



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103443625 A

(43) 申请公布日 2013. 12. 11

(21) 申请号 201180054859. 5 *G01N 21/25* (2006. 01)

(22) 申请日 2011. 10. 20 *G01N 33/52* (2006. 01)

(30) 优先权数据 *G01N 21/63* (2006. 01)

61/405, 479 2010. 10. 21 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2013. 05. 14

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2011/057177 2011. 10. 20

(87) PCT申请的公布数据

W02012/054783 EN 2012. 04. 26

(71) 申请人 耐克思乐生物科学有限责任公司

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 L·L·常 J·丘 P·李

K·弗拉纳根 T·史密斯

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平

(51) Int. Cl.

G01N 33/53 (2006. 01)

权利要求书3页 说明书6页 附图4页

(54) 发明名称

成像细胞仪的内部聚焦参考珠

(57) 摘要

本发明一般地涉及可用于分析和测量细胞和生物样品的分析和监测系统。更具体地,本发明提供用于细胞成像仪的内部校准和聚焦参考的系统和方法。

1. 一种用于检测样品中目标细胞存在或浓度的方法,其包含:

将待检测的用于确定目标细胞的存在或浓度的样品与预先确定量的微粒混合,其中所述目标细胞在第一激发波长下激发后能在第一检测波长下发射荧光,并且其中所述微粒在第二激发波长下激发后能在第二检测波长下发射荧光;

将样品负载于荧光成像系统的样品室;

将光束导向样品,其中所述光束包含第二激发波长;

在第二检测波长下获得所述样品的荧光图像;

用在第二检测波长下获得的荧光图像校准荧光成像系统;

将第二光束导向样品,其中所述第二光束包含第一激发波长;

在第一检测波长下获得所述样品的荧光图像;和

测定样品中目标细胞的存在或浓度。

2. 根据权利要求 1 的方法,其中所述目标细胞能在不用染料染色时发射荧光。

3. 根据权利要求 1 的方法,其中所述目标细胞能在用染料染色时发射荧光。

4. 根据权利要求 1 的方法,其中所述微粒能在不用染料染色时发射荧光。

5. 根据权利要求 1 的方法,其中所述微粒能在用染料染色时发射荧光。

6. 根据权利要求 1 的方法,其中所述目标细胞用在第一激发波长下激发后能在第一检测波长下发射荧光的第一染料染色,并且

其中所述微粒用在第二激发波长下激发后能在第二检测波长下发射荧光的第二染料染色。

7. 根据权利要求 1 的方法,其包含:

将待检测的用于确定目标细胞的存在或浓度的样品用第一染料染色,其中所述第一染料在第一激发波长下激发后能在第一检测波长下发射荧光;和

将待检测的样品与预先确定量的、其上结合有在第二激发波长下激发后能在第二检测波长下发射荧光的第二染料的微粒混合。

8. 根据权利要求 6 的方法,其中在其上结合有第二染料的所述微粒在第二激发波长下激发后能在第一检测波长下发射荧光,并且

其中确定样品中目标细胞的存在或浓度包含将在第二检测波长下获得的样品荧光图像与在第一检测波长下获得的样品荧光图像进行比较。

9. 根据权利要求 1 的方法,其中校准所述荧光成像系统包含将荧光成像系统聚焦在作为参考的微粒上。

10. 根据权利要求 1 的方法,其中所述待检测的样品包含少于约 10^8 细胞 / 毫升的目标细胞。

11. 根据权利要求 10 的方法,其中所述待检测的样品包含少于约 10^5 细胞 / 毫升的目标细胞。

12. 根据权利要求 11 的方法,其中所述待检测的样品由在第一检测波长下获得的荧光图像中的单一目标细胞组成。

13. 根据权利要求 1 的方法,其中所述目标细胞选自白细胞、干细胞、脊髓细胞、滑液、体液细胞、牛乳体细胞和免疫表型。

14. 根据权利要求 1 的方法,其中所述微粒是微球。

15. 根据权利要求 1 的方法,其中所述微粒选自:各种荧光波长的聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯珠。

16. 根据权利要求 14 的方法,其中所述微球具有实质上均一的直径。

17. 根据权利要求 14 的方法,其中所述微球的直径是约 $3\ \mu\text{m}$ 至约 $50\ \mu\text{m}$ 。

18. 根据权利要求 17 的方法,其中所述微球的直径是约 $5\ \mu\text{m}$ 至约 $15\ \mu\text{m}$ 。

19. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第一染料选自:吖啶橙、碘化丙啶和溴乙锭。

20. 根据权利要求 19 的方法,其中所述第一染料是碘化丙啶。

21. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第二染料选自能在 UV 波长下激发并发射绿色荧光的染色剂。

22. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第二染料是 ProQ Emerald 300。

23. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第二染料是 Firefli 荧光绿染料。

24. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第一激发波长选自约 470nm 至约 550nm。

25. 根据权利要求 24 的方法,其中所述第一激发波长选自约 480nm 至约 525nm。

26. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第二激发波长选自约 350nm 至约 400nm。

27. 根据权利要求 26 的方法,其中所述第二激发波长选自约 375nm 至约 395nm。

28. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第一检测波长选自约 500nm 至约 640nm。

29. 根据权利要求 28 的方法,其中所述第一检测波长选自约 510nm 至约 600nm。

30. 根据权利要求 1 的方法,其中所述第二检测波长与第一检测波长相同。

31. 根据权利要求 30 的方法,其中所述第二检测波长选自约 510nm 至约 600nm。

32. 一种用于校准用来测量低浓度下目标细胞的荧光成像系统的方法,其包含:
制备包含预先确定量的、其上结合有能发射荧光的染料的微粒;

将光束导向样品,其中所述光束包含能对染料进行荧光激发的波长,从而产生微粒的可观测荧光图像;以及

用所述微粒的可观测荧光图像作为参考来校准所述荧光成像系统。

33. 根据权利要求 32 的方法,其中校准所述荧光成像系统包含用微粒作为定量参考对荧光成像系统正确地聚焦。

34. 根据权利要求 32 的方法,其中校准所述荧光图像系统包含测量作为定量内部参考的微粒的一种或多种性质。

35. 根据权利要求 34 的方法,其中所述微粒的一种或多种性质是粒度和荧光强度。

36. 根据权利要求 32 的方法,其中所述待测试的样品包含少于约 10^8 细胞/毫升的目标细胞。

37. 根据权利要求 32 的方法,其中所述微粒是微球。

38. 根据权利要求 32 的方法,其中所述微粒是聚苯乙烯或聚甲基丙烯酸甲酯。

39. 根据权利要求 37 的方法,其中所述微球具有实质上均一的直径。

40. 根据权利要求 37 的方法,其中所述微球的直径是约 $3\ \mu\text{m}$ 至约 50 微米。

41. 根据权利要求 37 的方法,其中所述微球的直径是约 $5\ \mu\text{m}$ 至约 15 微米。

42. 根据权利要求 32 的方法,其中所述染料选自:吖啶橙、碘化丙啶和溴乙锭。

43. 根据权利要求 42 的方法,其中所述染料是碘化丙啶。

44. 根据权利要求 32 的方法,其中所述激发波长选自约 470nm 至约 550nm。

45. 根据权利要求 44 的方法,其中所述激发波长选自约 480nm 至约 525nm。
46. 根据权利要求 32 的方法,其中获得所述荧光图像的波长选自约 350nm 至约 400nm。
47. 根据权利要求 46 的方法,其中所述荧光图像在约 375nm 至约 395nm 获得。
48. 一种用于检测样品中生物物质存在的方法,其包含:
将待检测的用于确定生物物质存在的样品用在激发波长下激发后能在检测波长下发射荧光的染料染色;
将待检测的样品与预先确定量的、在激发波长下激发后能在检测波长和参考波长二者下发射荧光的微粒混合;
在参考波长下获得样品的荧光图像;
在检测波长下获得样品的荧光图像;和
确定样品中生物物质的存在。
49. 根据权利要求 48 的方法,其中所述待检测的样品包含少于约 10^8 细胞 / 毫升的生物物质。
50. 根据权利要求 48 的方法,其中所述微粒是微球。
51. 根据权利要求 48 的方法,其中所述微粒是聚苯乙烯或聚甲基丙烯酸甲酯。
52. 根据权利要求 50 的方法,其中所述微球具有基本上均一的直径。
53. 根据权利要求 50 的方法,其中所述微球的直径是约 $3\ \mu\text{m}$ 至约 $50\ \mu\text{m}$ 。
54. 根据权利要求 53 的方法,其中所述微球的直径是约 $5\ \mu\text{m}$ 至约 $15\ \mu\text{m}$ 。
55. 根据权利要求 48 的方法,其中所述染料选自:吖啶橙、碘化丙啶、溴乙锭和其他核酸染色剂。
56. 根据权利要求 55 的方法,其中所述染料是碘化丙啶。
57. 根据权利要求 48 的方法,其中所述激发波长选自约 470nm 至约 550nm。
58. 根据权利要求 57 的方法,其中所述激发波长选自约 480nm 至约 525nm。
59. 根据权利要求 48 的方法,其中所述参考激发波长选自约 350nm 至约 400nm。
60. 根据权利要求 48 的方法,其中所述检测波长选自约 510nm 至约 600nm。

成像细胞仪的内部聚焦参考珠

技术领域

[0001] 本发明一般地涉及用于分析和测量细胞和生物样品的分析和监测系统。更具体地说,本发明涉及用于成像细胞仪的内部校准和聚焦参考的系统和方法。

背景技术

[0002] 在医疗诊断和生物医学研究领域的一个重要方面涉及通过测试生物样品如血液、脊髓液、细胞培养物和尿液来对所感兴趣的各种细胞和生物分子进行检测、识别、量化和表征。医疗服务提供者和生物医学研究人员对这些生物样品的细胞与生物分子的微观存在和浓度进行了常规分析。

[0003] 例如,在用于输血资格的患者血液样本中需要确认白细胞数(即白血细胞)。通过使用成像细胞仪的方法(Cellometer, Nexcelom Bioscience, LLC),白细胞计数可以通过对薄腔室的大面积成像来测量,它允许在一个特定的扫描体积之内计数所有的白细胞。全血中含有高浓度的红血细胞,其经常阻碍白细胞被肉眼看到,除非红血细胞被溶解或采用专门用于染色白细胞的荧光方法。上面提到的检测方法,去白细胞的专业人员使用荧光或者使用当红血细胞溶解时的亮视野,将能够聚焦于白细胞上。然而,大多数去白细胞的病人血液样本中含有浓度非常低的白细胞。因此,成像系统可能无法检测到任何白细胞的存在,这表示在图像视野中没有进行聚焦的对象。

[0004] 因此,对于提供简单和精确的校准和用于聚焦的内部参考和质量控制从而允许准确和快速成像以及超低浓度样品测量的系统和方法存在长期需求。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明基于一个独特的设计方法,其获得用于成像细胞仪校准和内部聚焦的显著改善的系统。本发明提供了在测量、分析、计数或监测显微对象例如各种类型的生物细胞方面的改进。特别地,该系统允许对极低浓度下的细胞进行更精确的检测和测量。该新颖的方法对于确认低浓度去白细胞血液样品的细胞计数能有效并高效率地内部聚焦和参考,并显著地改善检测限和从成像细胞仪获得的结果的置信度。

[0007] 在一个方面,本发明一般地涉及用于确定样品中目标细胞的存在或浓度的方法。该方法包含:将待检测的用于确定目标细胞的存在或浓度的样品与预先确定量的微粒混合,其中所述目标细胞在第一激发波长下激发后能够在第一检测波长下发射荧光,并且其中所述微粒在第二激发波长激发后能够在第二检测波长下发射荧光;将样品负载于荧光成像系统的样品室;将光束导向样品,其中所述光束包含第二激发波长;在第二检测波长下获得所述样品的荧光图像;用在第二检测波长下获得的荧光图像校准荧光图像系统;将第二光束导向样品,其中所述第二光束包含第一激发波长;在第一检测波长下获得所述样品的荧光图像;并且确定样品中目标细胞的存在或浓度。

[0008] 在另一个方面,本发明一般地涉及用来校准用于在低浓度下测量目标细胞的荧光成像系统的方法。所述方法包含:制备一种包含预先确定量的、其上结合有能发射荧光的染料的微粒;将光束导向样品,其中所述光束包含能对所述染料进行荧光激发的波长,从而

导致所述微粒的可观测荧光图像；并且用观测到的微粒荧光图像作为参考校准荧光成像系统。

[0009] 在还有另一个方面，本发明一般地涉及用于检测样品中生物物质存在的方法。所述方法包含：将待检测的用于确定生物物质存在的样品使用在激发波长的激发后能够在检测波长下发射荧光的染料进行染色；将待检测样品与预先确定量的、在激发波长下激发后能在检测波长和参考波长两者下发射荧光的微粒进行混合；在参考波长下获得所述样品的荧光图像；在检测波长下获得所述样品的荧光图像；并且确定样品中生物物质的存在。

[0010] 附图简述

[0011] 图 1 显示了一种示例性的现有技术细胞计数系统。

[0012] 图 2 显示（左上）吖啶橙（AO）染色血液样品的亮视野图像；（右上）UV 激发下的染色样品，其导致没有荧光信号；（左下）蓝光激发下的染色样品，其导致 AO 染色白细胞的明亮荧光信号。

[0013] 图 3 显示了（左）紫外激发下的微球，其导致明亮的荧光信号；（右）在蓝光激发下的微球，其不产生荧光信号。

[0014] 图 4 显示了（左）紫外激发下的微球，其导致明亮的荧光信号；（右）在蓝光激发下的 AO 染色的微球，显示出 AO 结合于微球并发射绿色荧光。

[0015] 图 5 显示了（左）紫外激发下的微球，其导致明亮的荧光信号；（右）在蓝光激发下的微球以及 AO 染色的白细胞，对于这两种粒子都显示出 AO 明亮的荧光。

[0016] 图 6 显示了（左）紫外激发下的微球，其导致明亮的荧光信号；（右）在蓝光激发下的微球以及 AO 染色的白细胞，对于这两种粒子都显示出 AO 明亮的荧光。红线圆圈是在两个频率（channel）中都发荧光的微球。

[0017] 图 7 显示了紫外激发下的微球，其导致明亮的荧光信号，而 PI 染色的 Jurkat 细胞只发射轻微荧光；（右）只有在蓝光激发下的 PI 染色的 Jurkat 细胞显示出 PI 明亮的荧光。红线圆圈是在两个频率中都发荧光的微球。

[0018] 图 8 显示了紫外激发的珠（绿色）和碘化丙啶（蓝色）的激发和发射光谱。紫外光激发珠和 PI 染色 Jurkat 细胞两者，并且长通滤波器收集二者的荧光，除了 Jurkat 细胞更弱一些。蓝光只激发 PI；因此，只有 Jurkat 细胞能够被检测到。

[0019] 发明详述

[0020] 本发明提供了一种独特设计方法以及一种用于成像细胞仪的校准和内部聚焦的显著改进的系统。特别地，本发明提供了在测量、分析、计数或监测显微可见对象例如各种类型的生物细胞方面的改进。本发明的系统允许对在极低浓度下的细胞进行更精确的检测以及测量。该新颖的方法显著地降低了检测限和增加了从成像细胞仪获得的结果的置信度。

[0021] 很多疾病的生物机制已经通过对体液或组织样本的微观检查而被阐明。组织病理学检查也为对多种疾病有效医学治疗的发展提供了机会。在标准的解剖病理学中，基于细胞形态和染色特征进行诊断。对经由标准方法（例如苏木精和曙红）染色组织样本的微观检查和分类已经显著促进了癌症的治疗。例如，肿瘤样品可以被检查从而描绘出肿瘤类型并提示患者是否可能响应于特定类型的化疗。

[0022] 传统地，对基于细胞分析的荧光检测使用荧光显微镜、荧光板阅读器

(fluorescent plate reader) 或流式细胞仪进行。这些荧光检测方法通常引入昂贵的激发光源例如激光或弧光灯,从而具有高强度的激发。通常,存在激发光源和具有用来收集特定荧光信号的发射滤光器的检测探针。在一种仪器例如荧光显微镜中,通常需要二向色滤光器来反射从顶部正常入射到目标生物样品的光。发射的荧光经由二向色滤光器进入检测器(相机、分光仪等)然后被收集。

[0023] 以前, Nexcelom Bioscience fluorescent Cellometer 技术在由光学镜片、相机和样品夹持器的组合件中使用 Omega Optical 提供的滤管。它能提供细胞和其他生物样品的足够的荧光图像(图1)。该技术提供了简单且有效率的方法来产生生物样品荧光图像,但是对于低荧光信号检测缺乏灵敏度。一个可归因的因素是激发光在滤管中通过发射滤光器的泄漏。只有一个特定的滤管和一个 LED 能被用于一种颜色,没有太多的空间引入其他颜色。

[0024] 如本文所公开的,在本发明的一个实施方式中,使用荧光微球来开发一种用于低浓度去白细胞血液样品的简单内部聚焦和校准方法。目前的荧光检测白细胞方法是用吖啶橙(AO)核酸染料染色,并且使用 480nm/525nm 波长激发/发射。通过使用能够在紫外(UV)光下激发并发射绿色荧光(525nm)的荧光微球,人们可以改变激发光源来检测 UV 激发下用于聚焦的微球然后计数蓝光激发的 AO 染色的白细胞。

[0025] 本发明显著改善了灵敏度和检测限。

[0026] 在一个方面,本发明一般地涉及用于确定样品中目标细胞的存在或浓度的方法。该方法包含:将待检测的用于确定目标细胞存在或浓度的样品与预先确定量的微粒混合,其中所述目标细胞在第一激发波长下激发后能够在第一检测波长下发射荧光,并且其中所述微粒在第二激发波长激发后能够在第二检测波长下发射荧光;将样品负载于荧光成像系统的样品室;将光束导向样品,其中所述光束包含第二激发波长;在第二检测波长下获得所述样品的荧光图像;用在第二检测波长下获得的荧光图像校准荧光成像系统;将第二光束导向样品,其中所述第二光束包含第一激发波长;在第一检测波长下获得所述样品的荧光图像;并且确定样品中目标细胞的存在或浓度。

[0027] 在一些实施方式中,目标细胞能在不用染料染色时发射荧光。在另一些实施方式中,目标细胞只能在用染料染色时发射荧光。

[0028] 在一些实施方式中,微粒能在不用染料染色时发射荧光。在另一些实施方式中,微粒只能在用染料染色时发射荧光。

[0029] 在某些优选的实施方式中,目标细胞用在第一激发波长下激发后能在第一检测波长下发射荧光的第一染料染色,并且微粒用在第二激发波长下激发后能在第二检测波长下发射荧光的第二染料染色。

[0030] 在某些实施方式中,本方法包含对待检测的用于确定目标细胞的存在或浓度的样品用第一染料进行染色,其中第一染料在第一激发波长下激发后能在第一检测波长下发射荧光;并且将待检测的样品和预先确定量的、其上结合有在第二激发波长下激发后能在第二检测波长下发射荧光的第二染料的微粒混合。

[0031] 在一些优选的实施方式中,其上结合有第二染料的微粒在第二激发波长下激发后能在第一检测波长下发射荧光。并且检测样品中目标细胞的存在或浓度包含将在第二检测波长下获得的样品的荧光图像和在第一检测波长下获得的样品的荧光图像进行比较。

[0032] 在某些实施方式中,校准荧光成像系统包含在作为参考的微粒上聚焦荧光成像系统。

[0033] 待检测的样品可以具有少于约 10^8 细胞 / 毫升的目标细胞 (例如,少于约 10^7 细胞 / 毫升、少于约 10^6 细胞 / 毫升、少于约 10^5 细胞 / 毫升、少于约 10^4 细胞 / 毫升、少于约 10^3 细胞 / 毫升、或少于约 10^2 细胞 / 毫升的目标细胞)。在某些实施方式中,待检测的样品在第一检测波长下获得的荧光图像中由单一目标细胞组成。

[0034] 使用本发明方法可以分析的样品包含获自或衍生自活有机体的生物物质。这样的样品包含,但不限于,头发、皮肤、组织、培养的细胞、培养的细胞介质和体液。目标细胞可以是适合于用本发明方法检测和测量的任何细胞,例如,白细胞、干细胞、脊髓细胞、滑液、体液细胞、牛乳体细胞和免疫表型。

[0035] 在某些优选的实施方式中,微粒是微球,例如,选自不同荧光波长的聚苯乙烯、聚甲基丙烯酸甲酯珠。

[0036] 在一些实施方式中,微球具有基本上均一的直径,例如,从约 $3\ \mu\text{m}$ 至约 $50\ \mu\text{m}$ 的直径、从约 $4\ \mu\text{m}$ 至约 $30\ \mu\text{m}$ 的直径或从约 $5\ \mu\text{m}$ 至约 $15\ \mu\text{m}$ 的直径。

[0037] 第一染料可以选自适于特定应用的任何染料,例如,吖啶橙、碘化丙啶 (PI) 和溴乙锭。

[0038] 第二染料可以选自能够在 UV 波长下激发和发射出绿色荧光的任何染色剂,例如, ProQ Emerald 300 或 Firefli 荧光绿染料。

[0039] 在一些实施方式中,第一激发波长选自约 470nm 至约 550nm,例如,选自约 480nm 至约 525nm。在一些实施方式中,第二激发波长选自约 350nm 至约 400nm,例如,约 375nm 至约 395nm。在一些其它实施方式中,第一激发波长选自约 580nm 至约 650nm、约 590nm 至约 640nm、约 600nm 至约 630nm。第二激发波长选自约 470nm 至约 525nm。

[0040] 在一些实施方式中,第一检测波长选自约 500nm 至约 640nm,例如,选自约 510nm 至约 600nm。在一些实施方式中,第二检测波长与第一检测波长相同,例如选自约 510nm 至约 600nm、约 690nm 至约 750nm 或约 700nm 至约 740nm。

[0041] 在另一个方面,本发明一般地涉及一种用来校准用于在低浓度下测量目标细胞的荧光成像系统的方法。所述方法包含:制备一种包含预先确定量的、其上结合有能发射荧光的染料的微粒的样品;将光束导向样品,其中所述光束包含能对所述染料进行荧光激发的波长,从而产生所述微粒的可观测荧光图像;并且用观测到的微粒荧光图像作为参考来校准荧光成像系统。

[0042] 在一些实施方式中,校准荧光成像系统包含用微粒作为定量参考来正确地聚焦荧光成像系统。

[0043] 在一些其它实施方式中,校准荧光成像系统包含测量用作定量内部参考的微粒的一种或多种性质,例如,微粒的粒度和荧光强度。

[0044] 在还有另一个方面,本发明一般地涉及用于检测样品中生物物质存在的方法。所述方法包含:将待检测的用于确定生物物质存在的样品用在激发波长下激发后能在检测波长下发射荧光的染料染色;将待检测的样品与预先确定量的、在激发波长下激发后能在检测波长和参考波长两者下发射荧光的微粒进行混合;在参考波长下获得所述样品的荧光图像;在检测波长下获得所述样品的荧光图像;并且确定样品中生物物质的存在。

实施例

[0045] 材料和仪器

[0046] 首先,为了开发内部聚焦参考方法,检查了两种类型的微球。两种微球都能在 UV 下激发和发射绿色波长。微球 #2 也能被蓝光激发和发射出绿光。测量微球在 UV 和蓝光下的激发,以观察其荧光输出。血液样品或者受试者,通过刺破他的手指来收集少量血。吖啶橙染料被制成 $10 \mu\text{g/ml}$ 用于染色血液样品中的白细胞。在开发内部聚焦参考微球时,使用 The Cellometer Vision(Nexcelom) 系统。该系统包含两个过滤器套件。一个套件具有在 UV 范围内的激发和发射出绿光,另一个套件具有蓝色范围内的激发和相同的绿光发射。

[0047] 初始荧光检测测量

[0048] 首先,用 $5 \mu\text{l}$ 的 A0 染色 20 微升血液样品并用绿光发射滤光器观察其在 UV 和蓝色激发下的荧光。染色的血液 ($20 \mu\text{l}$) 被移液至 Cellometer 的计数室并使用 Cellometer Vision 系统来检测荧光。接下来,微球被移至室并且在系统中也测量了他们的荧光。最后,将微球与 A0 混合并再次在系统中测量荧光。

[0049] 内部聚焦参考方法

[0050] 选自之前的实验中的合适的微球与 A0 染色的血液样品混合。将 20 微升血液样品、 $5 \mu\text{l}$ 的 A0 和 $5 \mu\text{l}$ 微球混合。混合物被移液至 Cellometer 计数室并得到白细胞计数的图像。

[0051] 初始荧光检测测量

[0052] A0 染色的血液样品的荧光图像显示于图 2。A0 染色白细胞的荧光信号在蓝光激发下是高的,并且在 UV 激发下没有信号。亮视野图像也显示于图 2 中,其中红血细胞覆盖整个图像,因而白细胞仅能在荧光下被观察到。

[0053] 微球的荧光图像显示于图 3。微球的荧光信号在 UV 激发下是高的,并且如同预期一样在蓝光激发下没有信号。结果显示 A0 染色的血液及微球混合物能用于在 UV 频率下聚焦样品并且在蓝光频率下仅计数 A0 染色的白细胞。

[0054] 与 A0 混合的微球的荧光图像显示于图 4。如同预期一样,微球荧光信号在 UV 激发下是高的。然而,在蓝光频率, A0 结合于微球并在蓝光激发下发射荧光。微球用前面提及的第二种类型代替,其在两种激发光源下都发射荧光。

[0055] 内部聚焦参考方法

[0056] 与微球混合的 A0 染色血液样品的荧光图像显示于图 5。混合物荧光信号表明在 UV 激发下仅有明亮微球荧光,而在蓝光激发下微球和 A0 染色白细胞两者都是高的。

[0057] 通过在 UV 激发频率下识别微球并利用他们进行聚焦,通过从蓝光频率的总计数中减去微球计数从而可以在蓝光频率下计数实际的白细胞。该方法可用于当血液样品中白细胞浓度非常低,其中只有一个或甚至没有细胞被检测到时。如果是这样的话,聚焦参考微球能够确保图像被聚焦在对象的焦平面上,因而在去白细胞血液样品是合格的情况下不产生偏差。

[0058] 实施例 1 白细胞成像

[0059] 用大幅照相机对大量血液进行成像,特别是用于确认去白细胞血液样品的白细胞计数。拍摄了两个图像(图 6),一个具有 UV 激发和另一个具有蓝光。血液样品用吖啶橙染

色剂和两个频率下都发射荧光的荧光珠稀释至 1 : 1。

[0060] 在 UV 激发频率下只计数珠并且在蓝光激发频率下计数所有的颗粒 (珠 +AO 染色白细胞), 相减得到了血液样品中白细胞浓度的测量值。

[0061] 实施例 2 白细胞成像

[0062] 使用 PI 染色的 Jurkat, 以及具有 510nm 长通滤波器的光学组件 QMAX 蓝和具有 510nm 长通滤波器的 535nm-401nm, 在 UV 和蓝光激发下取得了两个图像 (图 7 和图 8)。

[0063] 在检测 PI 染色 Jurkat 的频率下, 没有观测到珠的荧光信号。方法将涉及用珠在 UV 激发下聚焦, 然后转换至蓝光激发并计数 PI 染色的所有细胞。该方法相比于前面描述的方法更简单, 其中不需要进行相减。本方法是使用一种频率用珠聚焦, 并然后转换至另一个频率计数所有的细胞。

[0064] 引入作为参考

[0065] 在本公开中已经参考并引用了其它文献, 例如专利、专利申请、专利公开、杂志、书籍、论文、网络内容。出于所有的目的, 所有这些文件以其全部内容在此通过引用并入本文。

[0066] 等同物

[0067] 代表性的实施例旨在帮助解释本发明, 并不旨在也不应该被解释成用于限制本发明的范围。实际上, 根据本文件的全部内容 (包含实施例和本文引入的对科学及专利文献的引用), 对本领域技术人员而言, 除了本文显示和描述的这些内容, 对本发明的各种修改及其许多其它实施方式都是显而易见的。实施例包含重要的附加信息、例证和指导, 其能在其各种实施方式及其等价物中来适应于实施本发明。

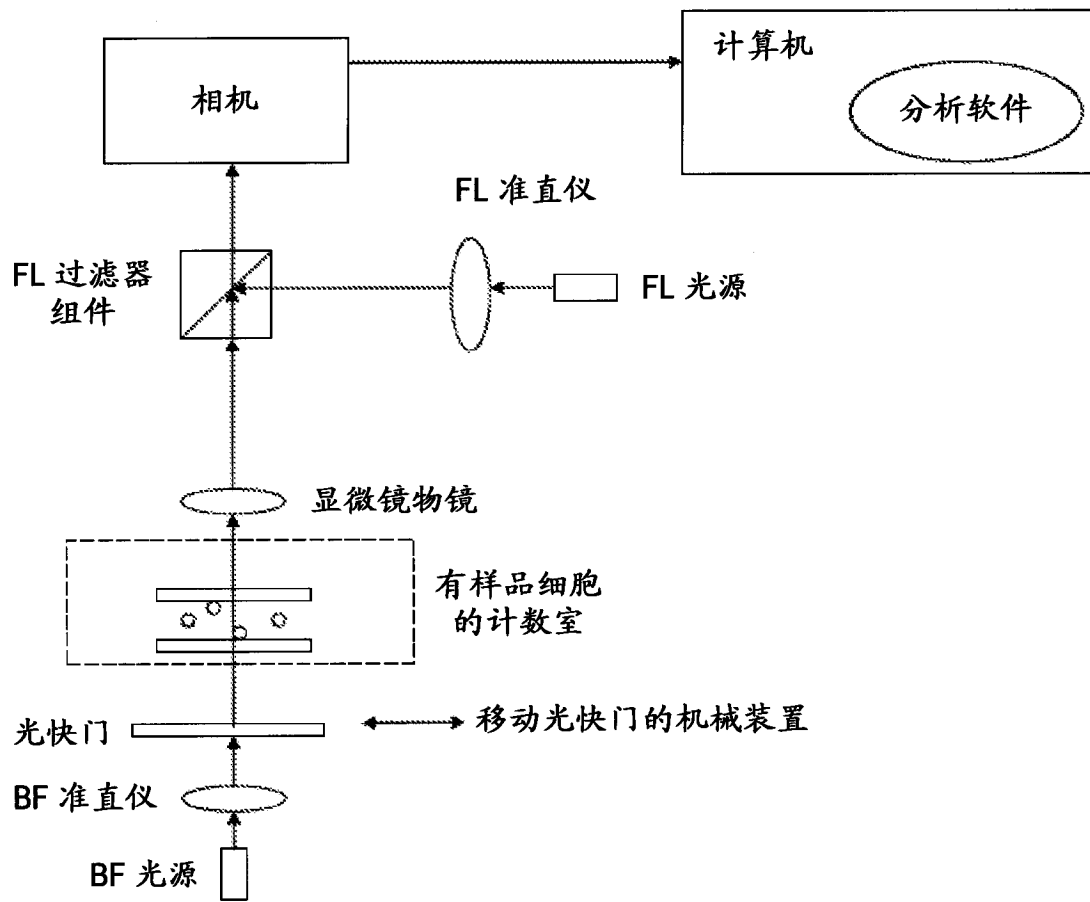


图 1

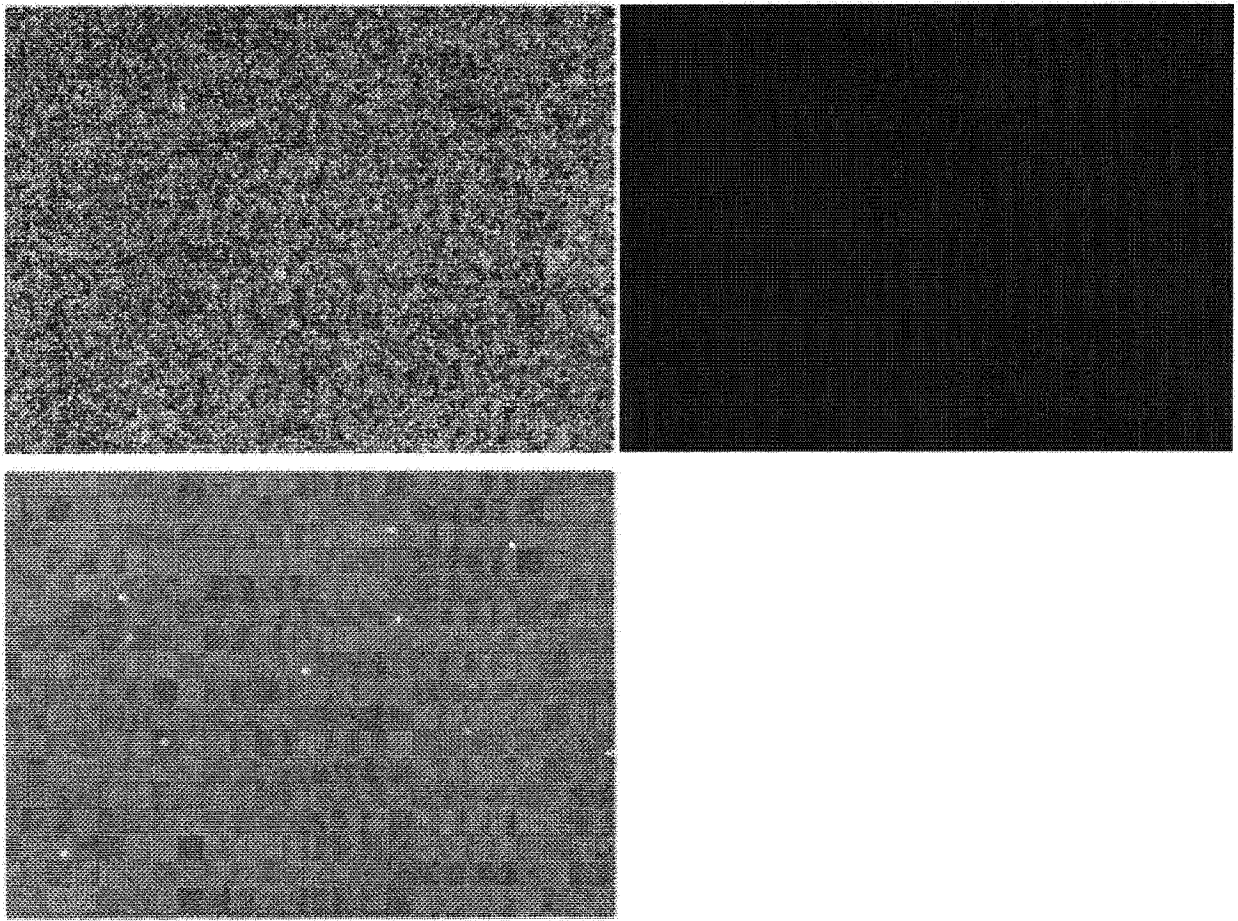


图 2

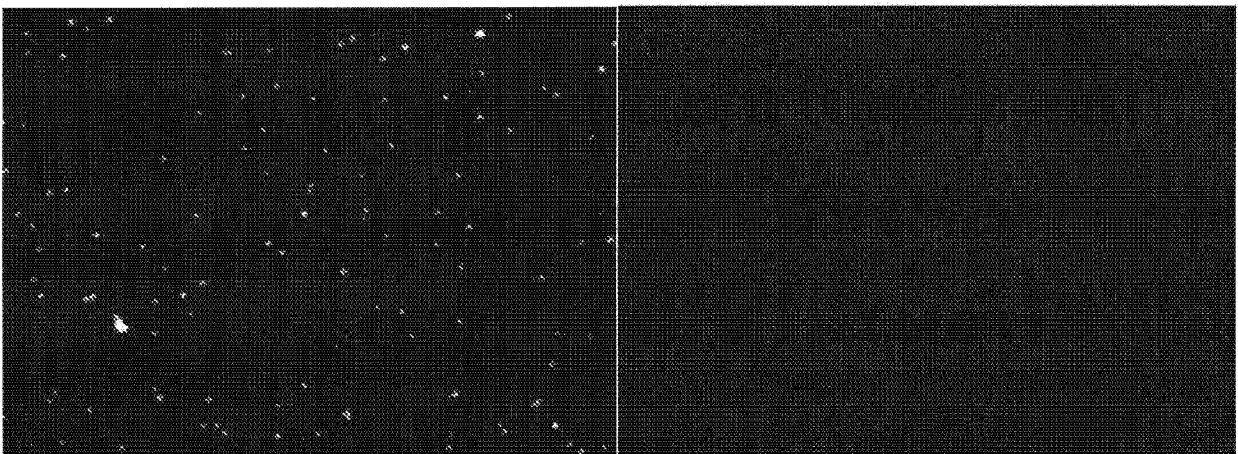


图 3

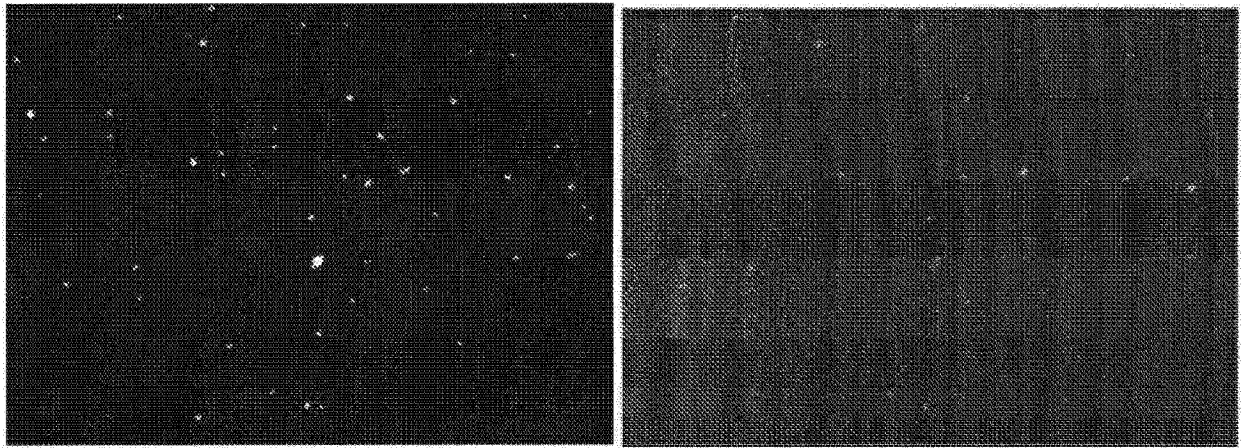
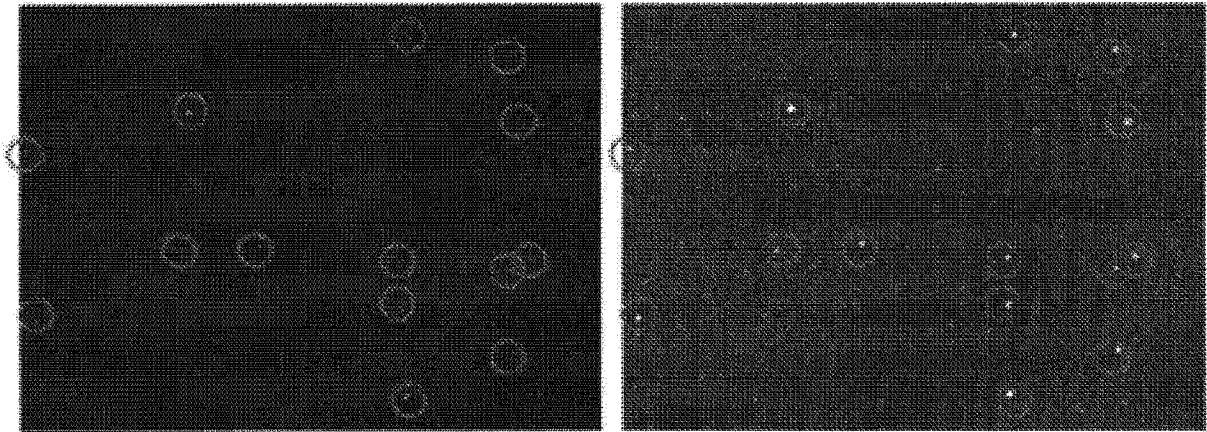


图 4



打开 UV 光并检测用于聚焦的珠

打开绿光并检测总微粒数 (WBC+ 珠)

图 5

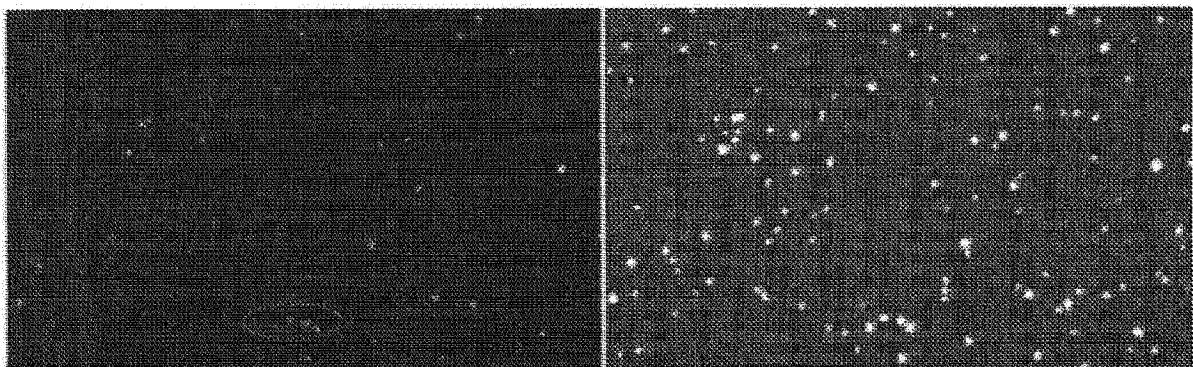


图 6

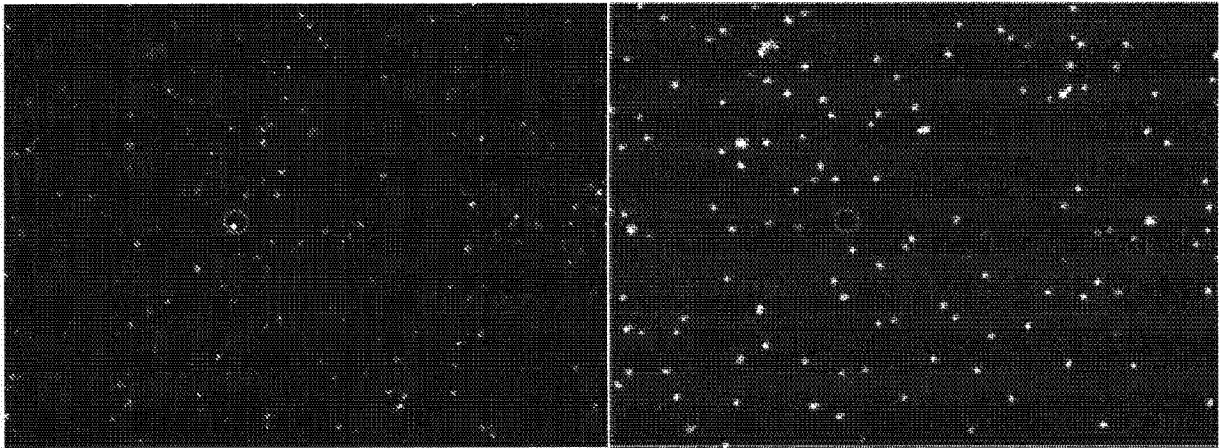


图 7

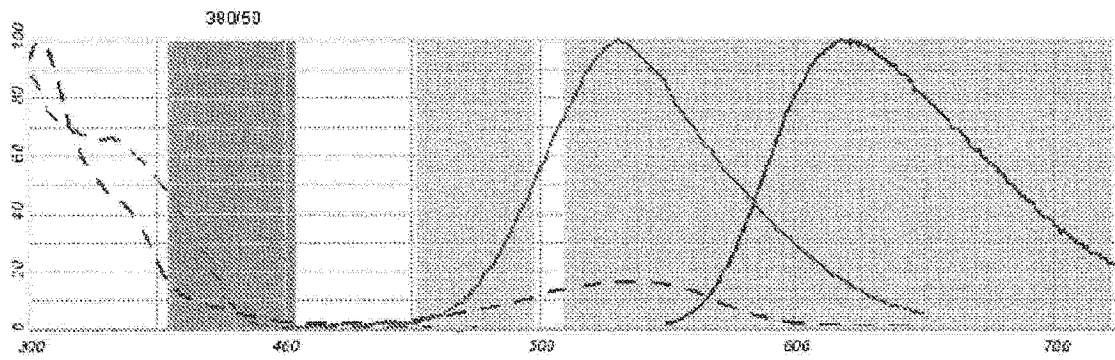


图 8

专利名称(译)	成像细胞仪的内部聚焦参考珠		
公开(公告)号	CN103443625A	公开(公告)日	2013-12-11
申请号	CN201180054859.5	申请日	2011-10-20
[标]发明人	LL常 J丘 P李 K弗拉纳根 T史密斯		
发明人	L·L·常 J·丘 P·李 K·弗拉纳根 T·史密斯		
IPC分类号	G01N33/53 G01N21/25 G01N33/52 G01N21/63 G16B45/00		
CPC分类号	G01N33/5094 G01N21/6428 G01N21/6456 G01N21/6486 G16B45/00		
代理人(译)	陈文平		
优先权	61/405479 2010-10-21 US		
其他公开文献	CN103443625B		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明一般地涉及可用于分析和测量细胞和生物样品的分析和监测系统。更具体地，本发明提供用于细胞成像仪的内部校准和聚焦参考的系统和方法。