



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107202903 A

(43)申请公布日 2017.09.26

(21)申请号 201610351924.5

(22)申请日 2016.05.24

(66)本国优先权数据

201610156013.7 2016.03.18 CN

(71)申请人 深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区高新技术产业园区科技南十二路迈瑞大厦

(72)发明人 杜贤算 代勇

(74)专利代理机构 北京清亦华知识产权代理事务所(普通合伙) 11201

代理人 李志东

(51)Int.Cl.

G01N 35/08(2006.01)

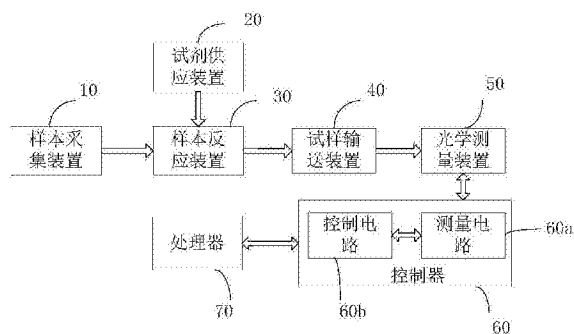
权利要求书2页 说明书18页 附图8页

(54)发明名称

样本分析仪及其样本分析方法

(57)摘要

本发明公开一种样本分析仪,其包括光学测量装置。所述光学测量装置包括流动室、光源及光探测器。所述流动室包括照射区,并用于供样本流过所述照射区以形成柱状样本流。所述光源用于照射所述照射区以使所述柱状样本流中经过荧光染料染色的细胞粒子激发荧光。所述光探测器用于探测所述荧光并转化为电信号,所述光探测器采用硅光电倍增管。本发明的样本分析仪具有灵敏度高、信噪比高、体积小及成本低等优点。本发明还公开了一种样本分析仪的样本分析方法。



1. 一种样本分析仪,其特征在于,包括:
 - 样本采集装置,定量采集样本,所述样本中含有细胞粒子;
 - 试剂供应装置,提供试剂,所述试剂能够与所述细胞粒子反应;
 - 样本反应装置,接受样本采集装置提供的样本,接受试剂供应装置提供的试剂,所述试剂与所述细胞粒子反应,得到试样;
 - 试样输送装置,输送所述试样用于光学测量;
 - 光学测量装置,测量所述试样产生的光信号,得到光信息;
 - 所述光学测量装置包括:
 - 流动室,所述流动室包括照射区,所述试样输送装置输送所述试样流过所述照射区以形成柱状样本流;
 - 光源,照射所述照射区,使所述柱状样本流中的试样产生光信号;及
 - 光探测器,所述光探测器用于探测所述光信号并转化为电信号,所述光探测器至少包括一个硅光电倍增管。
2. 如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述光源包括激光器,所述激光器的输出功率包括1-20mW;
 - 任选地,所述激光器的输出功率为5-15mW。
3. 如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述硅光电倍增管包括阵列排布的多个感光单元,所述感光单元的受光面积小于单个细胞粒子的成像面积;
 - 任选地,所述感光单元的尺寸为10um到50um之间;
 - 任选地,所述感光单元的尺寸为35um。
4. 如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述硅光电倍增管包括阵列排布的多个感光单元,所述感光单元的数量大于或等于500个;
 - 任选地,所述感光单元的数量大于或等于1000个;
 - 任选地,所述感光单元的数量大于或等于1280个。
5. 如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述硅光电倍增管的感光区的面积小于一感光区临界面积,其中该感光区临界面积为使一暗计数脉冲叠加到单个细胞粒子所产生的所述荧光信号脉冲导致脉冲幅值失真的临界面积。
6. 如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述硅光电倍增管的感光区的面积为1-36mm²;
 - 任选地,所述感光区包括直径约为1.1-6.8mm的圆形;
 - 任选地,所述感光区包括直径约为2-6mm的圆形;
 - 任选地,所述感光区包括边长为1-6mm的正方形;
 - 任选地,所述感光区包括边长为3mm的正方形。
7. 如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述光学测量装置还包括:
 - 设置在所述流动室及所述光探测器之间的光路;
 - 所述光路用于会聚光以在所述硅光电倍增管的感光区上形成光斑,所述光斑的面积为所述感光区的面积的50%-78%。
8. 如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述样本分析仪包括控制器,所述控制器用于控制施加在所述硅光电倍增管的反向偏置电压以使过电压为0-5伏特,所述过电

压为所述反向偏置电压与所述硅光电倍增管的击穿电压之间的差值；

任选地,所述过电压为3伏特以下；

任选地,所述过电压为1.5伏特。

9.如权利要求8所述的样本分析仪,所述样本分析仪控制器根据不同模式调整施加在所述硅光电倍增管的反向偏置电压,得到不同的过电压。

10.如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述样本分析仪包括温度控制装置,所述温度控制装置控制所述硅光电倍增管的温度为设定温度值；

任选地,所述设定温度值为20℃至40℃之间的任一温度值；

任选地,所述设定温度值为25℃至35℃之间的任一温度值。

11.如权利要求1所述的样本分析仪,其特征在于,所述样本分析仪包括温度补偿装置,所述温度补偿装置用于根据所述硅光电倍增管的温度调整施加在所述硅光电倍增管上的反向偏置电压以使过电压保持恒定,所述过电压为所述反向偏置电压与所述硅光电倍增管的击穿电压之间的差值；

任选地,所述温度补偿装置包括:温度传感器、温度检测电路、AD转换器、温度补偿模块、DA转换器、电压调节电路及输出可调节稳压电源,所述温度传感器和所述温度检测电路用于探测所述硅光电倍增管的温度并产生温度信号,所述AD转换器用于将所述温度信号转换为数字信号,所述温度补偿模块用于根据所述数字信号计算出所述硅光电倍增管的反向偏置电压目标值;所述控制器用于通过控制所述DA转换器改变所述电压调节电路的电路参数,使得所述输出可调节稳压电源的输出电压达到所述反向偏置电压目标值。

12.一种样本分析仪的样本分析方法,其特征在于包括:

提供试样,所述试样中含有经过试剂处理的细胞粒子；

提供光学测量装置,包括流动室、光源和至少包括一个硅光电倍增管的光探测器；

所述试样形成柱状样本流经过流动室,所述光源照射流经流动室的样本流产生光信号,所述光探测器接受所述光信号并将所述光信号转成电信号;及

根据所述电信号将细胞粒子分类。

13.根据权利要求12所述的样本分析方法,其特征在于:所述细胞粒子至少包括红细胞、白细胞、血小板中的一种或多种;优选的,红细胞包括网织红细胞和/或有核红细胞。

14.根据权利要求12所述的样本分析方法,其特征在于:所述光源的光功率为5-15mW。

15.根据权利要求12所述的样本分析方法,其特征在于:所述硅光电倍增管包括阵列排布的多个感光单元,所述感光单元的受光面积小于单个细胞粒子的成像面积。

16.根据权利要求15所述的样本分析方法,其特征在于:在所述感光单元上施加的反向偏置电压大于击穿电压。

17.根据权利要求16的样本分析方法,其特征在于:

当所述细胞粒子为白细胞时,在所述感光单元上施加第一反向偏置电压;当所述细胞粒子为网织红细胞时,在所述感光单元上施加第二反向偏置电压;所述第一反向偏置电压小于第二反向偏置电压。

样本分析仪及其样本分析方法

技术领域

[0001] 本发明涉及样本分析技术,特别涉及一种样本分析仪及其样本分析方法。

背景技术

[0002] 样本分析仪可以用于分析生物样本中的细胞粒子,例如进行细胞粒子进行分类及计数。样本分析仪可以是血液分析仪或流式细胞分析仪。

[0003] 样本分析仪通常有样本采集装置,从仪器外部定量采集样本送至仪器内部;试剂供应装置,从仪器外部吸取试剂,供应给样本反应装置。样本和试剂在样本反应装置中混合孵育,获得试样。试样被试样输送装置输送到光学测量装置,采集光源照射试样中的细胞粒子形成的散射光或者荧光,并转换为电信号,然后通过分析电信号实现细胞分类和计数。

[0004] 请参阅图1,通过同时探测侧向散射光和荧光,样本分析仪可以用于白细胞分类,例如白细胞分类成淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞,即白细胞五分类。

[0005] 白细胞五分类可以在一次反应测试中完成,也可以在两次反应测试中完成,即第一次反应测试中将白细胞区分为四分类,即淋巴细胞、单核细胞、由中性粒细胞和嗜碱性粒细胞构成的群及嗜酸性粒细胞,第二次反应测试中分类计数嗜碱性粒细胞,两次结果结合实现白细胞五分类。

[0006] 临床上需要检测样本中的幼稚粒细胞和网织红细胞。

[0007] 请参阅图1,幼稚粒细胞是未成熟的粒细胞,越早期的粒细胞其内含有的核酸物质越多,与荧光染料结合强度就越大,因而在激光诱发下发出的荧光的强度就越大。

[0008] 因此,利用荧光信号的特异性,样本分析仪可以检测出幼稚粒细胞。

[0009] 请参阅图2,网织红细胞是红细胞的未成熟阶段,含有少量核糖核酸(RNA),在荧光染料染色后被激光激发出的荧光强度比成熟红细胞(RBC)强。

[0010] 因此,利用荧光信号的特异性,样本分析仪可以检测出网织红细胞。

[0011] 可见,荧光信号的检测非常重要。

[0012] 然而,样本分析仪中激发的荧光的强度非常弱,例如,荧光的强度通常在皮瓦(pW)至纳瓦(nW)数量级,因此,要求光学测量装置的灵敏度非常高,才能保证荧光信号的精确度。

[0013] 现在应用比较广泛的荧光探测器包括真空光电倍增管或雪崩光电二极管。一般而言,它们和检测电路配合使用。具体如图3所示,包括光探测器、电路增益模块、信号调理电路及模数(AD)转换器。光探测器包括光电转换部分及电流增益部分,而电路增益模块包括电流-电压转换放大电路及电压放大器。

[0014] 真空光电倍增管具有灵敏度高、线性好、动态范围大、本底噪声低等优点,可以用于探测荧光。但是真空光电倍增管体积大、价格昂贵,不利于样本分析仪的小型化及降低成本。

[0015] 雪崩光电二极管相对于真空光电倍增管具有体积小及成本低等优点。但是雪崩光

电二极管相对于真空光电倍增管存在电流增益小因而灵敏度较低的不足。例如,真空光电倍增管的电流增益普遍可达 10^5-10^6 ,雪崩光电二极管的电流增益只有 $10-10^2$ 。因此,雪崩光电二极管的灵敏度难以满足荧光检测的要求。

[0016] 因此,业内还需要研发新的样本分析仪,具有更好性价比的光学测量装置,以满足临床需要。

发明内容

[0017] 本发明旨在至少解决现有技术中存在的技术问题之一。为此,本发明提供一种样本分析仪及其样本分析方法。

[0018] 本发明实施方式的样本分析仪包括:

[0019] 样本采集装置,定量采集样本,所述样本中含有细胞粒子;

[0020] 试剂供应装置,提供试剂,所述试剂能够与所述细胞粒子反应;

[0021] 样本反应装置,接受样本采集装置提供的样本,接受试剂供应装置提供的试剂,所述试剂与所述细胞粒子反应,得到试样;

[0022] 试样输送装置,输送所述试样用于光学测量;

[0023] 光学测量装置,测量所述试样产生的光信号,得到光信息;

[0024] 所述光学测量装置包括:

[0025] 流动室,所述流动室包括照射区,所述试样输送装置输送所述试样流过所述照射区以形成柱状样本流;

[0026] 光源,照射所述照射区,使所述柱状样本流中的试样产生光信号;及

[0027] 光探测器,所述光探测器用于探测所述光信号并转化为电信号,所述光探测器至少包括一个硅光电倍增管。

[0028] 在某些实施方式中,所述光源包括激光器,所述激光器的输出功率包括1-20mW;

[0029] 任选地,所述激光器的输出功率为5-15mW。

[0030] 在某些实施方式中,所述硅光电倍增管包括阵列排布的多个感光单元,所述感光单元的受光面积小于单个细胞粒子的成像面积;

[0031] 任选地,所述感光单元的尺寸为10um到50um之间;

[0032] 任选地,所述感光单元的尺寸为35um。

[0033] 在某些实施方式中,所述硅光电倍增管包括阵列排布的多个感光单元,所述感光单元的数量大于或等于500个;

[0034] 任选地,所述感光单元的数量大于或等于1000个;

[0035] 任选地,所述感光单元的数量大于或等于1280个。

[0036] 在某些实施方式中,所述硅光电倍增管的感光区面积小于一感光区临界面积,其中该感光区临界面积为使一暗计数脉冲叠加到单个细胞粒子所产生的所述荧光信号脉冲导致脉冲幅值失真的临界面积。

[0037] 在某些实施方式中,所述硅光电倍增管的感光区的面积为1-36mm²;

[0038] 任选地,所述感光区包括直径约为1.1-6.8mm的圆形;

[0039] 任选地,所述感光区包括直径约为2-6mm的圆形;

[0040] 任选地,所述感光区包括边长为1-6mm的正方形;

- [0041] 任选地,所述感光区包括边长为3mm的正方形。
- [0042] 在某些实施方式中,所述光学测量装置还包括:
- [0043] 设置在所述流动室及所述光探测器之间的光路;
- [0044] 所述光路用于会聚光以在所述硅光电倍增管的感光区上形成光斑,所述光斑的面积为所述感光区的面积的50%-78%。
- [0045] 在某些实施方式中,所述样本分析仪包括控制器,所述控制器用于控制施加在所述硅光电倍增管的反向偏置电压以使过电压为0-5伏特,所述过电压为所述反向偏置电压与所述硅光电倍增管的击穿电压之间的差值;
- [0046] 任选地,所述过电压为3伏特以下;
- [0047] 任选地,所述过电压为1.5伏特。
- [0048] 在某些实施方式中,所述样本分析仪控制器根据不同模式调整施加在所述硅光电倍增管的反向偏置电压,得到不同的过电压。
- [0049] 在某些实施方式中,所述样本分析仪包括温度控制装置,所述温度控制装置控制所述硅光电倍增管的温度为设定温度值;
- [0050] 任选地,所述设定温度值为20°C至40°C之间的任一温度值;
- [0051] 任选地,所述设定温度值为25°C至35°C之间的任一温度值。
- [0052] 在某些实施方式中,所述样本分析仪包括温度补偿装置,所述温度补偿装置用于根据所述硅光电倍增管的温度调整施加在所述硅光电倍增管上的反向偏置电压以使过电压保持恒定,所述过电压为所述反向偏置电压与所述硅光电倍增管的击穿电压之间的差值;
- [0053] 任选地,所述温度补偿装置包括:温度传感器、温度检测电路、AD转换器、温度补偿模块、DA转换器、电压调节电路及输出可调节稳压电源,所述温度传感器和所述温度检测电路用于探测所述硅光电倍增管的温度并产生温度信号,所述AD转换器用于将所述温度信号转换为数字信号,所述温度补偿模块用于根据所述数字信号计算出所述硅光电倍增管的反向偏置电压目标值;所述控制器用于通过控制所述DA转换器改变所述电压调节电路的电路参数,使得所述输出可调节稳压电源的输出电压达到所述反向偏置电压目标值。
- [0054] 本发明实施方式的样本分析仪的样本分析方法,包括:
- [0055] 提供试样,所述试样中含有经过试剂处理的细胞粒子;
- [0056] 提供光学测量装置,包括流动室、光源和至少包括一个硅光电倍增管的光探测器;
- [0057] 所述试样形成柱状样本流经过流动室,所述光源照射流经流动室的样本流产生光信号,光探测器接受光信号并将所述光信号转成电信号;及
- [0058] 根据所述电信号将细胞粒子分类。
- [0059] 在某些实施方式中,所述细胞粒子包括白细胞、网织红细胞和有核红细胞中的一种或多种。
- [0060] 在某些实施方式中,所述光源的光功率为5-15mW。
- [0061] 在某些实施方式中,所述硅光电倍增管包括阵列排布的多个感光单元,所述感光单元的受光面积小于单个细胞粒子的成像面积。
- [0062] 在某些实施方式中,在所述感光单元上施加的反向偏置电压大于击穿电压。
- [0063] 在某些实施方式中,当所述细胞粒子为白细胞时,在所述感光单元上施加第一反

向偏置电压;当所述细胞粒子为网织红细胞时,在所述感光单元上施加第二反向偏置电压;所述第一反向偏置电压小于第二反向偏置电压。

[0064] 本发明实施方式的样本分析仪具有灵敏度高、信噪比高、体积小及成本低等优点。

[0065] 本发明的附加方面和优点将在下面的描述中部分给出,部分将从下面的描述中变得明显,或通过本发明的实践了解到。

附图说明

[0066] 本发明的上述和/或附加的方面和优点可以从结合下面附图对实施方式的描述中将变得明显和容易理解,其中:

[0067] 图1是一种白细胞分类散点图示意图。

[0068] 图2是一种网织红细胞散点图示意图。

[0069] 图3是一种荧光检测电路的功能模块示意图。

[0070] 图4是本发明实施方式的样本分析仪的功能模块示意图。

[0071] 图5是本发明实施方式的样本分析仪的光学测量装置的光路示意图。

[0072] 图6是本发明实施方式的样本分析仪的光学测量装置的流动室的示意图。

[0073] 图7是本发明实施方式的硅光电倍增管的结构示意图。

[0074] 图8是一种硅光电倍增管的感光单元探测单个或多个光子的输出信号特性图。

[0075] 图9是一种感光单元的输出信号随时间变化的特性曲线图。

[0076] 图10是一种硅光电倍增管探测不同通量的光的输出信号特性图,其中,左图为探测非常微弱的光(单光子级)的特性图,右图为探测较高功率的光的特性图。

[0077] 图11是本发明实施方式的样本分析仪的光学测量装置的部分光路示意图。

[0078] 图12是一种硅光电倍增管的串扰率随过电压变化的特性曲线图。

[0079] 图13是本发明实施方式的样本分析仪的部分功能模块示意图。

[0080] 图14是本发明实施方式的样本分析仪的控制器的一部分功能模块示意图。

[0081] 图15是本发明实施方式的样本分析仪得到的正常样本的白细胞分类散点图。

[0082] 图16是本发明实施方式的样本分析仪得到的异常样本的白细胞分类散点图。

[0083] 图17是本发明实施方式的样本分析仪得到的网织红细胞散点图。

[0084] 图18是本发明实施方式的样本分析仪得到的有核红细胞散点图。

[0085] 主要元件符号说明

[0086] 样本采集装置10、试剂供应装置20、样本反应装置30、试样输送装置40、光学测量装置50、控制器60和处理器70;

[0087] 测量电路60a、控制电路60b;

[0088] 光源501、照射透镜组502、流动室503、第一光阑504、第一会聚透镜505、第二光阑506、第一光探测器507、第二会聚透镜508、二向色镜509、第三光阑510、第二光探测器511、第四光阑512、长通滤光片513和第三光探测器514;

[0089] 感光二极管微元514a和大阻值淬灭电阻514b;

[0090] 温度传感器701、温度检测电路702、AD转换器703、温度补偿模块704、DA转换器705、电压调节电路706和输出可调节稳压电源707;

[0091] 电流-电压转换放大器601a、601b、601c、高通滤波器602a、602b、602c、抗混滤波器

603a、603b、603c及AD转换器604a、604b、604c。

具体实施方式

[0092] 下面详细描述本发明的实施方式,实施方式的示例在附图中示出,其中,相同或类似的标号自始至终表示相同或类似的元件或具有相同或类似功能的元件。

[0093] 下面通过参考附图描述的实施方式是示例性的,仅用于解释本发明,而不能理解为对本发明的限制。

[0094] 通过对雪崩光电二极管作为荧光探测器时的灵敏度的研究,发现可以通过以下的途径提高其检测荧光的灵敏度:

[0095] (1)控制雪崩光电二极管的感光区的面积,例如,控制感光区的直径或边长在0.1-2mm的范围。

[0096] 然而,如此,荧光探测器的辅助光路的要求变高,例如,会聚透镜需采用特殊规格的非球面透镜。

[0097] 另外,辅助光路变得非常敏感,调节困难。

[0098] 再有,对光探测器的控制电路的要求也变高,例如,需要根据雪崩光电二极管的极间电容设置合适的低通滤波器、高通滤波器和基频调节器,导致荧光探测器的控制电路变复杂。

[0099] (2)提高样本分析仪的光源的功率。

[0100] 假若采用雪崩光电二极管作为荧光探测器,为了提高灵敏度,则样本分析仪的光源的功率可能需要采用20mW,甚至是25mW的激光,而若采用真空光电倍增管,则光源的功率仅需5mW。而增大光源的功率将增加成本,例如增加一倍的功率,光源成本可能需要翻番。

[0101] (3)提高雪崩光电二极管的电路增益。

[0102] 例如,真空光电倍增管的电路增益一般在10-100KV/A,而为了获得同样幅度的输出信号,雪崩光电二极管的电路增益需增加到1-50MV/A。如此将导致采用雪崩光电二极管探测的荧光信号的噪声比采用真空光电倍增管探测的荧光信号的噪声高50%以上。例如,采用真空光电倍增管的荧光检测电路可以把噪声控制在150mVpp以下,如此,按AD转换器的量程为4伏计算,噪声大约为信号的4%以下,而假若采用雪崩光电二极管并通过提高电路增益来提高灵敏度,则荧光信号的噪声较难控制在300mVpp以下。

[0103] 信号噪声增加可能会导致白细胞五分类的效果变差,更主要的是会影响异常细胞的检测灵敏度和异常样本的报警能力。例如,在检测幼稚粒细胞时,虽然反映在白细胞分类散点图上,在侧向荧光强度方向上,幼稚粒细胞群在中性粒细胞群的上方。但是幼稚粒细胞群与中性粒细胞群连成一片,中间并没有明显的间隔。由于中性粒细胞的百分比正常范围是占白细胞的50%-70%,远大于幼稚粒细胞的百分比,当荧光信号噪声较大时,容易导致把中性粒细胞误判为幼稚粒细胞,或者把幼稚粒细胞误判为中性粒细胞,出现假阳或者假阴。噪声越大,出现假阳或者假阴的概率就越大。

[0104] 另外,成熟红细胞的数量远远大于网织红细胞的数量(正常成年人RBC数量大约为 $3.5-5.5 \times 10^{12}/L$,而网织红细胞只有大约 $0.02-0.2 \times 10^{12}/L$,约占成熟红细胞的0.5%-1.5%),因此,在用雪崩二级管检测得到的网织红细胞散点图上,网织红细胞群与成熟红细胞群的划界区域将变得模糊,在荧光信号噪声较大时,很容易把成熟红细胞误判为网织红

细胞,或者把网织红细胞误判为成熟红细胞,导致网织红细胞计数的准确性下降,异常样本报警灵敏度下降,出现假阳或者假阴概率增大。

[0105] 研发还发现,以上三种途径要同时使用,才能满足检测需要。因此,雪崩光电二极管作为光探测器来检测荧光,具有难以克服的噪声控制问题,将导致样本分析仪对某些与疾病高特异性的细胞如幼稚粒细胞、网织红细胞等的检测灵敏度下降,对异常样本的筛查能力不足,假阳或者假阴概率增加。同时检测电路复杂,光路调试困难。

[0106] 本申请提供了一种样本分析仪。

[0107] 请参阅图4,包括样本采集装置10、试剂供应装置20、样本反应装置30、试样输送装置40、光学测量装置50、控制器60和处理器70。

[0108] 样本采集装置10用于定量采集样本并输送到样本反应装置30。

[0109] 在某些实施方式中,样本采集装置10包括采样针、注射器和采样针清洗拭子(图未示)。

[0110] 当然,样本采集装置10并不限于上面讨论的实施方式,而可以根据需求设置,例如在其他某些实施方式中,样本采集装置10还可以包括自动进样器或者样本仓和分血阀或者定量泵(图未示)。

[0111] 试剂供应装置20用于从试剂瓶或试剂桶中采集定量试剂并输送到样本反应装置30。

[0112] 在某些实施方式中,试剂可以包括稀释液、荧光染料和/或溶血剂,具体根据测量模式配置。例如只进行白细胞分类测试模式时,试剂包括稀释液、溶解红细胞并进行白细胞形态处理的溶血剂和对白细胞染色的荧光染料;而只进行网织红细胞测量模式时,试剂包括稀释液、红细胞球形化处理的试剂和对网织红细胞核酸染色的荧光染料。

[0113] 在某些实施方式中,试剂供应装置20包括注射器和必要的管路清洗装置。

[0114] 当然,试剂供应装置20并不限于上面讨论的实施方式,而在其他实施方式中可以视具体需求作合适的变更。例如,在另外的某些实施方式中,试剂供应装置20还可以包括定量泵和各种试剂的储液池。

[0115] 样本反应装置30用于容置样本和试剂以使样本和试剂反应制备成试样。

[0116] 在某些实施方式中,样本反应装置30包括温度控制装置及混匀装置。

[0117] 温度控制装置用于为样本和试剂反应提供合适的温度环境,例如42℃。当然,具体温度环境视需求而定并不限于上面讨论的实施方式。

[0118] 混匀装置用于充分混合样本和试剂。在某些实施方式中,混均装置可以采用打气泡方式混匀样本和试剂,并可以包括气泵和控制阀装置。当然,混均装置并不限于这些讨论的实施方式,而可以在其他实施方式中采用其他合适的方式,例如混匀装置可以采用电机搅拌方式混均样本和试剂,并可以包括电机。

[0119] 可以理解,样本反应装置30整体也不应限于上面讨论的实施方式,而应在其他实施方式中根据实际需求配置,例如,假若试剂的反应能力足够,样本反应装置30可以省去温度控制装置和/或混匀装置。又例如,样本反应装置30可以包括多个,用于不同测量模式,例如白细胞分类测量模式和网织红细胞测量模式通常各用一个样本反应装置30,一来可以提高测量速率,二则可以避免不同测量模式之间的试剂交叉污染。

[0120] 试样输送装置40用于试样输送到光学测量装置50中,例如将样本反应装置30中反

应充分的试样输送到光学测量装置50中。

[0121] 在某些实施方式中,试样输送装置40可以包括两个注射器、输送管路和控制阀。

[0122] 其中一个注射器用于通过输送管路驱动试样通过光学测量装置50,例如提供压力使试样通过光学测量装置50,另外一个注射器用于通过输送管路驱动稀释液形成鞘液,以使鞘液包裹着试样从而形成窄细的柱状样本流流过光学测量装置50。

[0123] 控制阀可以设置输送管路上,用于控制不同样本反应装置30到光学测量装置50的连通或断开,从而可以选择合适的试样进入光学测量装置50。

[0124] 当然,试样输送装置40并不限于上面讨论的实施方式,而应该视具体需求设定,例如在其他某些实施方式中,注射器也可以换成由压力推动的液罐及产生压力的气源。

[0125] 光学测量装置50用于光照射柱状样本流、采集柱状样本流中各细胞粒子因光照射所产生的散射光和荧光并输出对应的电信号(散射光信号及荧光信号)。

[0126] 光学测量装置

[0127] 请参阅图5,在某些实施方式中,光学测量装置50包括光源501、照射透镜组502、流动室503、第一光阑504、第一会聚透镜505、第二光阑506、第一光探测器507、第二会聚透镜508、二向色镜509、第三光阑510、第二光探测器511、第四光阑512、长通滤光片513及第三光探测器514。

[0128] 在某些实施方式中,光源501可以使用激光器,例如工作波长为635nm的激光二极管。

[0129] 当然,光源501并不限于上面讨论的实施方式,而在其他实施方式中可以视需求而作出变更。

[0130] 请参阅图6,流动室503用于与试样输送装置40连接以供柱状样本流503c流过并形成有照射区503e。在某些实施方式中,流动室503包括与试样输送装置40连接的入口503a。样本反应装置30的试样在试样输送装置40作用下从入口503a进入流动室503,并在入口503a受鞘液503b的包裹形成柱状样本流503c,柱状样本流503c的宽度很小,使得细胞粒子503d只能沿着柱状样本流503c的流动方向一个一个排列经过照射区503e,接受光源501的照射并产生脉冲形态的散射光和荧光。

[0131] 也即是说,样本分析仪采用流式细胞术进行细胞分类和计数。

[0132] 当然,流动室503并不限于上面讨论的实施方式,而在其他实施方式中可以视测量的需求而作出变更。

[0133] 在某些实施方式中,照射透镜组502设置在光源501与流动室503之间的光路上,用于将光源501发出的激光会聚成合适的光斑照射到照射区503e,并打在柱状样本流503c内的细胞粒子503d上,产生散射光和荧光。

[0134] 其中,散射光包括与激光光轴成1-10度角左右的低角度前向散射光及与激光光轴基本垂直方向上的侧向散射光。前向散射光反映了细胞粒子503d的体积大小,侧向散射光反映的是细胞粒子503d内部结构的复杂程度。荧光包括与激光光轴基本垂直方向上的侧向荧光,侧向荧光反映了细胞粒子503d内部DNA、RNA的含量。

[0135] 前向散射光的强度最强,侧向散射光的强度次之,而侧向荧光的强度远远小于前向散射光及侧向散射光。

[0136] 在某些实施方式中,照射透镜组502可以包括准直透镜和柱面镜。

[0137] 当然,照射透镜组502并不限于上面讨论的实施方式,而在其他实施方式中可以视测量的需求而作出变更。

[0138] 第一会聚透镜505设置在光源501的光轴上且位于流动室503另一侧,并用于收集前向散射光。第一光阑504设置于会聚透镜505前,用于遮挡直射本底光。第一光探测器507设置在第一会聚透镜505的会聚光路上,例如位于会聚点上,用于采集前向散射光,并转换为对应的电信号(前向散射光信号)。第二光阑506设置在第一光探测器507前面,用于消除杂光。

[0139] 可以理解,第一光阑504、第一会聚透镜505及第二光阑506构成了第一光探测器507的辅助光路,用于提高第一光探测器507的检测效率及提高信噪比。

[0140] 当然,第一光探测器507的辅助光路并不限于上面讨论的实施方式,而在其他实施方式中可以根据需求设定。

[0141] 第二会聚透镜508设置在流动室503与光源501的光轴基本垂直的光路上,用于收集侧向散射光和侧向荧光的。二向色镜509设置在第二会聚透镜508的会聚光路上,用于分出侧向散射光和侧向荧光。第二光探测器511设置在二向色镜509的侧向散射光的光路上,例如位于会聚点上,用于采集侧向散射光并转换成对应的电信号(侧向散射光信号)。第三光阑510设置在第二光探测器511前面,用于消除杂光。第三光探测器514设置在二向色镜509的侧向荧光的光路上,例如位于会聚点上,用于采集侧向荧光并转换成对应的电信号(荧光信号或侧向荧光信号)。长通滤光片513及第四光阑512依次设置在第三光探测器514前方,用于消除荧光波长以外的杂光及光路杂光。

[0142] 第二会聚透镜508、二向色镜509、第三光阑510、长通滤光片513及第四光阑512构成了第二光探测器511及第三光探测器514的辅助光路,用于分光、提高检测效率及提高信噪比。

[0143] 当然,第二光探测器511及第三光探测器514的辅助光路不限于上面讨论的实施方式,而可以在其他实施方式中根据需求设定。

[0144] 可以理解,在某些其他实施方式中,光学测量装置50可以根据测量的实际需要省略部分元件,例如第二光阑506等。

[0145] 在某些实施方式中,考虑到前向散射光和侧向散射光的强度相对较强,PIN型光电二极管(PIN photodiode)的灵敏度已经能够满足测量的要求,因此,第一光探测器507及第二光探测器511可以采用成本较低的PIN型光电二极管(PIN photodiode),如此可以降低样本分析仪的成本。

[0146] 而由于侧向荧光的强度远远小于前向散射光及侧向散射光,若采用真空光电倍增管,存在体积大及成本高的不足,若采用雪崩二极管虽然成本低但灵敏度不足。本发明一个实施方式的样本分析仪采用硅光电倍增管(silicon photomultiplier, SiPM)作为第三光探测器514来检测荧光,实现低功率光源501条件下,高灵敏度的荧光检测。

[0147] 请参阅图7,第三光探测器514包括组成面阵列的多个感光单元,每个感光单元包括串联连接的感光二极管微元514a和大阻值淬灭电阻(quench resistor)514b。感光单元的尺寸可能在几微米到上百微米之间,数量可能在几百到上万个之间。淬灭电阻514b的阻值一般在几百千欧姆到上兆欧姆。

[0148] 硅光电倍增管具有体积小、灵敏度高(增益高达 10^6 ,和真空光电倍增管接近)、工

作电压低(一般为几十伏特)、对磁场不敏感、成本低(不到真空光电倍增管的1/10,和雪崩光电二极管接近)等优点。

[0149] 因此,第三光探测器514采用硅光电倍增管使得光学测量装置50及样本分析仪具有灵敏度高、信噪比高、体积小及成本低等优点。

[0150] 请一并参阅图8,每个感光单元都工作在盖革模式。例如,在感光单元上施加超过感光二极管微元514a的击穿电压的反向偏置电压时,感光二极管微元514a内部由于碰撞产生的电子空穴对会呈幂指数增长,通过二极管微元514a的电流急剧增加。但是,由于淬灭电阻514b的存在,当电流增大到一定程度时,淬灭电阻514b产生的压降会使得感光二极管微元514a上的反向偏置电压小于击穿电压,电流放大效应消失,回复初始态,也即是输出固定幅度的电流脉冲。在该过程中电流增益可达 10^5-10^6 ,因而可用于单光子探测。

[0151] 感光单元就相当于光子触发开关,输出信号(电流)只有“有”或“无”两种状态,在为“有”的状态时,输出信号的幅度是确定的,不与入射光子数量成比例关系,所以无论有多少个光子同时入射到感光单元,输出信号都与一个光子入射到感光单元时基本相同。

[0152] 请参阅图9,感光单元的输出信号存在一个特征,在探测到光子后,输出信号会在很快时间内(通常几个纳秒)达到固定的最大值,随即开始衰减并回复到零,衰减时间称为回复时间,又称死区时间,通常可达上百纳秒。在回复时间里,即使下一个光子达到,感光单元也不会产生任何输出信号,只有在回复时间过后才能进行下一个光子探测。

[0153] 对荧光的探测方式,硅光电倍增管及感光单元与雪崩光电二极管有极大的不同。雪崩光电二极管在探测荧光时,为了将不同的光强度转成不同强度的电信号,是只能工作在线性模式下,即探测荧光时,反向偏置电压需要在击穿电压之下,那么此时,输出信号的幅度都与入射光强度成正比关系,但在线性模式下,最大电流增益一般只有几十倍到上百倍。而本申请中的硅光电倍增管在探测荧光时,每个感光单元在工作在盖革模式,即反向偏置电压是在击穿电压之上的,那么此时,单个感光单元的输出信号幅度基本是一个固定值,不随入射光强度增大而增大。好处是,盖革模式下最大电流增益能达到 10^5-10^6 ,可以得到非常高的灵敏度。本申请中的硅光电倍增管,具有阵列式的感光单元,单个感光单元的面积远小于荧光光斑的面积,或者说单个感光单元的面积小于单个细胞粒子成像的面积,理想状态下,单个感光单元会接收单光子的照射产生一个单光子的电信号。由于硅光电倍增管集成了数量庞大、高密度的感光单元,单位时间内的输出是所有感光单元的输出总和,如图10所示,因而可以将不同的光强度转成不同强度的电信号,并具有非常高的灵敏度。

[0154] 控制器

[0155] 请同时参阅图4、13及14,控制器60包括测量电路60a和控制电路60b。

[0156] 在某些实施方式中,测量电路60a可以包括电流-电压转换放大器601c、高通滤波器602c、抗混滤波器603c及AD转换器604c。电流-电压转换放大器601c可以设置第三光探测器514(即硅光电倍增管)的电路增益。

[0157] 除了电流-电压转换放大器601c、高通滤波器602c、抗混滤波器603c及AD转换器604c,测量电路60a还包括电流-电压转换放大器601a和601b、高通滤波器602a和602b、抗混滤波器603a和603b及AD转换器604a和604b。

[0158] 第一光探测器507、第二光探测器511及第三光探测器514输出的电信号分别经电流/电压转换放大器601a、601b和601c进行电流/电压转换,并经信号调理后分别进入AD转

换器604a、604b和604c转换为数字信号以利于处理器70处理。

[0159] 也即是说,电流/电压转换放大器601a、601b和601c分别用于转换第一光探测器507、第二光探测器511及第三光探测器514输出的电流电信号为电压电信号。

[0160] 对于前向散射光信号,信号调理电路通常包括截止频率较低的高通滤波器602a,有助于滤除直本底光信号以及消除低频的基线波动。但高通滤波器602b对于侧向散射光信号,因为侧向散射光的基线波动相对侧向散射光信号可以忽略。而与使用雪崩二极管检测荧光不同,本申请的样本分析仪使用硅光电倍增管检测荧光,低频的基线波动不严重,高通滤波器602c也不是必须的。因此,在某些实施方式中高通滤波器602b和602c可以省略。

[0161] 基于通用的设计原则,信号在进入AD转换器604a、604b和604c前,优选先经过抗混叠滤波器603a、603b和603c处理,目的是防止信号中的高频干扰成分在采样中转变为与有用信号混叠的低频干扰。

[0162] 另外,在某些实施方式中,测量电路60a在电流/电压转换放大器601a/601b/601c之后,还可以包括增益可调的电压放大器,目的是实现散点图位置的校准。

[0163] 而在另外的某些实施方式中,散点图位置的校准是通过在处理器70里设置数字放大器实现。

[0164] 控制电路60b用于控制样本采集装置10、试剂供应装置20、样本反应装置30、试样输送装置40等装置相关机电、液路、温控等部件的控制和驱动,完成检测动作。

[0165] 处理器70用于处理AD转换器604a、604b和604c输出的数字信号以得到检测结果。

[0166] 熟习该项技术者可以了解,控制电路60b与处理器70可整合为单一控制器,以一多功能芯片(MCU)实现,上述终将其分列仅为了清楚说明,不应视为本申请案限制。

[0167] 请参阅图15,上述的样本分析仪,可分出淋巴细胞、单核细胞、中性粒细胞和嗜酸性粒细胞,实现白细胞四分类。将样本用其他试剂处理后,通过前向散射光强度信息和侧向散射光强度信息对嗜碱性粒细胞进行分类计数,与白细胞四分类的结果结合计算得到白细胞五分类的结果。

[0168] 进一步的,研发还发现,在理想情况下,如果同时入射光子数少于硅光电倍增管的感光单元的数量且在照射区域内分布平均的话,那么硅光电倍增管的输出信号的电流脉冲幅度与入射光的瞬时功率成良好的线性关系。但是,如果有效入射光子数大于硅光电倍增管的感光单元的数量,或者入射光子过分集中在硅光电倍增管的少数感光单元上,则导致同一个感光单元同时入射过多光子,那么硅光电倍增管输出信号(电流脉冲)的幅度与入射光的瞬时功率之间的关系将偏离线性。

[0169] 对于样本分析仪而言,当荧光信号线性不足时,将导致不同的细胞群的间距变小,例如在白细胞分类散点图中,荧光信号线性不好可能导致单核细胞和中性粒细胞区分不足,最终影响测量结果和报警灵敏度。同时,线性不足也会导致测量的动态范围不足的问题。

[0170] 为了解决线性不足或动态范围不足的问题,通过研究,可以从增加硅光电倍增管的感光单元的数量和降低单个感光单元同时入射光子数或者说降低单位面积上的光功率两个方面来解决。下面分别说明:

[0171] 措施1:增加硅光电倍增管的感光单元的数量。

[0172] 在本申请的一个实施例中,对光探测器上的感光单元的数量进行了优化。

[0173] 如上所讨论的,线性不足的根源可能是多个光子同时入射到同一个感光单元上,使感光单元的输出信号相当于只有一个光子入射。那么增加单位面积的感光单元数量,多个光子同时落在同一个感光单元的概率将降低。对感光单元的数量计算如下。

[0174] 入射光功率和入射光子数有如下关系:

$$[0175] \quad Pt = NE = Nhc/\lambda$$

[0176] 其中,P为入射光功率,t为时间,N为t时间内的入射光子数,E为单光子能量, $h = 6.63 \times 10^{-34}$,为普朗克常数, $c = 3 \times 10^8$ m/s为光速, λ 为波长。

[0177] 在某些实施方式中,光源501发射的激光的波长为635nm,激发的荧光的波长 $\lambda = 670$ nm。因此,可以得到 $E = 2.97 \times 10^{-19}$ J。

[0178] 细胞粒子503d经过照射区503e被激光照射后产生的荧光脉冲宽度约1us,在这过程中瞬时最大入射光子数出现在荧光脉冲顶部宽度约 $t = 100$ ns的时间内。

[0179] 在某些实施方式中,光源501的功率为5mW,细胞粒子503d产生的荧光的瞬时最大光功率约为 $P = 30$ nW,但硅光电倍增管的光子探测效率在670nm波长处大概只有10%左右,也即是说30nW的瞬时最大光功率实际被有效感光的只有3nW左右,对应被感光的光子数约为 $N = Pt/E = 1000$ 。

[0180] 因此,控制荧光光斑完全落在硅光电倍增管的感光区内,假设每一个光子分别照射在每个感光单元的感光区内且没有重叠,那么感光单元最少需要1000个。再考虑到荧光光斑通常为圆形或椭圆形,而硅光电倍增管的感光区通常为方形,有效利用面积最大只有78%,那么感光单元至少需要1280个。

[0181] 但是,硅光电倍增管的感光单元的数量不应该限于上面讨论的实施方式。可以理解,感光单元数的具体数量应该根据实际需求而定,例如根据产生的荧光强度确定,当荧光强度较弱时,需要的感光单元数减小,反之感光单元数增加。对于某些实施方式,感光单元数的数量在500个以上也可以得到较好的线性和动态范围。

[0182] 在本申请中的实施例中,对光探测器的感光区的面积进行了优化。可以适当增加感光区的面积,不需要控制感光区的直径或边长在0.1-2mm的范围。

[0183] 当硅光电倍增管的感光区的面积在 1mm^2 以下时,要使得荧光光斑准确落在硅光电倍增管感光区内,则对第二光探测器511及第三光探测器514的辅助光路的加工和装配的精度要求变高,同时光路变得非常敏感,光学的调试变得困难,导致成本的增加。

[0184] 另一方面,硅光电倍增管的感光区面积优选小于一感光区临界面积,其中该感光区临界面积为使一暗计数脉冲叠加到单个细胞粒子所产生的所述荧光信号脉冲导致脉冲幅值失真的临界面积。于本实施例中,当硅光电倍增管感光区面积之感光区临界面积优选小于 36mm^2 ,当硅光电倍增管感光区面积在 36mm^2 以上时,会导致硅光电倍增管的暗计数的大幅增大,导致硅光电倍增管的噪声增大。暗计数为没有光输入情况下每秒钟硅光电倍增管输出的电流脉冲个数,由感光二极管微元514a的热电子引起的雪崩导致,因此暗计数的电流脉冲幅度等于单光子电流脉冲幅度。暗计数率一般处于30KCPS/ mm^2 水平(KCPS为千个每秒),硅光电倍增管面积越大,暗计数越多。最差情况下,暗计数脉冲将叠加到细胞粒子503d产生的荧光信号脉冲上导致脉冲幅值失真,荧光越弱则影响越严重。对于样本分析仪,细胞粒子503d的荧光信号脉冲的宽度通常约为1us,周期至少10us以上,为减小暗计数的影响,信号脉冲顶部约0.3us的区域尽可能不出现暗计数脉冲,这就要求暗计数率要控制在约

3.3MCPS(MCPS为百万个每秒)内,也即硅光电倍增管的感光区面积不大于约 36mm^2 。

[0185] 因此,合适的硅光电倍增管的感光区的面积是 $1\text{--}36\text{mm}^2$,感光区形状可以是直径约为 $1.1\text{--}6.8\text{mm}$ 的圆形,例如,直径约为 $2\text{--}6\text{mm}$ 的圆形;也可以是边长为 $1\text{--}6\text{mm}$ 的正方形,还可以采用具有相同程度的面积的长方形或其他形状。在某些实施方式中,硅光电倍增管的感光区采用边长为 3mm 面积为 9mm^2 的正方形。

[0186] 本申请的一个实施例中,对光探测器的单个感光单元的尺寸进行了优化。减小单个感光单元尺寸有助于增加硅光电倍增管内感光单元数量,减少单个感光单元接收多个光子的机率。

[0187] 当硅光电倍增管的感光区的面积为 $1\text{--}36\text{mm}^2$,而感光单元至少需要1280个时,按正方形计算那么每个感光单元的尺寸(边长)要小于约 $167\mu\text{m}$ 。

[0188] 考虑到,感光单元发生雪崩效应后的回复时间与感光单元的电容成正向关系,感光单元的尺寸越大,等效电容就越大,则回复时间就越长。由于在回复时间里感光单元无法探测下一个光子,而样本分析仪产生的侧向荧光为持续时间在 $1\mu\text{s}$ 左右的多光子信号,因此回复时间越长无法探测的光子数就越多,线性就越受影响。

[0189] 当感光单元尺寸在 $50\mu\text{m}$ 以上时,回复时间增加到 500ns 以上,意味着在一个细胞生产的荧光脉冲信号周期里每个感光单元只能探测到两个光子,可能对探测结果影响较大。因此,合适的感光单元尺寸是控制在 $50\mu\text{m}$ 及以下尺寸,如此一般可获得 300ns 以下的回复时间。

[0190] 但是,感光单元的尺寸又关系到硅光电倍增管的电流增益,感光单元的尺寸在 $10\mu\text{m}$ 以下时,电流增益将下降到 10^5 以下,如此,将需要提高硅光电倍增管的电路增益,导致噪声增加,不利于获得与真空光电倍增管相近甚至更优的噪声。

[0191] 因此,感光单元的合适尺寸应该尽可能控制在 $10\mu\text{m}$ 到 $50\mu\text{m}$ 之间。在某些实施方式中,感光单元的尺寸为 $35\mu\text{m}$ 左右。

[0192] 综上,硅光电倍增管的感光区的面积可以控制在大约 $1\text{--}36\text{mm}^2$ 之间、感光单元的尺寸可以控制在大约 $10\mu\text{m}\text{--}50\mu\text{m}$ 之间、感光单元的数量可以控制在1280个及以上。

[0193] 措施2:降低单个感光单元同时入射光子数或者说降低单位面积上的光功率。

[0194] 要降低单个感光单元同时入射光子数或者单位面积上的光功率,有两种方法:一是通过降低光源501的光功率来降低侧向荧光的光功率,二是增大侧向荧光的光斑面积和硅光电倍增管感光区的面积。

[0195] 在本申请的另一个实施例中,对光学测量装置中的光源的功率进行了优化。

[0196] 由于光源501发出的激光照射在细胞粒子503d上同时产生前向、侧向散射光和侧向荧光,当激光功率约为 5mW 时,侧向散射光功率最大值可能达到 $20\mu\text{W}$ 左右。如前面讨论的,为降低仪器成本可以采用PIN型光电二极管作为第二光探测器511探测侧向散射光,而PIN型光电二极管的灵敏度大概约为 0.4A/W ,因此,为获得合适幅度的侧向散射光信号,PIN型光电二极管的检测电路增益一般设置在 700KV/A 以上。另外,电路带宽保持在 500kHz 以上,则PIN型光电二极管检测电路的噪声可能达到 30mVpp 以上。激光功率越低,PIN型光电二极管检测电路的噪声越大,信噪比越差,对白细胞分类散点图或网织红细胞散点图影响越大,最终影响细胞分类及计数。因此,在某些实施方式中,光源501的功率为 5mW 以上为好。当然,在其他某些实施方式中,侧向散射光如果使用雪崩光电二极管探测散射光,则激光功率可

以控制在1mW左右及以下,但成本将会增加。

[0197] 因此,1mW以上的光源即可用作本申请样本分析仪的光源,从性能和成本综合考虑,光源功率不超过20mW较为合适。优选的,光源功率选择在5-15mW。更进一步的,光源的功率可以在此范围内,根据需要进行动态调整。

[0198] 在本申请的又一个实施例中,对光学测量装置中荧光光斑与感光区的关系进行了优化。

[0199] 如果保持光源的光功率不变,那么增大侧向荧光的光斑面积,也可以起到降低单个感光单元同时入射光子数,但为了使侧向荧光的光斑面积以尽可能覆盖硅光电倍增管的感光区,相应增加硅光电倍增管感光区的面积,达到相同的提高侧向荧光的信号线性的效果。

[0200] 请参阅图11,流动室503出来的侧向荧光经过第二会聚透镜508聚焦后投射到第三光探测器514的感光区上。根据第三光探测器514的感光区大小,调整第三光探测器514与第四光阑512之间的距离,即可使得侧向荧光的光斑比感光区小又尽可能占据整个感光区。侧向荧光的光斑一般是圆形或椭圆形,如果感光区为方形,那么侧向荧光的光斑面积应为感光区的面积的大约50%-78%之间。

[0201] 另一个方面,控制光学测量装置测量荧光时,因为要进行信号的放大,会带来噪音的问题。

[0202] 通过研究发现,硅光电倍增管的噪声主要来源于暗计数以及感光单元之间的光串扰。

[0203] 如前面讨论的,硅光电倍增管的感光区的面积在 36mm^2 以下时,可以较好控制暗计数带来的噪声。在某些实施方式中,硅光电倍增管的感光面积为 9mm^2 ,暗计数率可以控制在大约1MCPS下,对信号脉冲的影响可以基本忽略。因此,通过选择合适的感光区的面积可以减低暗计数导致的噪声问题。

[0204] 而感光单元之间的光串扰可以从以下几个方面进行优化。

[0205] 例如,在本申请的再一个实施例中,对光学测量装置中的过电压的设定进行了优化来降低噪音。

[0206] 感光单元之间的光串扰来源于一个感光单元发生雪崩时释放出光子耦合进入到另一个感光单元中,导致后一个感光单元雪崩产生电流脉冲。目前硅光电倍增管的串扰率普遍在5%-10%之间。换言之,在不考虑暗计数的情况下,100个光子入射硅光电倍增管,产生的电流脉冲有可能等于105-110个光子入射得到的电流脉冲,又或者,感光单元之间的光串扰导致的噪声幅度约为信号的5%-10%。这样的噪声水平比真空光电倍增管差。

[0207] 然而,硅光电倍增管的串扰率与施加在硅光电倍增管的过电压(overvoltage)密切相关,过电压越大则串扰率越高。过电压为施加在硅光电倍增管上的反向偏置电压与硅光电倍增管的击穿电压之间的差值。

[0208] 请参阅图12,经实验测试发现:当过电压减小到1.5V时,串扰率可以控制到只有不到1%。如此,硅光电倍增管的光串扰噪声已经优于真空光电倍增管的噪声。

[0209] 在某些实施方式中,硅光电倍增管的反向偏置电压设置得比硅光电倍增管的击穿电压略大。过电压可以是1.5V左右。但是,要获得与真空光电倍增管相当的噪声水平,过电压设置在3V以下都是合适的。当然,在另外一些实施方式中,在噪声水平允许的情况下,过

电压设置在5V以下也是可以的。

[0210] 此外,在本申请的样本分析仪中,通过对硅光电倍增管的温度控制来降低噪音。

[0211] 硅光电倍增管是温度敏感器件,电流增益随温度变化明显。这主要是因为感光二极管微元514a的击穿电压随温度升高而提高,如果硅光电倍增管的反向偏置电压不变,那么过电压将随温度升高而降低,而电流增益又与过电压成正向关系,因此温度的升高将导致增益下降。样本分析仪在测量过程中,如果不保持电流增益稳定,将影响测量结果。

[0212] 在一个实施例中,采用恒温的方式对硅光电倍增管进行温控,使之工作在设定温度下,该设定温度值可以是20℃至40℃之间的任一温度值,优选25℃至35℃之间的任一温度值。温控方案需要增加温度控制装置,例如封闭的温控室、加热/制冷器件以及相关的控制驱动电路,导致样本分析仪的体积及成本增加。

[0213] 另外,可以理解,降低硅光电倍增管的温度有利于降低硅光电倍增管的暗计数,但对制冷器件和温控室的要求更高,可能导致成本进一步增加。

[0214] 在另一个实施例中,通过硅光电倍增管的温度补偿的方式降低噪音。例如,对硅光电倍增管的反向偏置电压进行温度补偿,即根据当前硅光电倍增管温度实时调整硅光电倍增管的反向偏置电压,使得过电压保持恒定。温度补偿方案只需实现硅光电倍增管的反向偏置电压的调节,相较于温控方案,基本上未增加样本分析仪的体积和成本。因此,在某些实施方式中,采用温度补偿方案保持硅光电倍增管的电流增益的稳定性。

[0215] 请参阅图13,样本分析仪包括温度补偿装置,温度补偿装置包括温度传感器701、温度检测电路702、AD转换器703、集成于控制器60内的温度补偿模块704、DA转换器705、电压调节电路706及输出可调节稳压电源707。

[0216] 温度传感器701和温度检测电路702用于探测第三光探测器514的环境温度并产生温度信号,温度信号经AD转换器703转换为数字信号进入控制器60,由温度补偿模块704计算出第三光探测器514的反向偏置电压目标值。

[0217] 在某些实施方式中,温度补偿模块704可以采用下式计算:

$$[0218] \quad V_{bias} = V_0 + k(T - T_0) + V_{ov}$$

[0219] 其中, V_{bias} 施加在硅光电倍增管上的反向偏置电压目标值, V_0 为硅光电倍增管在温度 T_0 时的击穿电压, k 为击穿电压随温度变化的系数,一般是常数, T 为当前温度, V_{ov} 为过电压。当温度从 T_0 变化到 T 时,感光二极管微元514a的击穿电压从 V_0 变化到 $V_0 + k(T - T_0)$,因此,只要硅光电倍增管上的反向偏置电压调节到目标值 V_{bias} ,那么过电压将保持不变,电流增益保持稳定。 V_0 和 k 都可在硅光电倍增管的器件手册上获得,过电压 V_{ov} 可根据需要设置,例如在某些实施方式中, V_{ov} 为1.5V。

[0220] 在反向偏置电压目标值 V_{bias} 确定后,控制器60通过控制DA转换器705改变电压调节电路706的电路参数(在某些实施方式中是反馈电压值),使得输出可调节稳压电源707的输出电压(即反向偏置电压)达到反向偏置电压目标值 V_{bias} 。

[0221] 利用上述的样本分析仪检测血液样本,可以实现白细胞分类,还可以检出异常样本中的异淋/原始细胞、幼稚粒细胞等,结果如图16所示。在另外一些实施方式中,也可以通过有核红细胞计数的有核红细胞散点图中得到嗜碱性粒细胞。

[0222] 在本申请的再一个实施例的样本分析仪,可以实现多种测量模式,即测定含不同的细胞粒子时,采用不同的试剂与样本反应,获得不同的试样,或采用不同的光学测量参数

对试样进行测量。特别是,由于白细胞和网织红细胞经过染色后,荧光信号强度不同,采用不同的光学测量参数,会得到更高的灵敏度。而在同一个测量模式下,又希望能够保持光学测量参数的一致性,以获得稳定可靠的结果。因此,上述的温度控制装置或温度补偿装置,可以使样本分析仪在同一测量模式的测量过程中保持电流增益稳定。同时,控制器60可以根据不同的测量模式设置不同的过电压,以获得不同的电流增益,从而获得不同的信号放大效果。例如,网织红细胞测量模式下的荧光往往弱于白细胞分类测量模式,那么网织红细胞测量模式下,控制器60会调整过电压,以增大电流增益。

[0223] 但是,硅光电倍增管的电流增益的可调节范围一般在5倍左右,而不同测量模式的荧光强度差异可在10倍以上,要在同一仪器上实现网织红细胞测量模式和白细胞分类测量模式,硅光电倍增管的增益可调节范围仍是偏小。

[0224] 为此,在某些实施方式中,可同时采用温度补偿装置调节电流增益及采用测量电路调节电路增益来满足不同测量模式的测量需要。

[0225] 例如,在某些实施方式中,电流-电压转换放大器601c可以设置至少两种电路增益,每种电路增益对应样本分析仪的一种测量模式,样本分析仪的测量模式改变时,通过温度补偿装置改变电流增益,电流-电压转换放大器601c同时切换电路增益。

[0226] 当然,在某些实施方式中,也可以保持电流增益稳定,只通过改变放大电路增益以适应不同测量模式的需要,如此可以控制串扰率。另外,在这些实施方式中,由于电路增益远小于电流增益,电路噪声可忽略,因此也可以控制信噪比。

[0227] 在某些实施方式,也可以在不同测量模式下改变光源501的功率来实现散点图位置校准,如白细胞分类测量模式下功率为5mW,而网织红细胞测量模式下激光功率设置为15mW,代价是光源501的功率增加导致成本增加。

[0228] 在一个利用本申请样本分析仪检测含有网织红细胞的样本的实施例中,设定样本分析仪为网织红细胞测量模式下,根据侧向荧光强度信息和前向散射光强度信息,将得到网织红细胞散点图,可分出成熟红细胞、网织红细胞、血小板以及白细胞等,结果如图17所示。

[0229] 同样的,在另外的实施方式中,还可以在有核红细胞测量模式下检测含有有核红细胞和白细胞的样本,根据侧向荧光强度信息和前向散射光强度信息得到有核红细胞散点图,分出有核红细胞、嗜碱性粒细胞以及白细胞等。结果如图18所示。

[0230] 检测结果既可以在样本分析仪的显示屏显示,也可以传输到计算机进行显示,取决于样本分析仪的配置及检测的需求。

[0231] 本申请的另一个方面,提供了一种样本分析仪的样本分析方法,包括:

[0232] 提供试样,所述试样中含有经过试剂处理的细胞粒子;

[0233] 提供光学测量装置,包括流动室、光源和至少包括一个硅光电倍增管的光探测器;

[0234] 所述试样形成柱状样本流经过流动室,所述光源照射流经流动室的样本流产生光信号,光探测器接受光信号并将所述光信号转成电信号;及

[0235] 根据所述电信号将细胞粒子分类。

[0236] 以试样中含有选自白细胞、网织红细胞和有核红细胞的检测为例,进行说明。

[0237] 按如前所述的方式,将处理好的试样提供给光学测量装置,用光功率为5-15mW的光源照射流经流动室的样本流,产生光信号。光探测器中的硅光电倍增管具有阵列排布的

多个感光单元,每个感光单元的受光面积小于单个细胞粒子的成像面积。在感光单元上施加大于击穿电压的反向偏置电压,光探测器接受光信号并将光信号转成电信号,每个电信号反映了每个细胞粒子的光信号的强度,例如荧光信号的强度。利用这些电信号的差异,将细胞粒子分类,并计数。

[0238] 在另一个实施例中,光学测量装置的反向偏置电压可以根据不同模式分别设置,例如当待测的细胞粒子为白细胞时,在感光单元上施加第一反向偏置电压;当待测细胞粒子为网织红细胞时,在感光单元上施加第二反向偏置电压;第一反向偏置电压小于第二反向偏置电压,以使探测网织红细胞时具有更好的灵敏度。另外,也可以根据不同模式,设置不同的放大器增益。

[0239] 经临床性能评估,本发明实施方式的样本分析仪分别进行了白细胞分类计数、网织红细胞计数、有核红细胞计数、异常样本报警能力等测试,其结果与使用真空光电倍增管做荧光探测的血细胞分析仪对照样机测试结果具有很好的一致性。

[0240] 其他

[0241] 以上的说明,是仪检测荧光为例说明,在另外的某些实施方式中,上述的光学测量装置,也可以测量其他类型的弱光,例如侧向散射光,光吸收信号等。

[0242] 在另外的某些实施方式中,样本分析仪可以包括有多个光源并形成有多路荧光或弱光,硅光电倍增管可以作为光探测器探测这些荧光或弱光,并结合散射光实现不同细胞粒子及粒子表面特征信息的检测。

[0243] 在另外的某些实施方式中,样本分析仪还可以应用于其他样本的检测,而限于血液样本。

[0244] 在另外的某些实施方式中,可以将多个硅光电倍增管组合成面积及感光单元数量满足需求的硅光电倍增管阵列作为光探测器。

[0245] 在本发明的实施方式的描述中,需要理解的是,术语“中心”、“纵向”、“横向”、“长度”、“宽度”、“厚度”、“上”、“下”、“前”、“后”、“左”、“右”、“竖直”、“水平”、“顶”、“底”、“内”、“外”、“顺时针”、“逆时针”等指示的方位或位置关系为基于附图所示的方位或位置关系,仅是为了便于描述本发明的实施方式和简化描述,而不是指示或暗示所指的装置或元件必须具有特定的方位、以特定的方位构造和操作,因此不能理解为对本发明的实施方式的限制。此外,术语“第一”、“第二”仅用于描述目的,而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量。由此,限定有“第一”、“第二”的特征可以明示或者隐含地包括一个或者更多个所述特征。在本发明的实施方式的描述中,“多个”的含义是两个或两个以上,除非另有明确具体的限定。

[0246] 在本发明的实施方式的描述中,需要说明的是,除非另有明确的规定和限定,术语“安装”、“相连”、“连接”应做广义理解,例如,可以是固定连接,也可以是可拆卸连接,或一体地连接;可以是机械连接,也可以是电连接或可以相互通讯;可以是直接相连,也可以通过中间媒介间接相连,可以是两个元件内部的连通或两个元件的相互作用关系。对于本领域的普通技术人员而言,可以根据具体情况理解上述术语在本发明的实施方式中的具体含义。

[0247] 在本发明的实施方式中,除非另有明确的规定和限定,第一特征在第二特征之“上”或之“下”可以包括第一和第二特征直接接触,也可以包括第一和第二特征不是直接接

触而是通过它们之间的另外的特征接触。而且,第一特征在第二特征“之上”、“上方”和“上面”包括第一特征在第二特征正上方和斜上方,或仅仅表示第一特征水平高度高于第二特征。第一特征在第二特征“之下”、“下方”和“下面”包括第一特征在第二特征正上方和斜上方,或仅仅表示第一特征水平高度小于第二特征。

[0248] 下文的公开提供了许多不同的实施方式或例子用来实现本发明的实施方式的不同结构。为了简化本发明的实施方式的公开,下文中对特定例子的部件和设置进行描述。当然,它们仅仅为示例,并且目的不在于限制本发明。此外,本发明的实施方式可以在不同例子中重复参考数字和/或参考字母,这种重复是为了简化和清楚的目的,其本身不指示所讨论各种实施方式和/或设置之间的关系。此外,本发明的实施方式提供了的各种特定的工艺和材料的例子,但是本领域普通技术人员可以意识到其他工艺的应用和/或其他材料的使用。

[0249] 在本说明书的描述中,参考术语“一个实施方式”、“一些实施方式”、“示意性实施方式”、“示例”、“具体示例”或“一些示例”等的描述意指结合所述实施方式或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施方式或示例中。在本说明书中,对上述术语的示意性表述不一定指的是相同的实施方式或示例。而且,描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任何的一个或多个实施方式或示例中以合适的方式结合。

[0250] 流程图中或在此以其他方式描述的任何过程或方法描述可以被理解为,表示包括一个或更多个用于实现特定逻辑功能或过程的步骤的可执行指令的代码的模块、片段或部分,并且本发明的优选实施方式的范围包括另外的实现,其中可以不按所示出或讨论的顺序,包括根据所涉及的功能按基本同时的方式或按相反的顺序,来执行功能,这应被本发明的实施例所属技术领域的技术人员所理解。

[0251] 在流程图中表示或在此以其他方式描述的逻辑和/或步骤,例如,可以被认为是用于实现逻辑功能的可执行指令的定序列表,可以具体实现在任何计算机可读介质中,以供指令执行系统、装置或设备(如基于计算机的系统、包括处理模块的系统或其他可以从指令执行系统、装置或设备取指令并执行指令的系统)使用,或结合这些指令执行系统、装置或设备而使用。就本说明书而言,“计算机可读介质”可以是任何可以包含、存储、通信、传播或传输程序以供指令执行系统、装置或设备或结合这些指令执行系统、装置或设备而使用的装置。计算机可读介质的更具体的示例(非穷尽性列表)包括以下:具有一个或多个布线的电连接部(电子装置),便携式计算机盘盒(磁装置),随机存取存储器(RAM),只读存储器(ROM),可擦除可编程只读存储器(EPROM或闪速存储器),光纤装置,以及便携式光盘只读存储器(CDROM)。另外,计算机可读介质甚至可以是可在其上打印所述程序的纸或其他合适的介质,因为可以例如通过对纸或其他介质进行光学扫描,接着进行编辑、解译或必要时以其他合适方式进行处理来以电子方式获得所述程序,然后将其存储在计算机存储器中。

[0252] 应当理解,本发明的实施方式的各部分可以用硬件、软件、固件或它们的组合来实现。在上述实施方式中,多个步骤或方法可以用存储在存储器中且由合适的指令执行系统执行的软件或固件来实现。例如,如果用硬件来实现,和在另一实施方式中一样,可用本领域公知的下列技术中的任一项或他们的组合来实现:具有用于对数据信号实现逻辑功能的逻辑门电路的离散逻辑电路,具有合适的组合逻辑门电路的专用集成电路,可编程门阵列(PGA),现场可编程门阵列(FPGA)等。

[0253] 本技术领域的普通技术人员可以理解实现上述实施例方法携带的全部或部分步骤是可以通过程序来指令相关的硬件完成,所述的程序可以存储于一种计算机可读存储介质中,该程序在执行时,包括方法实施例的步骤之一或其组合。

[0254] 此外,在本发明的各个实施例中的各功能单元可以集成在一个处理模块中,也可以是各个单元单独物理存在,也可以两个或两个以上单元集成在一个模块中。上述集成的模块既可以采用硬件的形式实现,也可以采用软件功能模块的形式实现。所述集成的模块如果以软件功能模块的形式实现并作为独立的产品销售或使用,也可以存储在一个计算机可读存储介质中。

[0255] 上述提到的存储介质可以是只读存储器,磁盘或光盘等。

[0256] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施方式,可以理解的是,上述实施方式是示例性的,不能理解为对本发明的限制,本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施实施进行变化、修改、替换和变型。

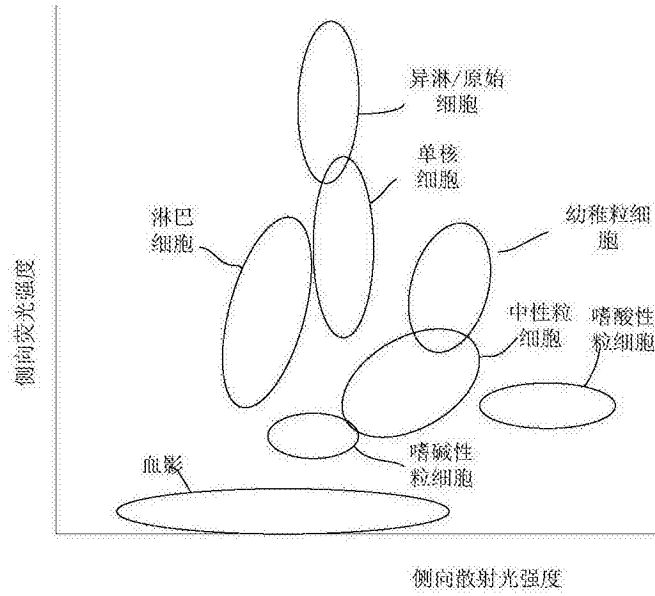


图1

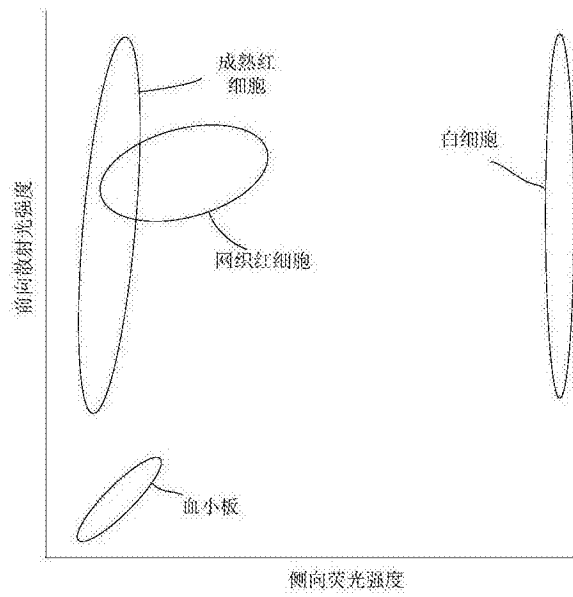


图2

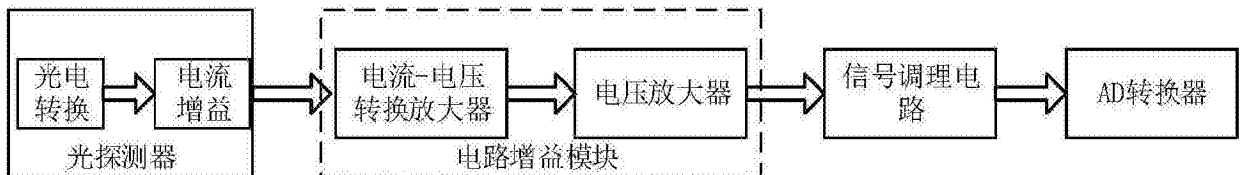


图3

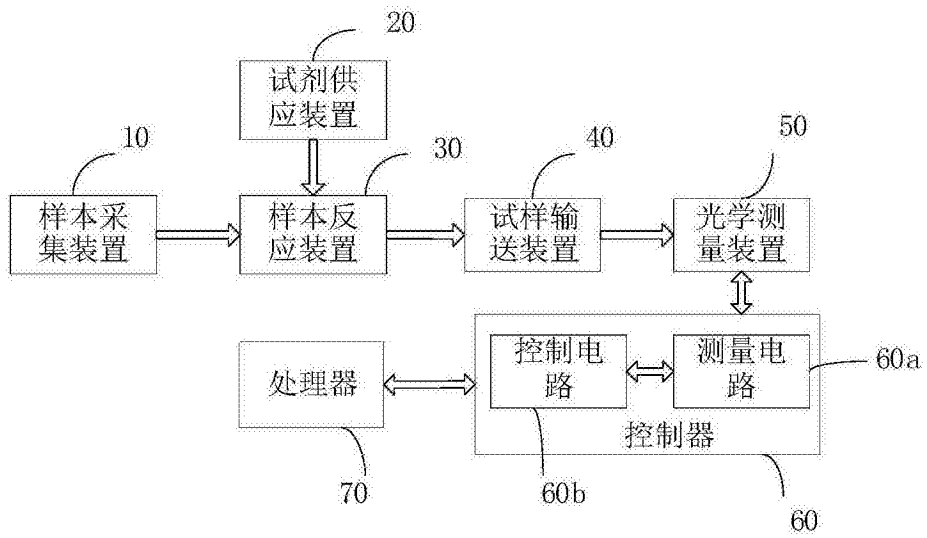


图4

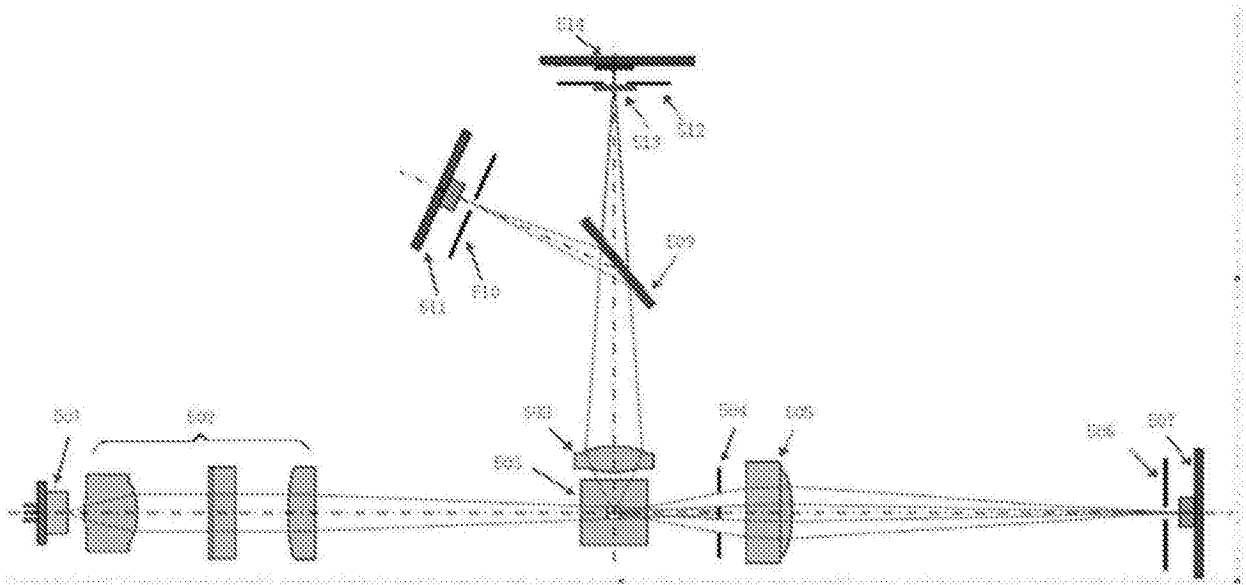


图5

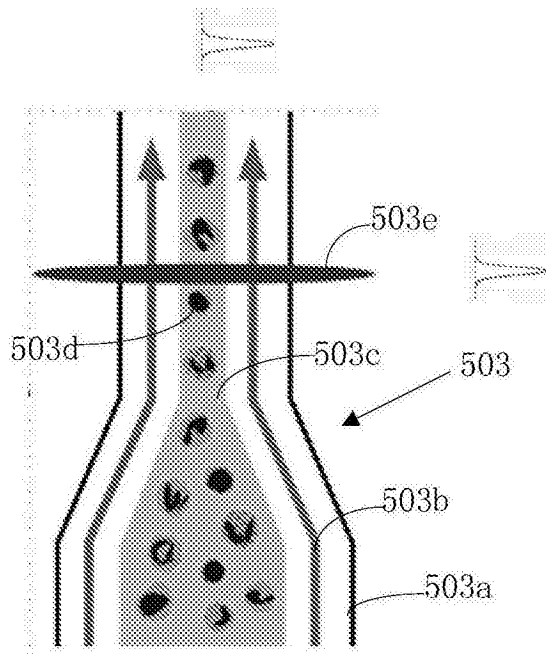


图6

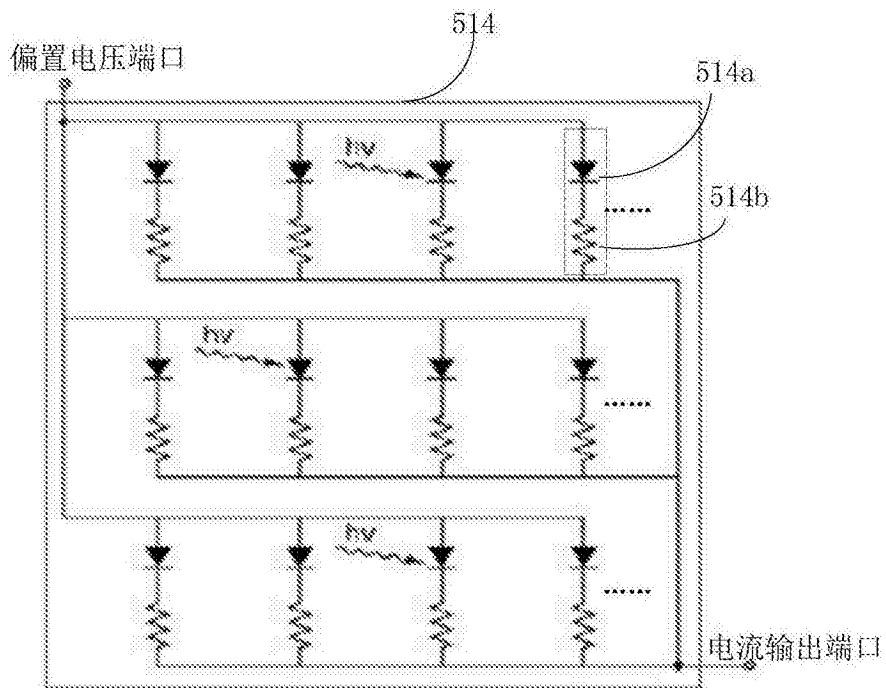


图7

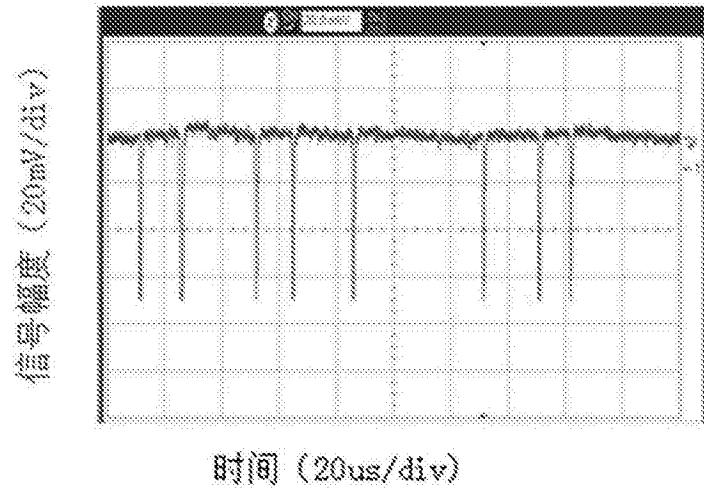


图8

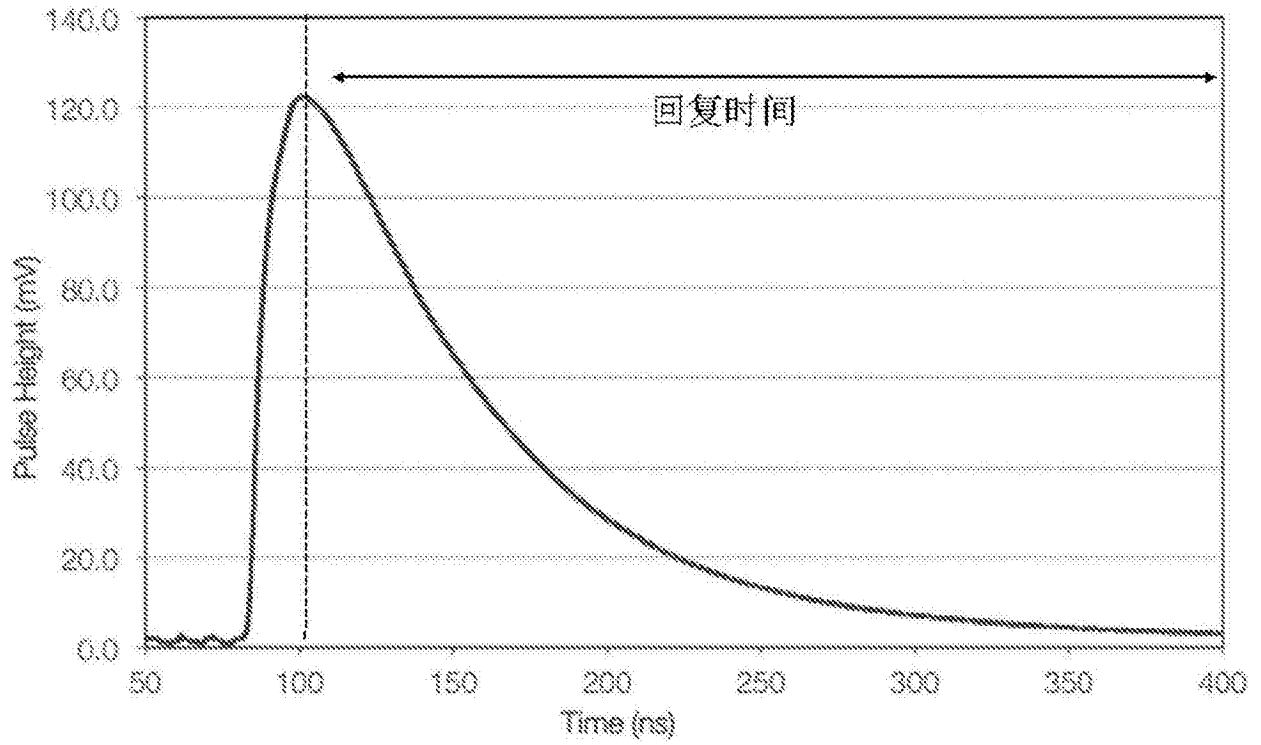


图9

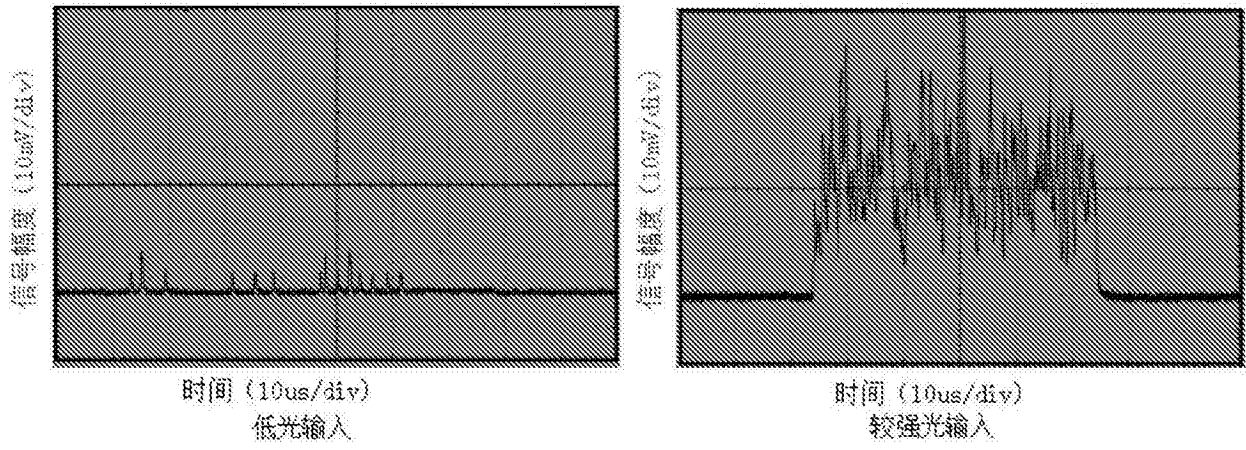


图10

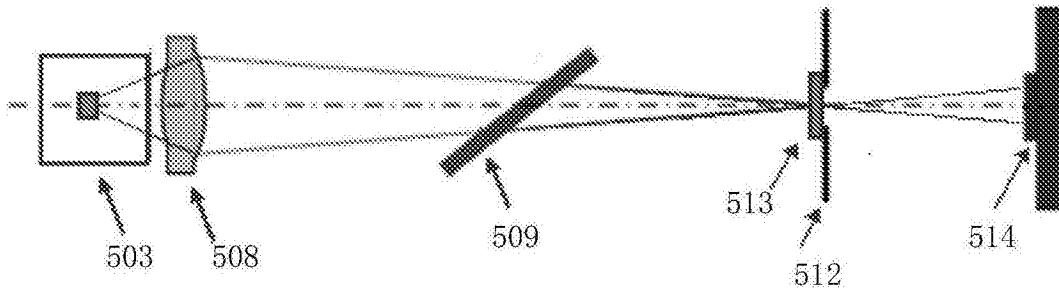


图11

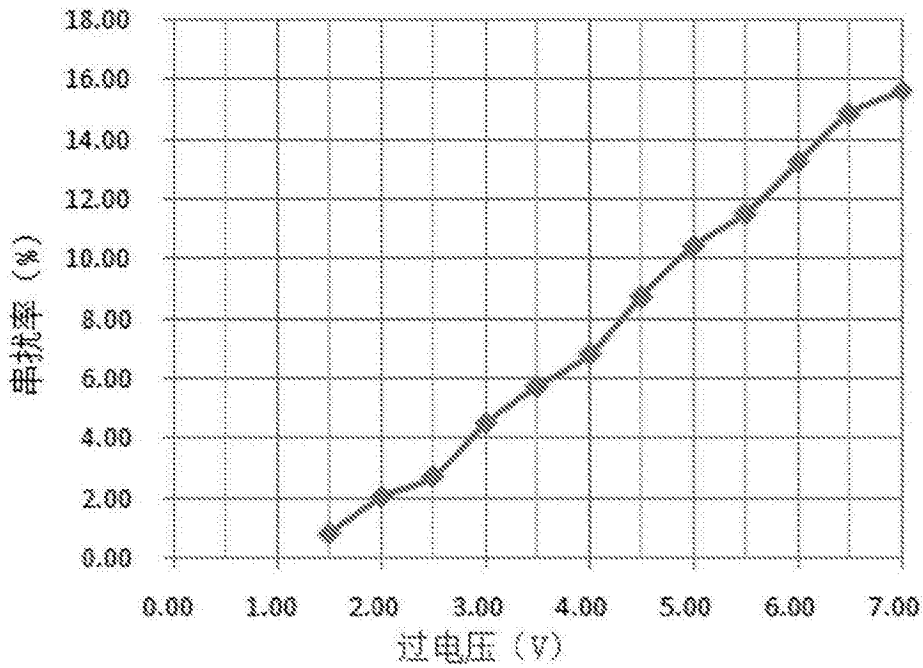


图12

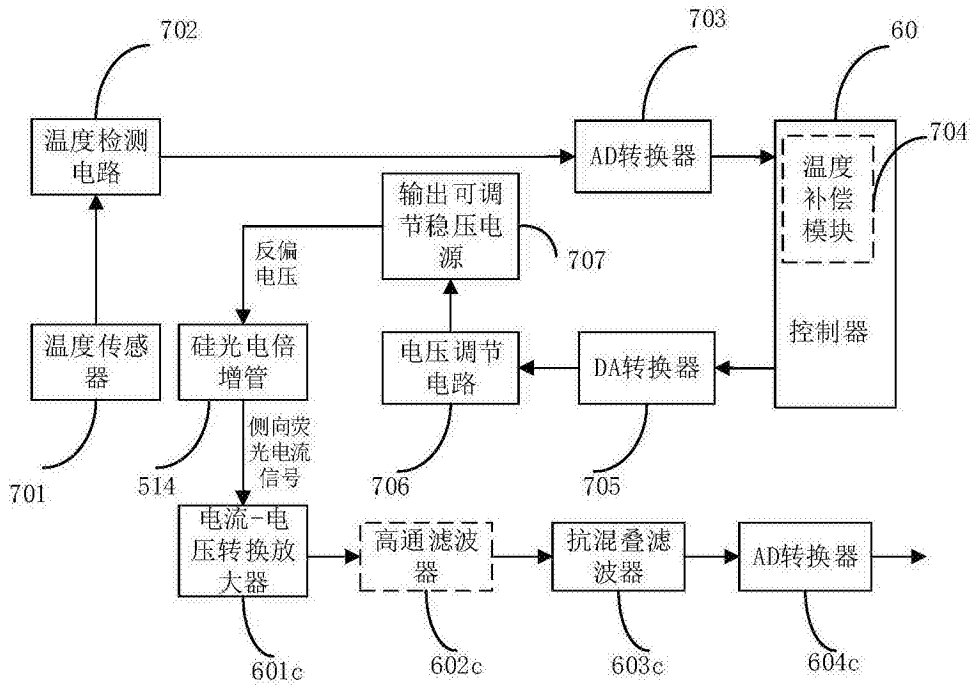


图13

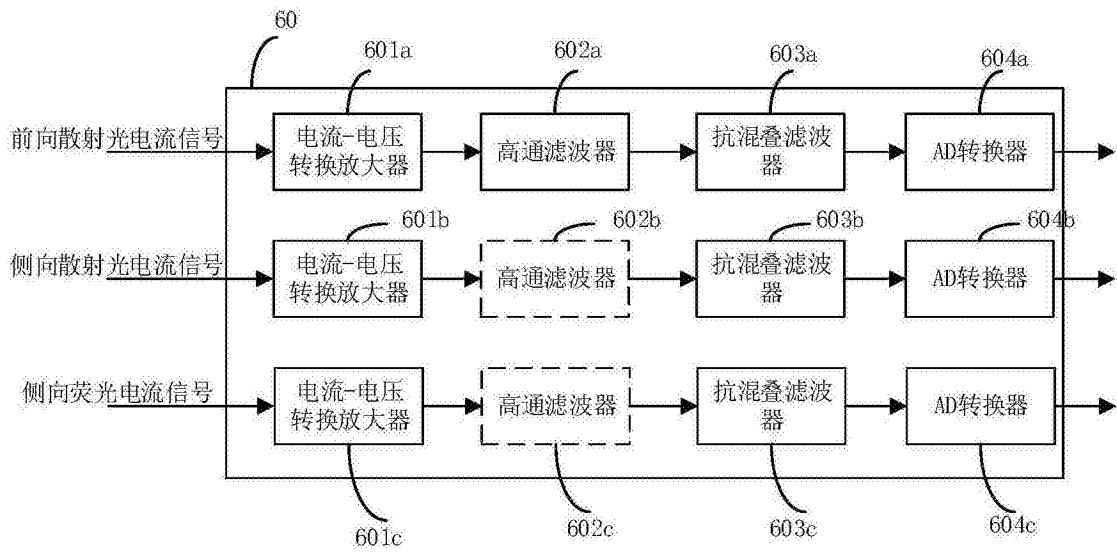


图14

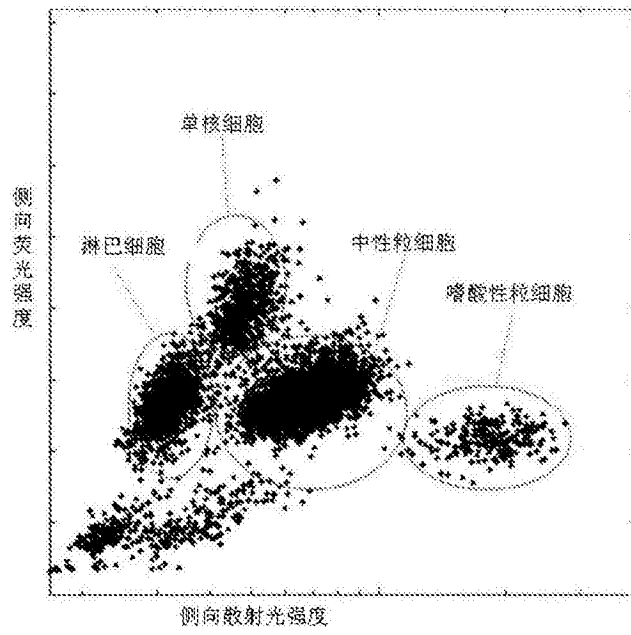


图15

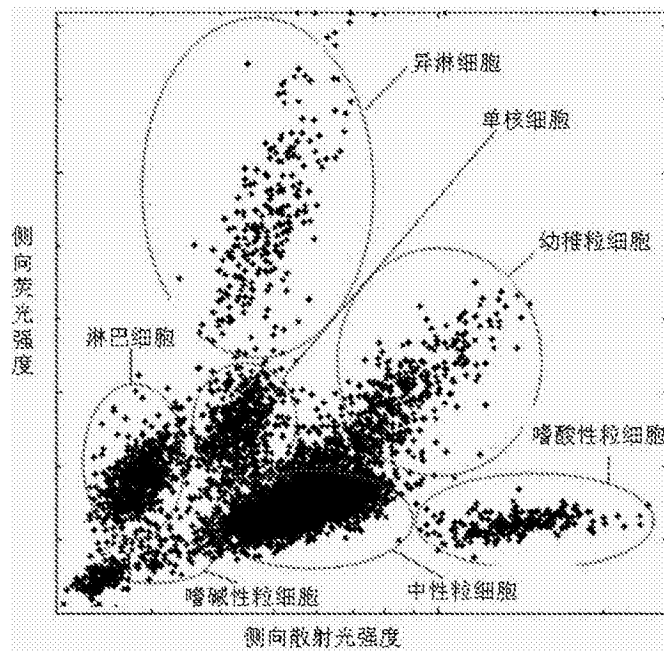


图16

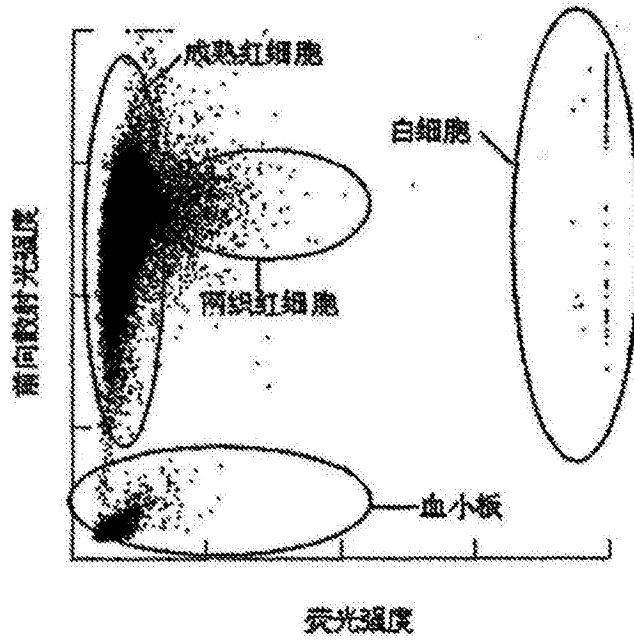


图17

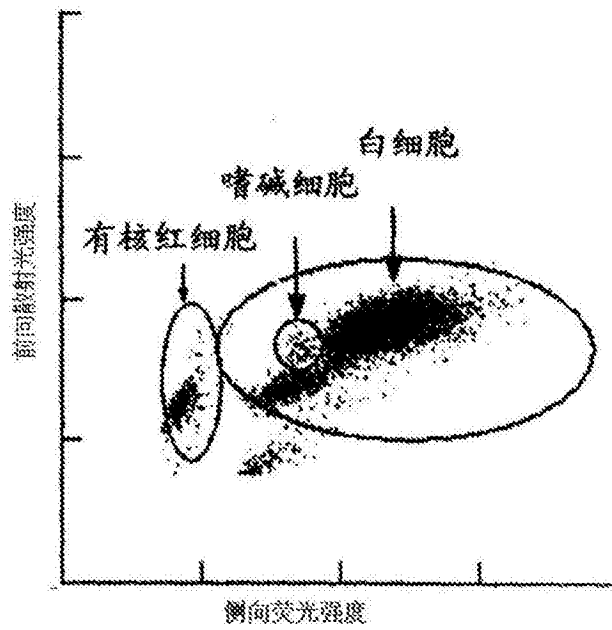


图18