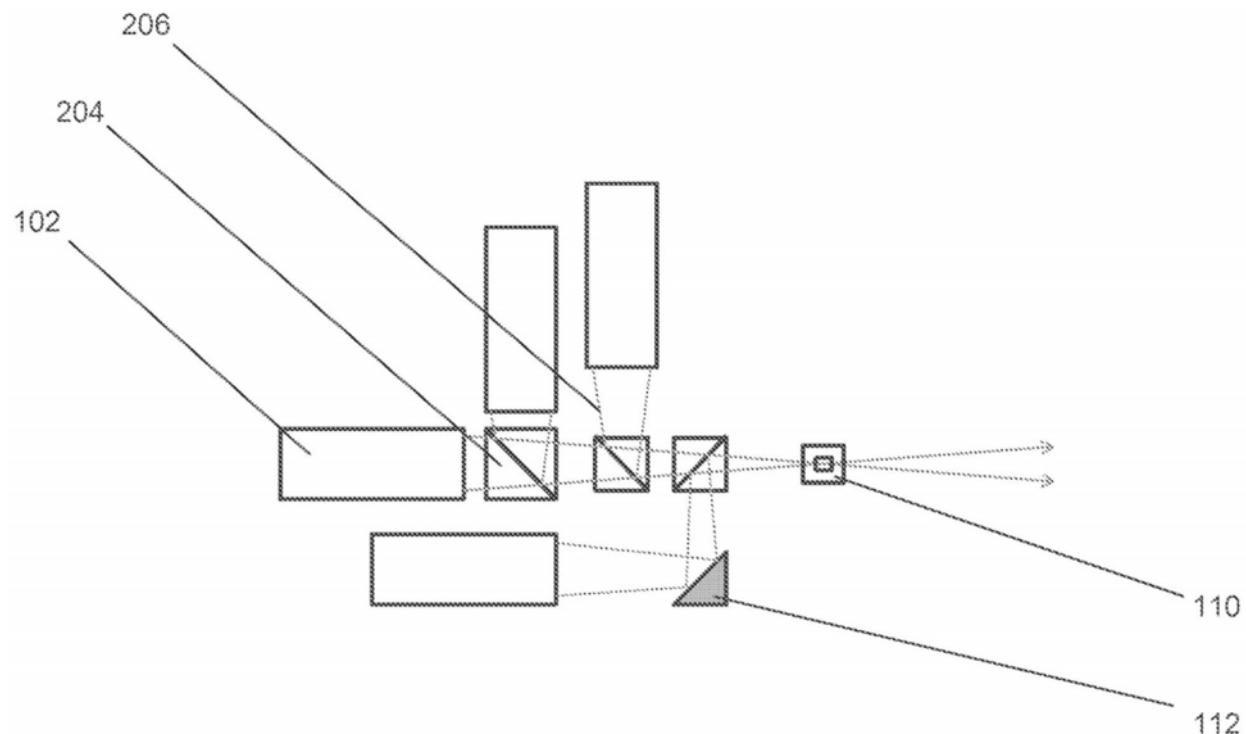


图2

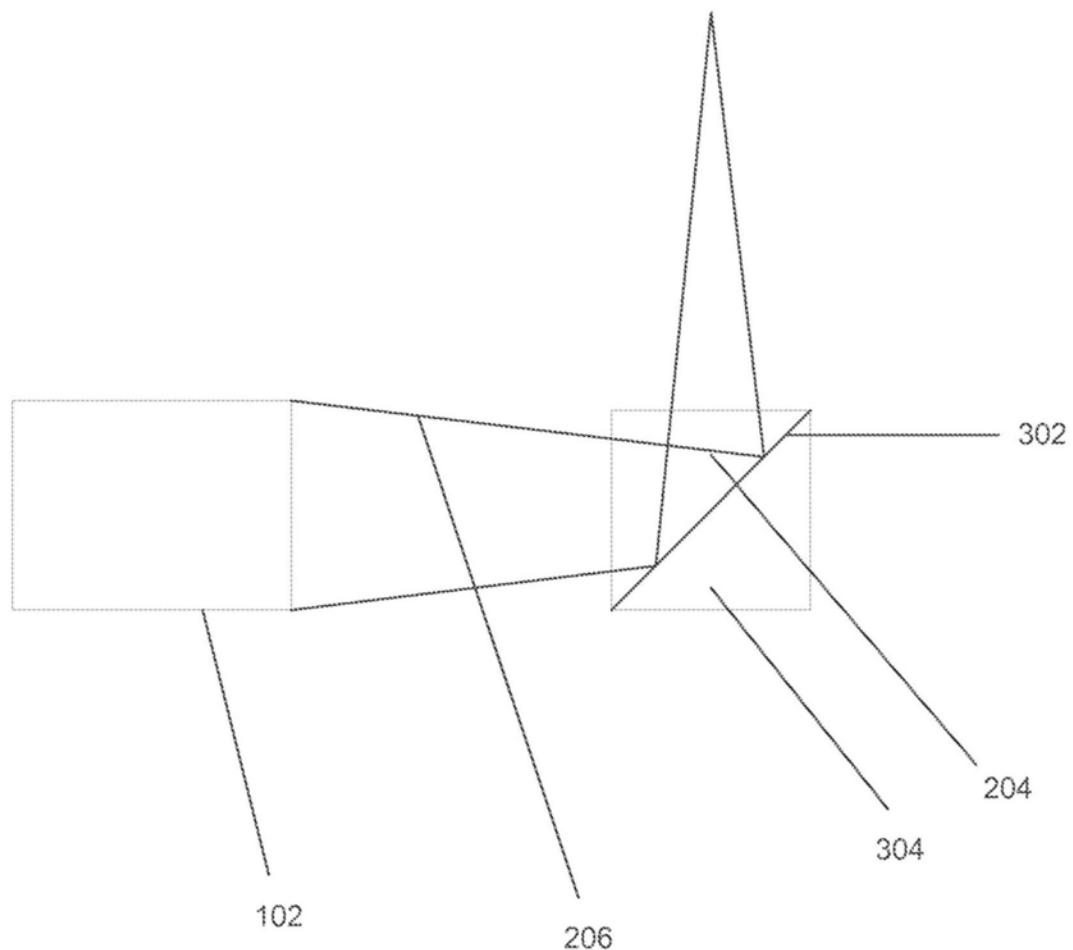


图3

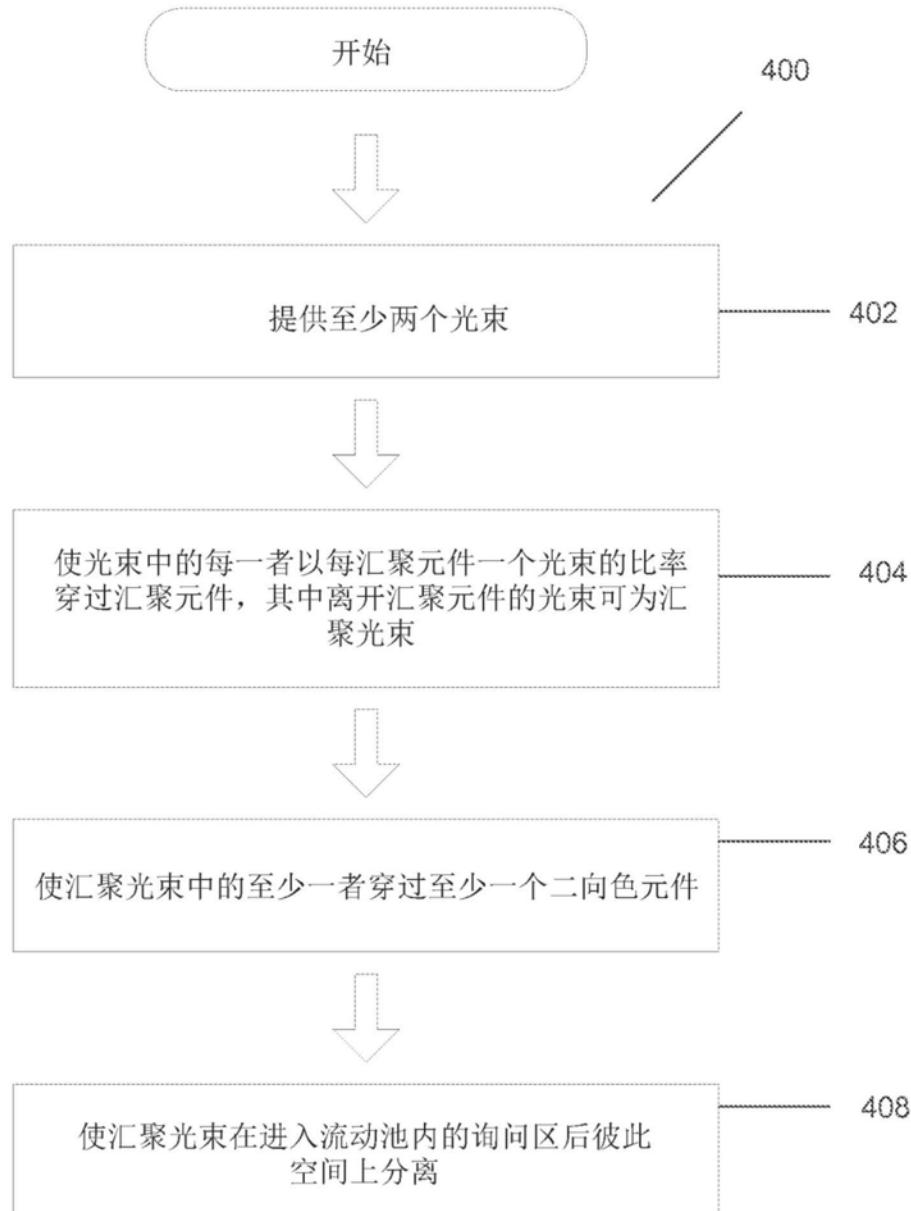


图4

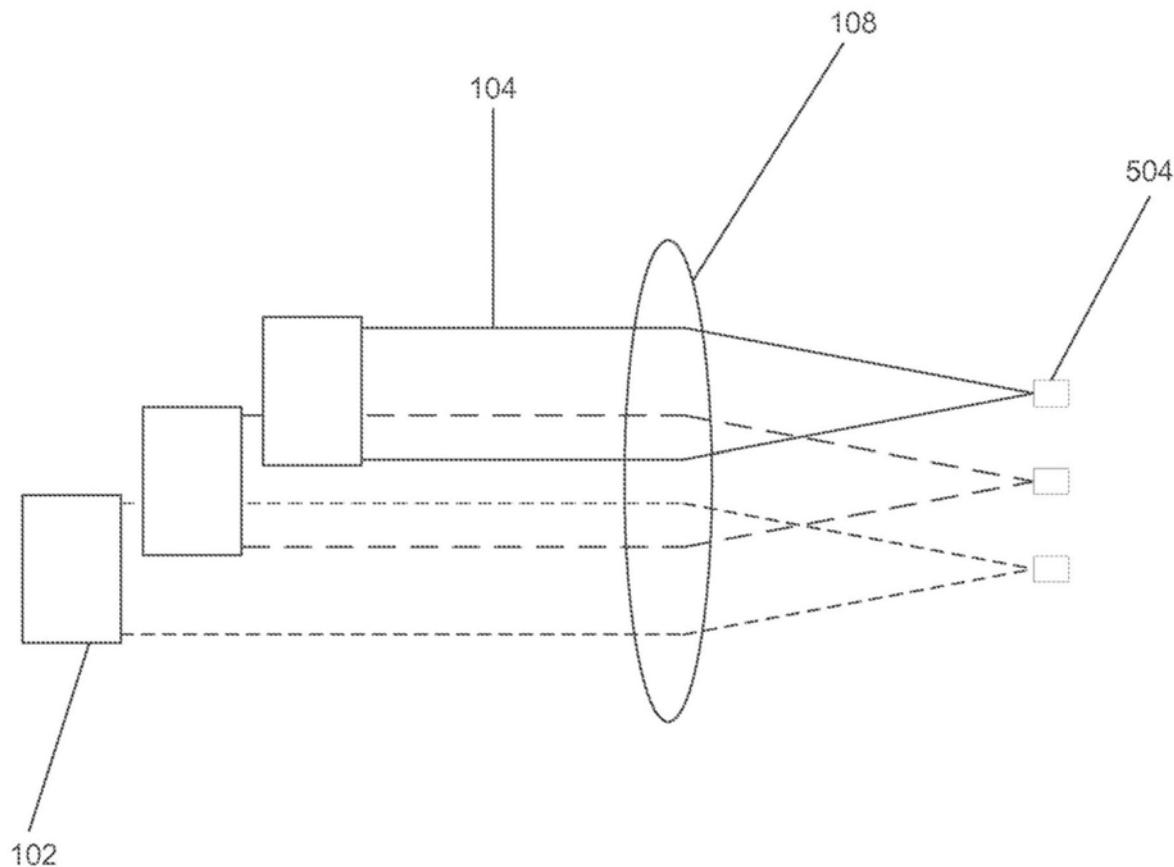


图5A

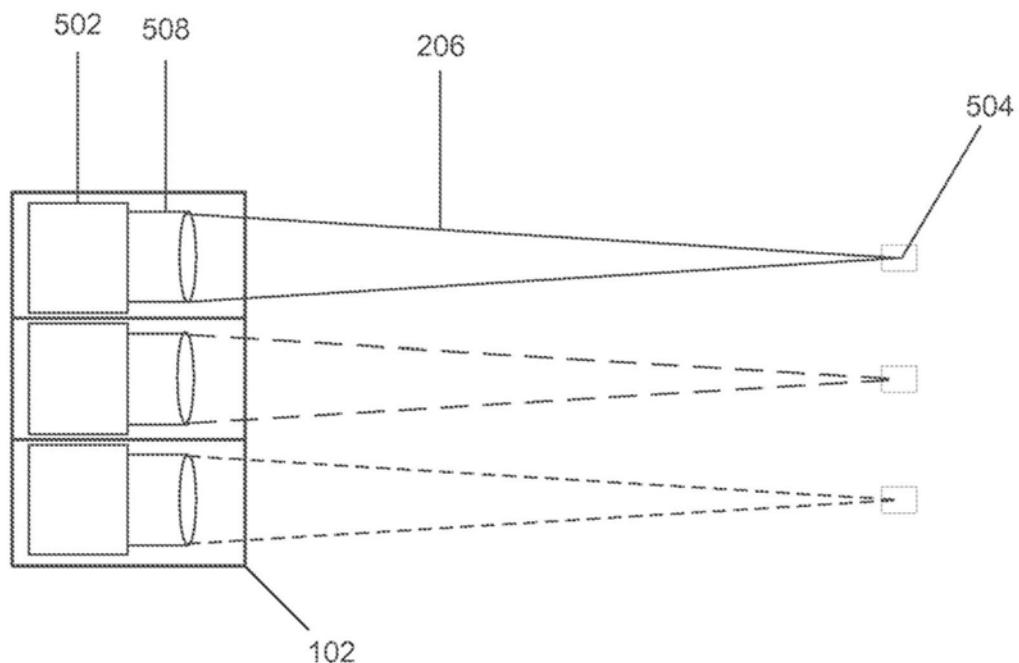


图5B