



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 113711013 B

(45) 授权公告日 2024. 07. 23

(21) 申请号 202080011329.1

(22) 申请日 2020.01.31

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 113711013 A

(43) 申请公布日 2021.11.26

(30) 优先权数据  
20195074 2019.02.04 FI

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2021.07.28

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/FI2020/050056 2020.01.31

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02020/161384 EN 2020.08.13

(73) 专利权人 生命科技控股私人有限公司  
地址 新加坡新加坡市

(72) 发明人 A·法拉雷洛 P·托伊瓦宁

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100  
专利代理师 陈依心 黄嵩泉

(51) Int.Cl.  
G01N 21/64 (2006.01)

(56) 对比文件  
US 2007177149 A1, 2007.08.02

审查员 刘建朝

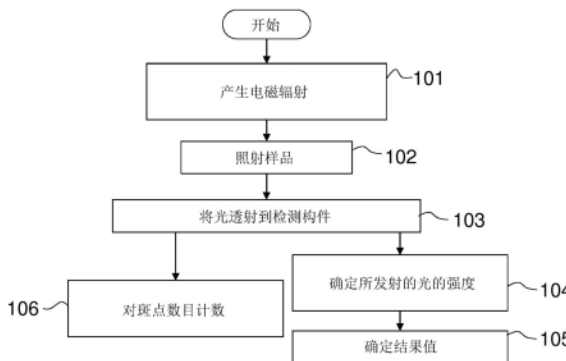
权利要求书2页 说明书8页 附图6页

(54) 发明名称

样品分析方法、分析装置及计算机程序

(57) 摘要

分析微板(1)的孔(2)中的样品(3)的方法包括以下步骤:产生具有第一预定波长或波长范围的电磁辐射(101)、经由所述孔的上端从所述微板(1)上方将所述辐射透射到所述样品(3)来用所述辐射照射样品(3)(102);经由所述孔(2)的所述上端将由所述样品(3)发射且具有第二预定波长或波长范围的光透射到检测构件(13)(103);确定由所述样品(3)的一个或多个预定测量区域(23)发射的光的强度(104);基于所确定的强度,确定表示由所述样品(3)发射的光的总量的结果值并对发射具有所述第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数(106)。



1. 一种分析布置在微板(1)的孔(2)中的一个或多个样品(3)的方法,所述方法包括以下步骤:

-产生具有第一预定波长或波长范围的电磁辐射(101),

-通过经由所述孔(2)的上端从所述微板(1)上方将所述电磁辐射透射到样品(3)来用所述电磁辐射照射所述样品(3)(102),

-经由所述孔(2)的所述上端将由所述样品(3)发射且具有第二预定波长或波长范围的光透射到检测器(13)(103),

-确定由所述样品(3)的至少两个预定测量区域(23)发射的光的强度(104),其中为了确定由所述样品(3)的所述至少两个预定测量区域(23)发射的光的强度,一次照射一个测量区域(23);

-基于所确定的由所述至少两个测量区域(23)发射的光的强度,确定表示由所述样品(3)发射且具有所述第二预定波长或波长范围的光的总量的结果值(105),以及

-对发射具有所述第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数(106)。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述样品(3)包括多个预定测量区域(23),且所述结果值是基于所确定的由所述多个测量区域(23)发射的光的强度来计算的。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述至少两个测量区域(23)涵盖所述孔(2)的整个底部。

4. 根据权利要求1或2所述的方法,其中为了确定由所述样品(3)的所述至少两个预定测量区域(23)发射的光的强度,使用直径最多为所述孔(2)的直径的60%的光束照射所述样品(3)。

5. 根据权利要求1或2所述的方法,其中为了确定由所述样品(3)的所述至少两个预定测量区域(23)发射的光的强度,使用光电倍增管作为所述检测器(13)。

6. 根据权利要求1或2所述的方法,其中为了对斑点计数,照射所述孔(2)的整个底部,并使用相机传感器(13a)来形成所述样品(3)的图像。

7. 一种分析装置(10),其配置成接收包括多个孔(2)的微板(1),所述孔(2)中的每一个配置成接收样品(3),其中所述分析装置(10)包括

-用于使用具有第一预定波长或波长范围的电磁辐射经由所述微板(1)的孔(2)的上端从所述微板(1)上方照射样品(3)的照射构件(11),

-用于确定由所述样品(3)的至少两个测量区域(23)经由所述孔(2)的所述上端发射且具有第二预定波长或波长范围的光的强度的检测构件(13),

-配置成对发射具有所述第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数的构件(15, 21),以及

-配置成基于所确定的由所述至少两个测量区域(23)发射的光的强度确定表示由所述样品(3)发射且具有所述第二预定波长或波长范围的光的总量的结果值的构件(15, 21),

其中为了确定由所述样品(3)的所述至少两个测量区域(23)发射的光的强度,所述分析装置(10)配置成一次一个测量区域(23)地连续照射所述测量区域(23)。

8. 根据权利要求7所述的分析装置(10),其中所述照射构件(11)包括灯泡、LED或激光器。

9. 根据权利要求7或8所述的分析装置(10),其中所述分析装置(10)包括用于选择照射

所述样品(3)的波长的构件(17)。

10.根据权利要求9所述的分析装置(10),其中所述用于选择照射所述样品(3)的波长的构件(17)包括滤波器或单色器。

11.根据权利要求7、8、10中任一项所述的分析装置(10),其中所述检测构件(13)包括光电倍增管或硅光电二极管。

12.根据权利要求7、8、10中任一项所述的分析装置(10),其中所述检测构件(13)包括相机传感器(13a)。

13.根据权利要求7、8、10中任一项所述的分析装置(10),其中所述分析装置(10)配置成形成所述样品(3)的图像以对发射具有所述第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数。

14.根据权利要求13所述的分析装置(10),其中为了形成所述样品(3)的图像以对发射具有所述第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数,所述分析装置(10)配置成照射所述孔(2)的整个底部。

## 样品分析方法、分析装置及计算机程序

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种分析布置在微板的孔中的一个或多个样品的方法,如权利要求1中所定义。本发明还涉及根据其它独立权利要求的分析装置及用于操作分析装置的计算机程序。

### 背景技术

[0002] 基于荧光的测定常用于生命科学。荧光是冷光的一种形式。荧光是指由已经吸收光或其它电磁辐射的物质进行的光(光子)发射。能量吸收会将分子的轨道电子激发到更高电子态,而弛豫到基态会发射光子。

[0003] 荧光测定利用荧光团的性质。荧光团在一个波长下吸收光能,并且作为响应,在另一更长的波长下重新发射光能。每个荧光团都具有吸收光的一个独特波长范围和发射光的另一不同波长范围。这个性质使得它们能够用于通过分析仪器和技术对生物产品进行特定检测。

[0004] 在荧光测定中,样品通常布置在微板的孔中。微板是一种包括多个孔的平板,所述孔是以行和列布置的腔。这些孔配置成接收样品并用作小型试管。典型的微板包括6个、24个、96个、384个或1536个孔,但是还存在更大的微板。

[0005] 在特定类型的荧光测定中,会形成荧光斑点,并且样品分析是主要基于对荧光斑点数目的计数。与斑点计数有关的问题在于,计数过程极其依赖于人类用户在分析装置的帮助下进行的斑点检查。这使得分析既耗时又很主观。另一问题是,如果样品中的荧光斑点数目很多,那么计数会变得不可靠。举例来说,96孔微板中孔的直径大致为6mm。如果一个孔中的斑点数目是例如500个或更多,那么斑点彼此极其靠近,使得难以进行可靠的斑点计数。

### 发明内容

[0006] 本发明的一个目标是提供一种改进的分析布置在微板的孔中的一个或多个样品的方法。在权利要求1中给出了根据本发明的方法的表征特征。本发明的另一目标是提供一种改进的分析装置。本发明的又一目标是提供一种改进的用于操作分析装置的计算机程序。在其它独立权利要求中给出了分析装置和计算机程序的表征特征。

[0007] 根据本发明的方法包括以下步骤:产生具有第一预定波长或波长范围的电磁辐射;通过经由孔的上端从微板上方将电磁辐射透射到样品来用所述电磁辐射照射样品;经由孔的上端将由样品发射且具有第二预定波长或波长范围的光透射到检测器;确定由样品的一个或多个预定测量区域发射的光的强度;以及基于所确定的由所述一个或多个测量区域发射的光的强度,确定表示由样品发射且具有第二预定波长或波长范围的光的总量的结果值。

[0008] 根据本发明的分析装置包括:用于使用具有第一预定波长或波长范围的电磁辐射经由微板的孔的上端从微板上方照射样品的照射构件;用于确定由样品的一个或多个测量

区域经由孔的上端发射且具有第二预定波长或波长范围的光的强度的检测构件;以及配置成基于所确定的由所述一个或多个测量区域发射的光的强度确定表示由样品发射且具有第二预定波长或波长范围的光的总量的结果值的构件。

[0009] 根据本发明的计算机程序包括在程序由计算机执行时使分析装置实施上文定义的方法步骤的指令。

[0010] 利用根据本发明的方法、装置和计算机程序,样品的分析将更少地依赖于用户的判断。结果值表示由样品发射的光的总量的积分或估计。

[0011] 根据本发明的实施例,样品包括多个预定测量区域,且结果值是基于所确定的由所述多个测量区域发射的光的强度来计算的。

[0012] 根据本发明的实施例,测量区域涵盖孔的整个底部。

[0013] 根据本发明的实施例,为了确定由样品的所述一个或多个预定测量区域发射的光的强度,使用直径最多为孔直径的60%的光束照射样品。

[0014] 根据本发明的实施例,为了确定由样品的所述一个或多个预定测量区域发射的光的强度,一次照射一个测量区域。

[0015] 根据本发明的实施例,为了确定由样品的所述一个或多个预定测量区域发射的光的强度,使用光电倍增管作为检测器。

[0016] 根据本发明的实施例,方法包括对发射具有第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数的步骤。此方法提供了高灵敏度,并使得样品能够进行快速筛检。另外,与仅对荧光斑点计数相比,此方法提供了更宽的动态信号范围,因为此方法即使在荧光斑点数目过多使得斑点的计数不可靠的情况下也能进行测量。

[0017] 根据本发明的实施例,为了对斑点计数,照射孔的整个底部,并使用相机传感器来形成样品的图像。

[0018] 根据本发明的实施例,照射构件包括灯泡、LED或激光器。

[0019] 根据本发明的实施例,分析装置包括用于选择照射样品的波长的构件。

[0020] 根据本发明的实施例,用于选择照射样品的波长的构件包括滤波器或单色器。

[0021] 根据本发明的实施例,检测构件包括光电倍增管或硅光电二极管。

[0022] 根据本发明的实施例,检测构件包括相机传感器。

[0023] 根据本发明的实施例,为了确定由样品的多个测量区域发射的光的强度,装置配置成一次一个测量区域地连续照射所述测量区域。

[0024] 根据本发明的实施例,装置配置成形成样品的图像,以便对发射具有第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数。

[0025] 根据本发明的实施例,为了形成样品的图像以对发射具有第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数,装置配置成照射孔的整个底部。

[0026] 根据本发明的实施例,装置包括配置成对发射具有第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数的构件。

## 附图说明

[0027] 下文参考附图更详细地描述本发明的实施例,在附图中

[0028] 图1示出根据本发明的实施例的方法的步骤的流程图,

- [0029] 图2示出适用于实行根据本发明的方法的分析装置的主要元件，
- [0030] 图3示出分析装置的控制系统的实例，
- [0031] 图4示出适合在分析装置中使用的微板的实例，
- [0032] 图5示出微板的孔中的测量点的实例，
- [0033] 图6示出分析装置的荧光测量系统的实例的示意图，
- [0034] 图7示出分析装置的成像系统的实例的示意图，
- [0035] 图8示出通过根据本发明的方法获得的荧光测定的测量结果的实例，
- [0036] 图9示出基于与图8相同的测定的斑点计数结果，以及
- [0037] 图10示意性地示出ELISpot/FluoroSpot测定的 workflows。

### 具体实施方式

[0038] 本发明涉及分析布置在微板的孔中的一个或多个样品的方法、分析装置及用于操作分析装置的计算机程序。

[0039] 在根据本发明的方法中，测量由样品发射的光的强度。因此，此方法可用于在生命科学中常用的基于荧光的测定。

[0040] 荧光是冷光的一种形式。荧光是指由已经吸收光或其它电磁辐射的物质进行的光(光子)发射。能量吸收会将分子的轨道电子激发到更高电子态，而弛豫到基态会发射光子。

[0041] FluoroSpot等荧光测定利用荧光团的性质。荧光团在一个波长下吸收光能，并且作为响应，在另一通常更长的波长下重新发射光能。每个荧光团都具有吸收光的一个独特波长范围和发射光的另一不同波长范围。这个性质使得它们能够用于通过分析仪器和技术对生物产品进行特定检测。

[0042] FluoroSpot测定是常用的ELISpot测定的一种变化形式。图10示出FluoroSpot/ELISpot测定的示意图。FluoroSpot测定可用于研究免疫反应。微板的孔2的底部设有膜，并且涂有适当的抗体30(捕捉抗体)。在孔2中培养和刺激细胞31以产生分析物32，举例来说，所述分析物可以是细胞因子、趋化因子或免疫球蛋白。细胞31所分泌的这种分析物32由结合到板上的抗体30捕捉。接着，从孔2取出细胞31。向孔2添加荧光标记的检测荧光团抗体，用来检测分泌的分析物32。例如，可使用生物素化检测抗体33和链霉亲和素酶结合物34。因此，荧光斑点固定地形成在孔底部上的膜上，并且这些斑点可以使用分析装置检测。右侧的孔示出FluoroSpot测定，左侧的孔示出ELISpot测定。假设一个斑点对应于一个已分泌分析物的小区。通过对荧光斑点的数目计数，可以确定抗原特异性T细胞的频率，它在免疫应用中是非常相关的参数。

[0043] 在荧光测定中，样品通常布置在微板的孔中。图4示出微板1的实例。微板1(也称为例如微量滴定板、微孔板、多孔板或多孔)是一种包括多个孔2的平板，所述孔是以行和列布置的腔。微板1的孔2配置成接收样品，并用作小型试管。典型的微板包括6个、24个、96个、384个或1536个孔，但是还存在更大的微板。孔2以矩形矩阵排列，其中侧边之间的比通常为2:3。图4示出具有96个孔2的微板1。但是，在根据本发明的方法和装置中还可使用其它微板尺寸。

[0044] 图1示出根据本发明的实施例的方法的步骤。在方法的第一步骤101中，产生具有第一预定波长或波长范围的电磁辐射。在方法的第二步骤102中，通过从微板1上方将电磁

辐射透射到样品3来用电磁辐射照射样品3。在方法的第三步骤103中,经由孔2的上端将由样品3发射且具有第二预定波长或波长范围的光透射到检测器或检测构件。第二波长或波长范围不同于第一预定波长或波长范围。在方法的第四步骤104中,确定由样品3的一个或多个预定测量区域23发射的光的强度。测量区域23的实例在图5中示出。在图5的实例中,孔2中存在多个测量区域23。但是,可存在单个测量区域,而不是多个测量区域23。所述单个测量区域可涵盖孔2的整个底部。在方法的第五步骤105中,基于所确定的由测量区域23发射的光的强度,确定表示由样品3发射且具有第二预定波长或波长范围的光的总量的结果值。如此为所分析样品确定了单个结果值。所述值与样品中存在的荧光斑点数目相关。第五步骤105由计算机实施。根据本发明的方法可由分析装置实行。

[0045] 方法可进一步包括第六步骤106。在方法的第六步骤106中,对发射具有第二预定波长或波长范围的光的斑点的数目计数。第六步骤106由计算机实施。结果值的确定和斑点的计数不需要以上述次序进行,斑点还可例如在结果值确定之前或在方法的第五步骤105的同时进行计数。可以使用相同检测构件或不同检测构件来进行斑点计数和所发射的光的强度的确定。可以针对斑点计数和所发射的光的强度的确定分别照射样品。举例来说,对于斑点计数,可以一次照射孔的整个底部,而对于所发射的光的强度的确定,样品可以划分成多个测量区域,一次照射一个测量区域。

[0046] 根据本发明的方法的益处在于分析更少地依赖于用户的判断。另外,与仅对荧光斑点计数相比,它提供了更宽的动态信号范围,因为此方法即使在荧光斑点数目过多使得计数不可靠的情况下也能进行测量。

[0047] 根据本发明的方法可借助分析装置10来实施。因为微板1通常用于固持样品,所以此类分析装置在此称为微板读数仪。

[0048] 适用于实施根据本发明的方法的微板读数仪10的主要部件在图2中示意性地示出。微板读数仪10可检测微板1(图2中未示出)中的样品3的生物、化学或物理事件。微板读数仪的操作可基于不同现象,例如吸光或发光。因为根据本发明的方法用于基于荧光的测定,所以用于实施此方法的微板读数仪10配置成至少测量荧光。但是,微板读数仪10还可以是可用于不同测定的多模读数仪。

[0049] 微板读数仪10配置成测量由布置在微板1的孔2中的样品3发射的电磁辐射。微板读数仪10包括照射装置或照射构件11,它能够产生具有特定波长或波长范围的电磁辐射。优选地,波长可由微板读数仪10的用户选择。电磁辐射可以是可见光(波长范围大致为380-750nm)、紫外光(10-380nm)或红外光(750nm-1mm)。照射构件11配置成照射微板1的孔2中的样品3。一次可以照射一个样品3或样品的一部分,或者微板读数仪10可配置成一次照射若干样品。

[0050] 照射构件11包括光源16,它可以是灯泡,例如氙灯或卤素灯。或者,光源16可以是LED或激光器。照射构件11可包括若干光源,这些光源可以一起使用,或者可以出于不同测量目的而使用不同光源。在照射构件11包括激光器的情况下,可以直接产生具有特定波长的光。在光源16产生具有更宽光谱的光的情况下,微板读数仪10可包括用于选择用来照射样品3的光的波长的构件17,此波长就是激发波长。用于选择激发波长的构件17(激发波长选择器)可包括一个或多个滤波器和/或单色器。

[0051] 微板读数仪10进一步包括检测器或检测构件13。检测构件13配置成测量由样品3

发射的电磁辐射。举例来说,检测构件13可包括光电倍增管、相机传感器或硅光电二极管。微板读数仪10可包括两个或更多个不同检测构件13,用于不同测量。检测构件13配置成测量由样品的一个或多个测量区域23发射的光的强度,如图5的实例中所示。检测构件13还可用于形成样品的图像以便对荧光斑点计数。

[0052] 微板读数仪10进一步包括照射和测量光学器件18。照射光学器件配置成将来自光源16的电磁辐射聚焦到样品3。测量光学器件配置成将由样品3发射的光聚焦到检测构件13。照射光学器件和测量光学器件可至少部分地相同。

[0053] 微板读数仪10可进一步包括用于选择要测量的发射波长的构件19。构件19(测量波长选择器)可以是例如布置在检测构件13之前的滤波器。波长选择构件19用于仅使要测量的波长通过。因此,激发光可被挡住无法接近检测构件13。

[0054] 微板读数仪10可进一步包括用于将样品3移动到测量位置的定位系统或定位构件29。定位构件29可配置成移动微板。或者,定位构件29可配置成移动检测构件13和/或控制照射光学器件和测量光学器件以便测量所选样品的荧光。

[0055] 图3示出微板读数仪10的控制系统的实例。微板读数仪10通过输入构件14控制。举例来说,输入构件14可包括操作按钮、键盘和/或触摸显示器。通过输入构件14,微板读数仪10的用户可以控制微板读数仪10的操作,调整参数,和/或改变微板读数仪10的设置。分析结果可以在显示器12上显示。显示器12可以是微板读数仪10的组成部分,也可以是连接到微板读数仪10的外部显示器。输入构件14、照射构件11、检测构件13和显示器12与中央处理单元(CPU)15通信。定位构件29也受CPU 15控制。输入构件14和显示器12不需要直接连接到CPU 15。微板读数仪10还可经由安装在PC等外部通用计算机21上的软件来控制。因此,输入构件14可包括例如连接到外部计算机21的键盘。显示器12也可连接到外部计算机21所有这些连接都可以通过电线或通过任何无线方式来实现,并且外部计算机21可以是远程服务器或云服务器。

[0056] 当微板读数仪10用于荧光测定时,用户首先设置用于照射样品的所要波长。用户可经由输入构件14选择所要激发波长。微板读数仪10还可选择某一激发带宽,在此情况下,用户可选择用于照射样品的某一波长范围。实际上,即使选定特定激发波长,微板读数仪10也能够产生具有某一带宽的电磁辐射。通常,窄带宽是优选的。可接受带宽取决于应用。在一些情况下,20nm的带宽足够。在一些应用中,带宽应该不超过10nm。在一些应用中,带宽应该不超过2.5nm。

[0057] 来自检测构件13的测量数据由CPU 15收集。数据用于计算表示样品3在某一波长下发射的光的总量或光的总量的估计的结果值。CPU 15或外部计算机21可用于计算结果值。CPU15或外部计算机21可进一步配置成对荧光斑点的数目计数。

[0058] 根据本发明的微板读数仪10可配置成既测量由样品发射的电磁辐射又形成样品的图像。因此,微板读数仪10可包括荧光测量构件和成像构件。用于测量荧光和用于使样品成像的构件可至少部分地相同,但是在下文中参考图6和7分开描述这些构件。

[0059] 图6示出微板读数仪10的荧光测量系统的实例的简化图示,所述荧光测量系统配置成测量样品3在被照射构件11激发时发射的电磁辐射。在图6的实例中,照射构件11包括光源16。光源16可以是宽带宽灯,例如氙灯。举例来说,光源16还可以是石英卤素灯。光源16产生电磁辐射,例如具有宽谱的可见光(波长范围大致为380-750nm)、紫外光(10-380nm)或



红外光(750nm-1mm)。为了选择特定波长,照射构件11还包括单色器17。单色器17产生具有窄带宽的光束。根据一个实例,在单色器17之后的光的带宽小于2.5nm。然而,在一些应用中,更宽的带宽也是足够的。还可以使用干涉滤波器而不是单色器作为用于波长选择的构件。光源还可以是窄带光源,例如LED或激光器。在这种情况下,可能并不需要单色器、干涉滤波器或用于波长选择的其它外部构件。

[0060] 来自光源16的光束经由微板读数仪10的光学器件透射到单色器17。在图6的实例中,光源16和单色器17之间的光学器件包括镜23和入射狭缝24。然而,微板读数仪10的光学器件可以用许多不同方式构造。

[0061] 在图6的实例中,光经由出射狭缝25和光纤22从单色器17透射到微板。光借助照射光学器件18聚焦到放置在微板的孔2中的样品。从上方照射样品。借助硅光电二极管或光电倍增管等检测器13测量由样品发射的光的强度。图6的微板读数仪10配置成用于顶部读数。

[0062] 可在微板1和检测器13之间布置波长滤波器来隔离所发射的光子与激发光子。微板读数仪10可进一步包括发射滤波器,例如低通或带通发射滤波器,它在检测器13之前用于将背景荧光滤出或隔离来源于一个样品中的多个荧光团的荧光信号。

[0063] 荧光测量系统优选地配置成测量在样品的多个测量区域23处发射的光的强度。但是,也可以使用单个测量区域。测量区域23或所述单个测量区域优选地涵盖微板1的孔2的整个底部。微板读数仪10可配置成一次照射样品3的一个测量区域23。照射测量区域23,并通过检测构件13测量由区域23发射的光的强度。例如,用于照射样品的光束的直径也可以是孔的直径的20%-60%。通过使用窄光束,可以增大照射强度,并且可以增大测量灵敏度。基于测得强度,计算样品的结果值。在单个测量区域的情况下,结果值是基于所述单个测量区域的测得强度。

[0064] 在图5的实施例,两个邻近测量区域23的中心点之间的距离配置成对应于照射光束的半径。举例来说,如果光束的直径是3mm,那么光束在两个邻近测量区域23之间移动1.5mm。

[0065] 微板读数仪10进一步包括用于对荧光斑点数目计数的成像系统。图7示出微板读数仪10的成像系统的实例。图7的成像系统适用于FluoroSpot和ELISpot测定,但是它还可用于其它测定。微板读数仪10包括照射构件11。照射构件11的功能是产生光,用来照射微板1的孔2中的样品。在图7的微板读数仪中,一次照射微板1的一个孔2和一个样品。照射构件11包括光源16。光从照射构件11引导到分束器7。分束器7是光学装置,它配置成反射部分光,且光的其余部分透射穿过所述分束器。实际上,被分束器7接收的光的部分被吸收。分束器7布置成将反射光引向微板读数仪10的读数平面26。举例来说,分束器7可由两个胶合在一起的三角形玻璃棱镜组成。或者,分束器7可以是带涂层的玻璃板。分束器7可具有不同性质。光学读数仪的最佳分束比是50%-50%,即分束器7所反射的光量等于分束器7所透射的光量。因此,未被分束器7吸收的光的一半被反射,且光的一半被透射。但是,反射光的部分可例如在40%-60%的范围内。

[0066] 在分束器7和读数平面26之间布置有包括至少一个透镜8a的透镜系统8。在图1中,仅示出单个透镜8a,但是实际上透镜系统8可包括若干透镜。透镜系统8布置成将从照射布置11和分束器7接收到的光聚焦到布置在微板1的孔2的底部上的样品。透镜系统8进一步包括位于透镜8a和读数平面26之间的孔口8b。

[0067] 微板1的孔2的底部和孔2中的样品将部分光反射回透镜系统8。在荧光测量中,样品还从微板1朝向透镜系统8发射光。透镜系统8配置成将样品的图像聚焦到充当检测构件的成像装置13。因此,聚焦用于照射样品的光和聚焦从微板1接收到的光使用的是相同的透镜系统8。因此,照射光学器件和测量光学器件由相同组件形成。光从透镜系统8引导到分束器7。部分光从分束器7朝向照射布置11反射,并且部分光可通过分束器7并到达成像装置13。如果分束器7的分束比是50%-50%且分束器7的吸收忽略,那么一半光被反射,一半光透射穿过分束器7。成像装置13可包括数码相机传感器13a。成像装置13配置成拍摄每个样品的一个或多个图像。

[0068] 透镜系统8的透镜8a和读数平面26之间的孔口8b的尺寸设定成具有最多与微板3的孔2的直径相同的直径。这消除了样品和成像装置13中的晕影。孔口8b可以是可调整的,使得微板读数仪能够用于分析不同微板1中的样品。通过此孔口,可以调整孔2的底部处的照射区域的大小。举例来说,在典型的96孔板中,照射区域的直径可为大致6.6mm,而在384孔板中可为2.5mm。

[0069] 举例来说,光源16可以是LED或一组LED。微板1的孔2的底部上的照射区域应涵盖整个底部。典型LED芯片的直径比微板1的孔2的直径小得多。照射区域的大小可受透镜系统8影响。但是,可为有利的是通过在LED或另一光源周围布置积分球来增大照射区域的大小,积分球也被称为乌布利希(Ulbricht)球。

[0070] 微板读数仪进一步包括配置成移动微板1的定位构件(在图7中未示出)。微板1在读数平面26中移动,使得一次有一个孔2在透镜系统8下方。拍摄样品的一个图像或若干图像,接着移动微板1,使得下一个孔2在透镜系统8下方。

[0071] 图7的微板读数仪进一步包括布置成测量由照射构件11产生且透射穿过分束器7的光的强度的参考检测器28。如果使用LED作为光源16,那么LED的强度可因为发热而改变,从而影响成像装置13拍摄的图像。通过测量光的强度,在解释微板读数仪的测量结果时可以将这一影响考虑在内。

[0072] 微板读数仪进一步设有布置在照射构件11和分束器7之间的第一滤波器17。第一滤波器17用于荧光测定。第一滤波器17配置成仅通过光源16的光谱中激发样品所需的那部分。因此,第一滤波器17用作用于选择激发波长的构件。第二滤波器19布置在分束器7和成像装置13之间。与第一滤波器12一样,在荧光测定中还使用第二滤波器19。第二滤波器19配置成通过由样品所发射的波长组成的光。

[0073] 在图7的实施例中,成像装置13布置在透镜系统8正上方。照射构件11与分束器7布置在同一水平平面中。因此,来自照射构件的光反射到微板1,且来自微板1的光透射穿过分束器7。此布置使得参考检测器28能够在不干扰样品照射的情况下使用。但是,也可以切换成像装置13和照射构件11的位置。因此,用于照射样品的光可通过分束器7,且样品的图像可通过分束器7反射到成像装置13。

[0074] 由成像系统形成的图像可用于对样品的荧光斑点计数。因此,微板读数仪10的中央处理单元15或外部计算机21可配置成确定样品中的荧光斑点数目。

[0075] 因此,根据本发明的微板读数仪10可包括荧光测量系统,例如图6的系统,以及成像系统,例如图7的系统。因此,微板读数仪10可配置成测量由样品发射的光的强度并形成样品的图像。这使得对样品的分析更加全面。荧光测量系统和成像系统的部分组件可以是

相同的。举例来说,可在这两个系统中使用同一光源16。同样,测量光学器件和照射光学器件可至少部分地相同,用于测量所发射的光的强度并使样品成像。成像系统也可用于测量荧光。所发射的光的强度可借助相机传感器13a来确定,因此不需要单独的用于测量所发射的光的强度的系统。

[0076] 图8和9示出通过根据本发明的实施例的方法获得的结果的实例。此方法应用到放置在96孔微板的孔中的样品,其中孔底部的直径是6mm。用于照射样品的光束的直径是3mm。测量区域的位置如图5所示。因此,测量区域形成包括五行和五列的矩阵。光束每次移动1.5mm。图8示出确定所发射的光的强度的步骤的结果,图9示出通过斑点计数步骤获得的结果。在两个图的X轴上示出抗原呈递细胞的量,在此情况下为人外周血单核细胞(PBMC)的量(PBMC的量/孔)。图8在Y轴上示出荧光结果值,其已基于在多个测量点处在520nm的波长下发射的光的测得强度计算出。激发光的波长为480nm。图9在Y轴上示出在样品中计数的斑点数目。在这两种情况下,都会测量产生IFN- $\gamma$ 的细胞的数目。图8和9中上方的圆点表示受刺激样品,下方的圆点表示空白(未受刺激的样品)。

[0077] 多点荧光读数在整个细胞浓度范围内线性增加(在低细胞因子产生水平和极高细胞因子产生水平下),而斑点数目几乎线性增加至与每个孔可检测斑点的最大数目一致的平稳段。这是由于基于图像的方法在孔上的斑点过于拥挤时从背景中分离斑点的内在局限性。另一方面,斑点计数法的检测限优于基于荧光强度测量的检测限。因此,通过组合这两种读数,可以在扩大测定的动态范围的同时保持斑点计数法的低检测限。举例来说,可以想象的是,可以使用测得的荧光信号而不是斑点计数来预测抗原阳性细胞在高频值下的频率,斑点计数在这些情况下是不可靠的。

[0078] 举例来说,根据本发明的方法可用于微板的快速筛检。此方法能够识别出需要进一步分析的样品。特别是在荧光斑点的数目对于单个斑点的计数来说过高的情况下,此方法很有利。斑点计数和荧光信号计算的组合为FluoroSpot数据分析提供了一种全面的解决方案,并且能够在斑点计数失败的情况下进行故障处理。

[0079] 本领域技术人员应了解,本发明不限于上述实施例,而是可以在所附权利要求书的范围内变化。

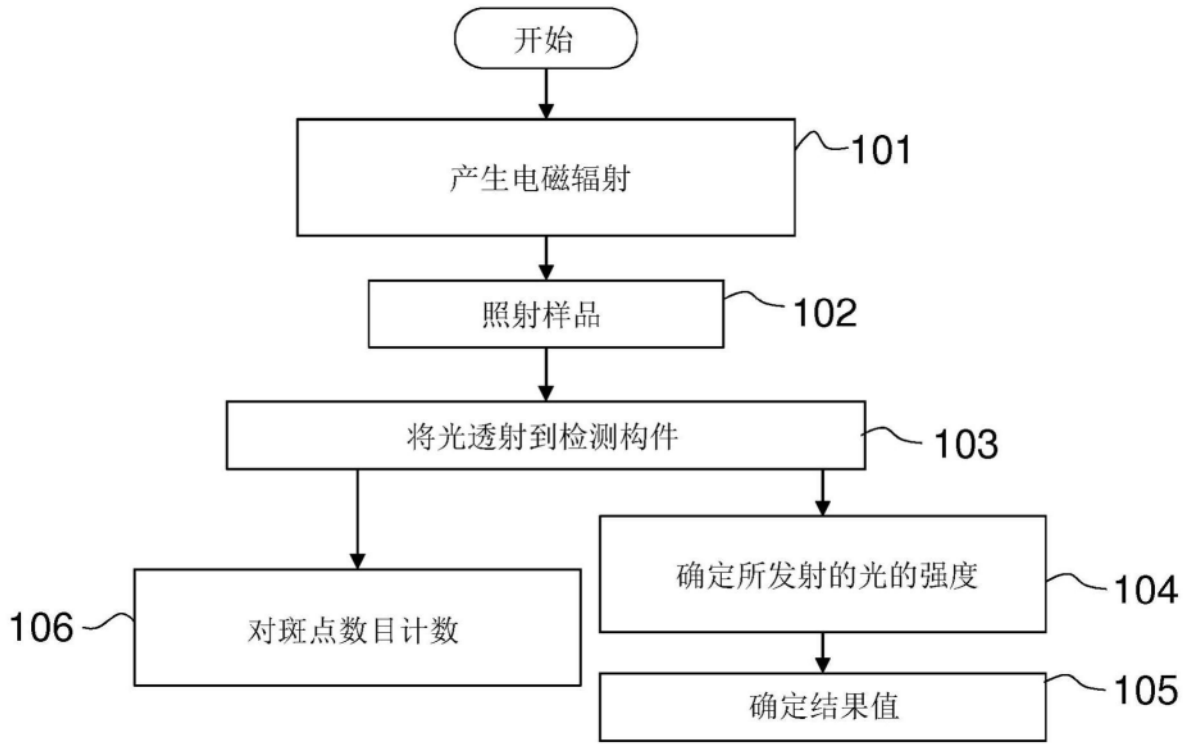


图1

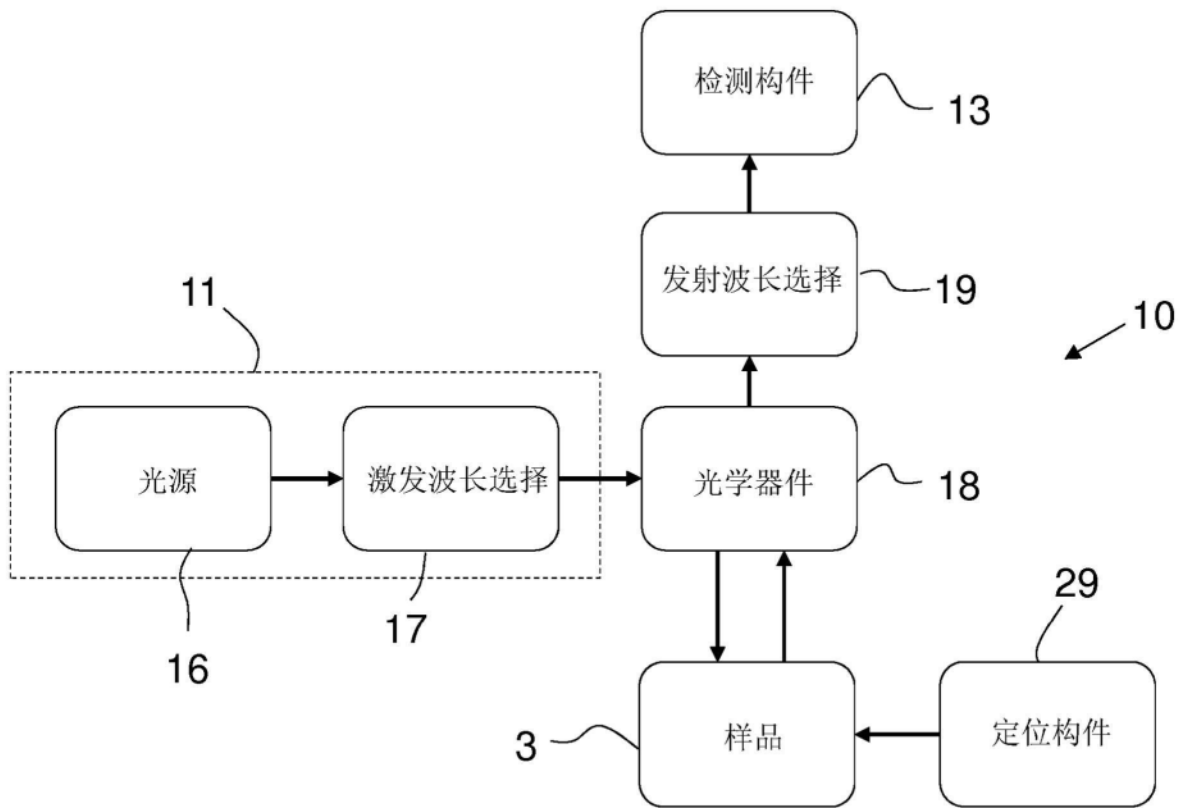


图2

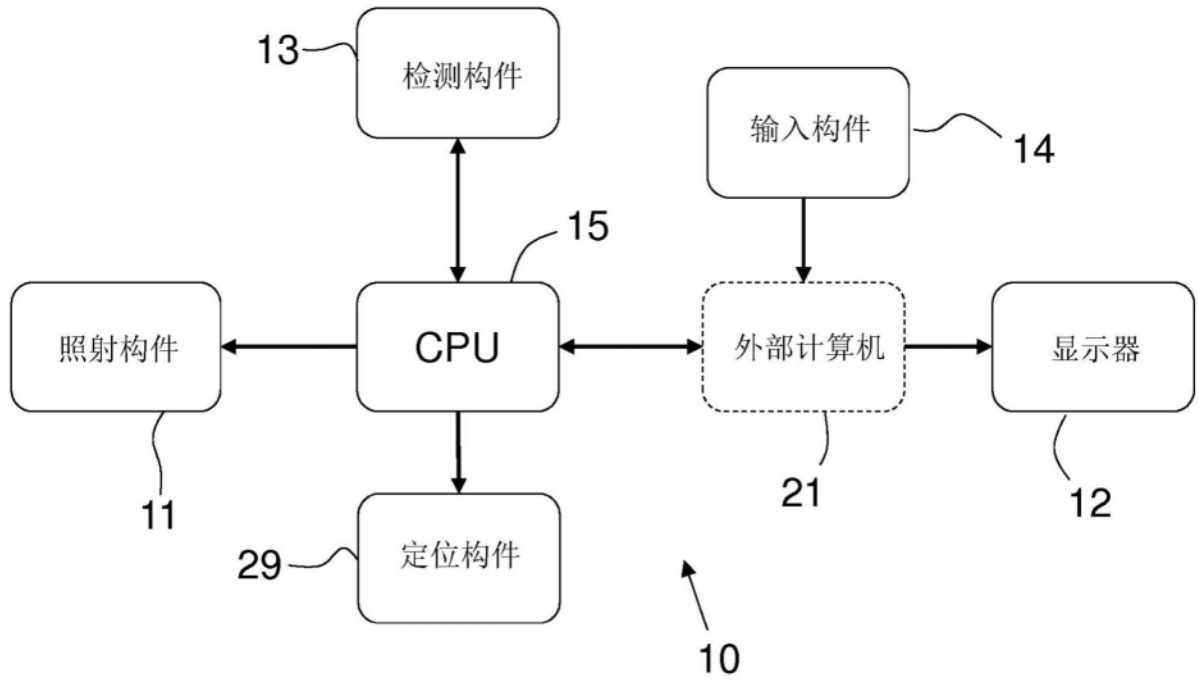


图3

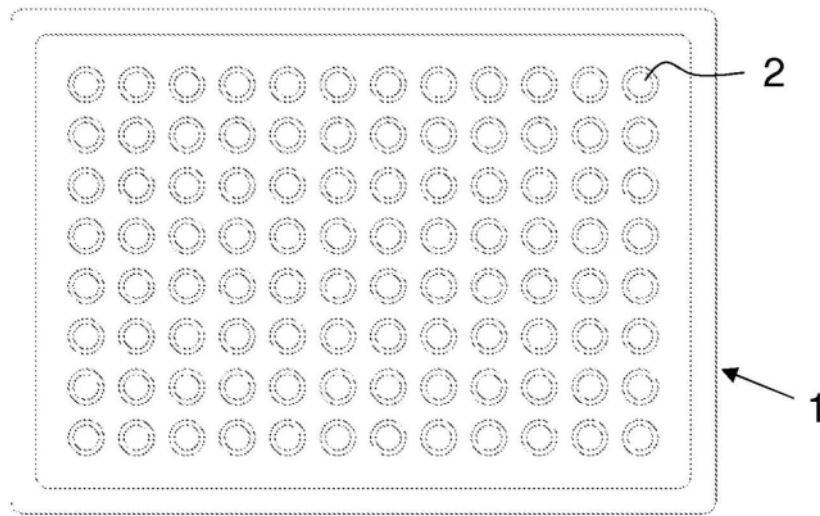


图4

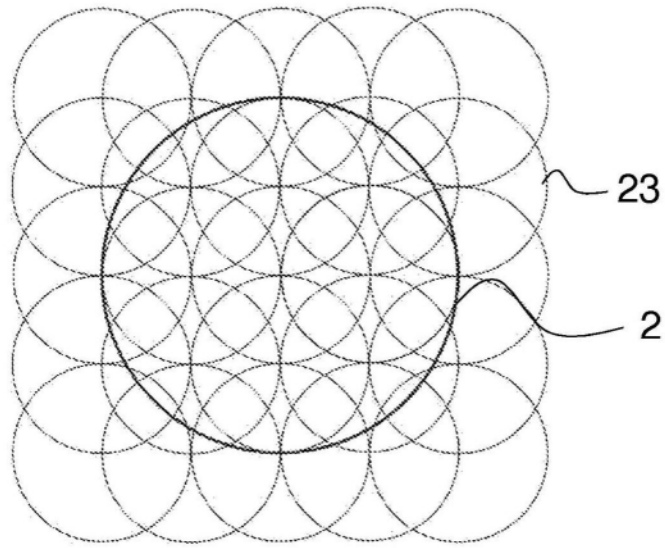


图5

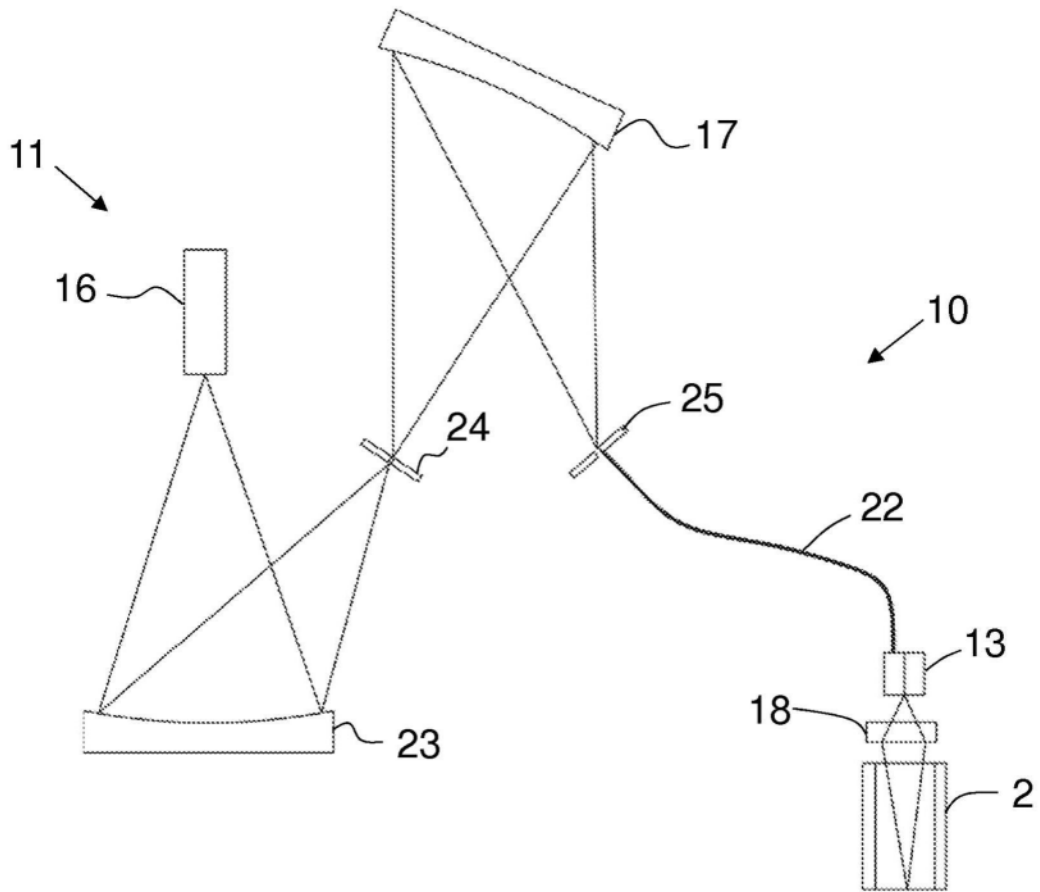


图6

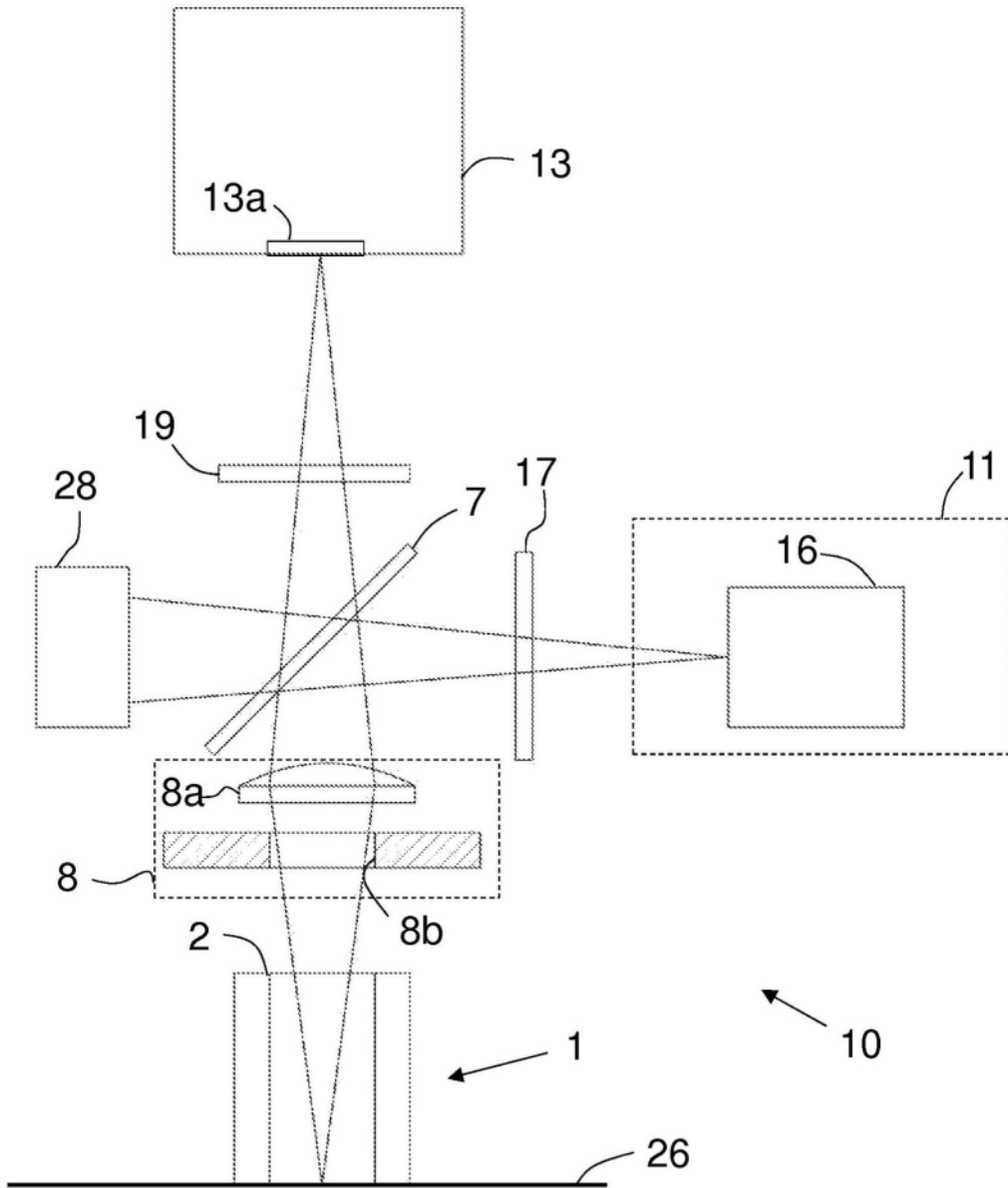


图7

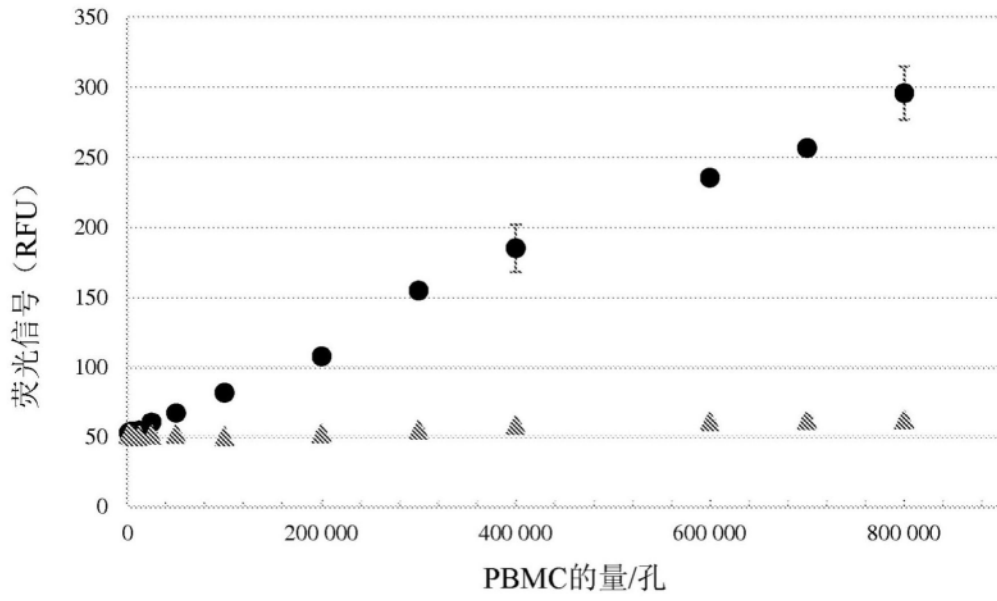


图8

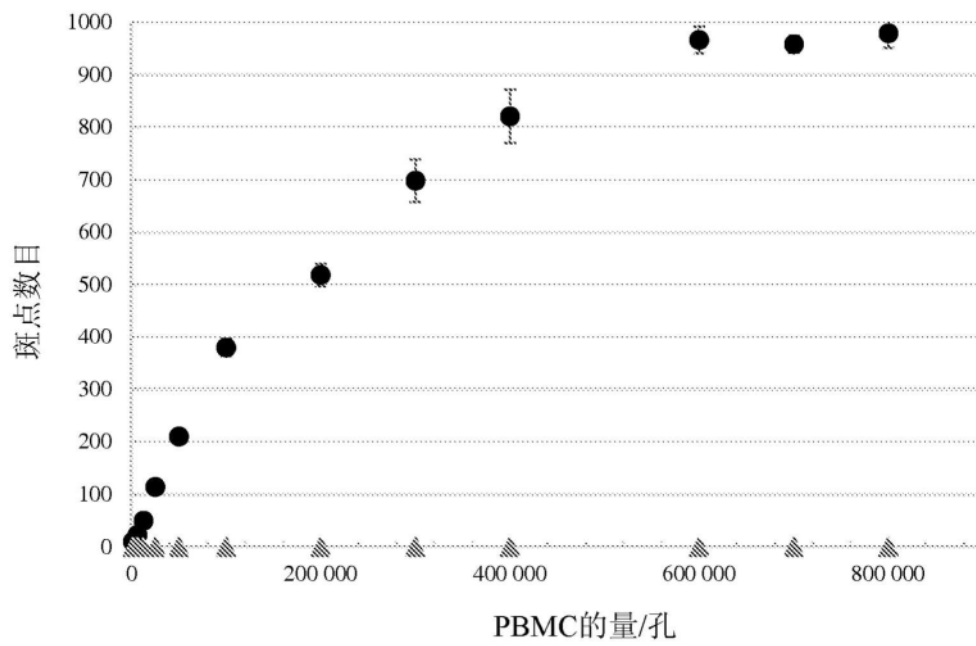


图9



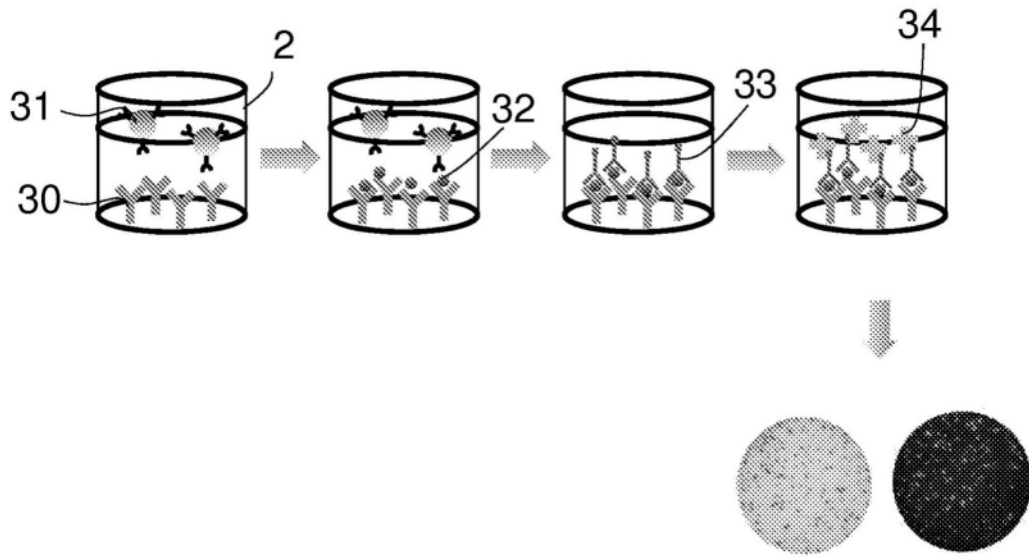


图10