



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101389747 B

(45) 授权公告日 2012. 10. 24

(21) 申请号 200680049247. 6

(22) 申请日 2006. 03. 22

(30) 优先权数据

B02005A000646 2005. 10. 26 IT

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 06. 26

(86) PCT申请的申请数据

PCT/IB2006/000636 2006. 03. 22

(87) PCT申请的公布数据

W02007/049103 EN 2007. 05. 03

(73) 专利权人 硅生物系统股份公司

地址 意大利博洛尼亚

(72) 发明人 尼科洛·马纳雷西 罗伯托·圭列拉

詹内伊·梅多罗

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

代理人 王波波

(51) Int. Cl.

C12M 1/34 (2006. 01)

C12M 1/42 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 2004191789 A1, 2004. 09. 30, 全文.

US 2002125138 A1, 2002. 09. 12, 全文.

US 2002070114 A1, 2002. 06. 13, 全文.

WO 0069565 A, 2000. 11. 23, 全文.

审查员 张彬

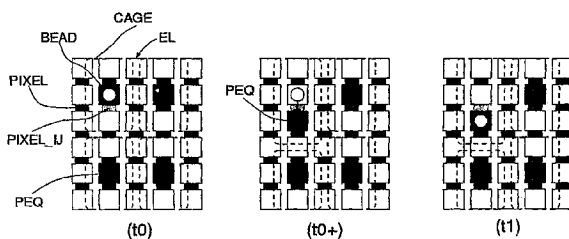
权利要求书 3 页 说明书 18 页 附图 13 页

(54) 发明名称

微粒特别是生物学微粒表征和计数的方法和装置

(57) 摘要

本发明涉及利用非均匀时变力场和集成光学或阻抗计传感器对微粒进行表征和 / 或计数的方法和装置。力场可以是正的或负的电介质电泳、电泳或电流体力学运动,其特征在于有关微粒(固态、液态或气态)的一组稳定平衡点;通过利用国际科学界称为电介质上电润湿的效应,同样的方法可适用于操纵小滴(液态微粒)。本发明的目的是对存在于样本中的每一微粒的位置起控制作用,以便:以确定性和统计学方法使这些微粒位移,以集成光学或阻抗计传感器检测它们的存在和 / 或表征它们的类型;以及以有效的方法对它们进行计数和操纵。



1. 一种检测微粒存在的方法,所述微粒可能存在于由电极的阵列产生的作用在所述微粒上的力场的稳定平衡点上,其特征在于所述方法包括以下步骤:

i. 使力场无效;

ii. 测量:在无效以后并被选择作为无效场中的微粒所经历的稳定和/或布朗运动的动态函数的至少一个时间间隔中,测量由与稳定平衡点有关的第一传感器和由与所述力场的当前配置下肯定不能被微粒占据的空间区域有关的第二传感器产生的灰度级;

iii. 重新激活力场;

iv. 重复若干次步骤 i 至 iii,与假定作为参考的所述第二传感器上所测量灰度级值的方差向其渐近值的收敛速度相当;

v. 将如下稳定平衡点分类为被微粒占据的点:在所考察的暂态系列测量中,与该稳定平衡点有关的第一传感器上所检测灰度级值的标准偏差结果大于预定阈值。

2. 一种检测微粒存在的方法,所述微粒可能存在于由电极的阵列产生的作用在所述微粒上的力场的稳定平衡点上,其特征在于所述方法包括以下步骤:

i. 在所述力场的第一当前配置下,测量由与所述稳定平衡点有关的第一传感器和由肯定不能被微粒占据的空间区域有关的参考传感器产生的灰度级;

ii. 改变力场,向其应用第二当前配置,其中所述稳定平衡点与第二传感器相对应位移,第二传感器不同于第一传感器。

iii. 在所述力场的所述第二当前配置下,测量由第二传感器和由肯定不能被微粒占据的空间区域有关的参考传感器产生的灰度级;

iv. 确定前面各点 i 和 iii 所检测灰度级值之间的差值;

v. 重复步骤 i 至 iv;

vi. 处理差分灰度级值,以区分被微粒占据的和未被微粒占据的稳定平衡点。

3. 根据权利要求 2 所述的方法,其特征在于所述处理包括以下步骤:确定灰度级差值的绝对值;以及将与如下传感器有关的平衡点分类为被占据的平衡点,所述传感器所检测变化大于在力场的所述第一和第二配置下不能被微粒占据的所述参考传感器的灰度级平均变化。

4. 一种检测微粒存在的方法,所述微粒可能存在于由电极的阵列产生的作用在所述微粒上的力场的稳定平衡点上,其特征在于所述方法包括以下步骤:

i. 改变力场,以使所述稳定平衡点位移而使得所述微粒的通过与有关的传感器相对应;

ii. 以高于所述微粒在新平衡位置上的稳定时间的频率,测量与所述不同稳定平衡点的通过有关的传感器所产生的灰度级;

iii. 通过由所述传感器所测量灰度级的暂态演变的至少一个特征参数的测量结果,区分微粒的存在或不存在。

5. 根据权利要求 4 所述的方法,其特征在于:所述传感器上灰度级量度的暂态演变的特征参数包括峰间幅度。

6. 根据权利要求 5 所述的方法,其特征在于:通过与阈值比较进行分类,所述阈值的确定是从在所考虑的力场配置下不能被微粒占据的参考传感器上的灰度级峰间量度出发,提高与所述参考传感器的所述峰间值标准偏差成比例的一个系数。

7. 根据权利要求 4 至 6 中任何一项所述的方法,其进一步包括对已检测到存在的微粒总数进行计数的步骤,其特征在于:所述计数步骤以基于统计的估算的方法进行如下:

i. 用传感器测量存在于由电极的阵列产生的力场中的稳定平衡点的数目,所述稳定平衡点不包含任何微粒;

ii. 微粒的计数由稳定平衡点数的对数和不包含任何微粒的稳定平衡点的测量数的对数的差,与稳定平衡点数的对数和稳定平衡点数减 1 的对数的差两者之比来确定。

8. 一种表征存在于由电极的阵列产生的作用在所述微粒上的力场的稳定平衡点上的微粒的方法,其特征在于包括以下步骤:

i. 改变力场,以使所述稳定平衡点位移而使得所述微粒的通过与有关的传感器相对应;

ii. 以高于所述微粒在新平衡位置上的稳定时间的频率,测量与包含微粒的不同稳定平衡点的通过有关的传感器所产生的灰度级;

iii. 处理灰度级量度的暂态演变的特征参数,以估计所述微粒的性质。

9. 根据权利要求 8 所述的方法,其特征在于:灰度级暂态演变的所述参数包括从下列参数组中选择的至少一个参数:

i. 力场的变化与灰度级的初始变化之间的延时;

ii. 灰度级的暂态变化的长度;

iii. 灰度级的正峰宽度;

iv. 灰度级的负峰宽度。

10. 一种对多种类型的微粒进行计数的方法,所述微粒存在于由电极的阵列产生的作用在所述微粒上的力场的稳定平衡点上,其特征在于所述方法执行如下步骤:

i. 改变力场,以使所述稳定平衡点位移而使得所述微粒的通过与有关的传感器相对应;

ii. 以高于微粒在新平衡位置上的稳定时间的频率,测量与包含微粒的不同稳定平衡点的通过有关的传感器可检测的灰度级;

iii. 处理与每一稳定平衡点有关的灰度级暂态演变的特征参数,用以检测有关的笼框是否空的、是否包含某类的一个微粒、或者是否包含更多个微粒;

iv. 用数值方法确定每一类型微粒计数的组合,所述组合较好地近似具有每一类型单个微粒的笼框和空笼框的测量值。

11. 根据权利要求 4、8 或 10 所述的方法,其特征在于:使所述稳定平衡点位移,使得所述微粒的通过与多个有关的传感器相对应;以及所述传感器是光学传感器并且被遮蔽,以便检测小于微粒尺寸的空间部分上的入射光功率。

12. 根据权利要求 4、8 或 10 所述的方法,其特征在于:对与包含微粒的所述稳定平衡点的移动有关的传感器可检测的灰度级变化过程进行控制,以便确定所述微粒在新平衡位置上的稳定暂态的结束,并从这一测量返回所述稳定平衡点的位移速度。

13. 根据权利要求 12 所述的方法,其特征在于:在所述稳定暂态结束时,产生所述力场的变化以引起所述稳定平衡点的新位移。

14. 根据权利要求 1 至 6、8 至 10 中任何一项所述的方法,其特征在于:所述传感器是光学传感器,并且所述灰度级对应于照射在传感器上的光功率。

15. 根据权利要求 1 至 6、8 至 10 中任何一项所述的方法,其特征在于:所述传感器是阻抗计传感器。

16. 根据权利要求 1 至 6、8 至 10 中的任何一项所述的方法,其特征在于:使用与所述力场的所述当前配置下肯定不能被微粒占据的空间区域有关的参考传感器的平均值检测归一化的值,对所述传感器所检测灰度级值进行补偿。

17. 根据权利要求 1 至 6、8 至 10 中的任何一项所述的方法,其特征在于:所述灰度级的测量在暂时使所述力场无效的期间内进行。

18. 一种用于检测和 / 或表征微粒的装置,包括:用于产生作用在所述微粒上的、由电极的阵列产生的稳定平衡点的装置;和与所述电极关联的光学传感器;其特征在于:所述光学传感器设置成对小于微粒尺寸的传感器部分上的入射光功率进行检测。

19. 根据权利要求 18 所述的装置,其特征在于包括:所述传感器的遮蔽装置;和开口,所述开口的数目为每一传感器至少一个,所述开口贯穿所述遮蔽装置而获得,并具有小于被检测 / 表征的微粒的预定尺寸。

20. 一种用于检测和 / 或表征微粒的装置,包括:用于产生作用在所述微粒上的、由电极的阵列产生的力场的稳定平衡点装置;和与所述电极关联的传感器,其特征在于:对于每一电极,第一传感器用来检测垂直方向上所述微粒的移动,第二传感器用来检测水平方向上所述微粒的移动。

21. 根据权利要求 18 至 20 中任何一项所述的装置,其特征在于包括至少一个具有预定通带的分色滤光器,以便至少部分地遮蔽作为光学传感器的所述传感器。

22. 根据权利要求 21 所述的装置,其特征在于包括:多个分色滤光器,各具有从一组不同通带中选择的通带,所述分色滤光器以非重叠方式安排,以便在任何情况下至少部分地遮蔽所述传感器。

23. 根据权利要求 21 所述的装置,其特征在于:所述至少一个分色滤光器被安排用来覆盖所述电极,并装备有与每一所述电极至少一部分相对应地设置的阻断开口。

24. 根据权利要求 21 所述的装置,其特征在于包括与覆盖物相对应地安排至少一个具有预定通带的分色滤光器,所述覆盖物和所述电极的阵列一起限定小室或微室,适用于接收和容纳包含所述微粒的液体样本。

微粒特别是生物学微粒表征和计数的方法和装置

技术领域

[0001] 本发明涉及微粒表征和计数的方法和装置,本发明寻求实现单个细胞的生物学协议 (biological protocols) 的应用。

背景技术

[0002] G. Medoro 所有的 PCT/WO 00/69565 专利申请描述了通过利用封闭的电介质电泳势阱 (dielectrophoretic potential cages) 对微粒进行操作和检测的装置和方法。所述方法教导在两维空间中如何控制独立于所有其他微粒的每一微粒。用来捕获悬浮微粒的力是负的电介质电泳。通过与集成在同一衬底中的电极阵列和传感器的每一元件有关的存储器元件和电路的编程,产生对操纵操作的单独控制。但是,受传感器特性分散约束的固有空间“噪声”(技术上称为“固定型噪声 (Fixed-Pattern-Noise)”)严重地限制细胞检测中传感器本身的可靠性。该专利报告使用光学和/或阻抗计传感器。即使通过扣除参考图像对传感器的增益差别进行补偿,但结果还是不完全可靠,因为其他的因素例如照射的空间差别(对于光学传感器)或液体的导电性(对阻抗计传感器),不能得到补偿。

[0003] 专利 US 6294063 (Becker 等人) 披露了一种方法和装置,其通过可编程的力的分配来操纵固态、液态或气态生物学材料的包裹 (packages)。该专利也提及传感器的使用。但是,在那种情况下也还是存在固定型噪声问题。

[0004] 另一操纵液态微粒(小滴)的已知方法是电介质上电润湿 (EWOD), 描述于 T. B. Jones, Journal of Micromechanics and Microengineering, 15 (2005) 1184-1187 中。在那种情况下,提供在衬底上的电极施加的电场,使被气态包围的小滴能在受激电极序列所控制的方向上向前推进。基于这种原理的装置能做成包含一个帽盖(也可用电介质覆盖),如 Pamula 等人的专利申请 US 2004/0058450 A1 所教导的,或者简化为称为“链”的一条线,与衬底上面的小滴建立电接触。J. Berthier 等人, NSTI Nanotech2005, www.nsti.org, vol. 1, 2005。

[0005] 操纵微粒的又一种力是由电流体动力学 (EHD) 流产生的粘滞摩擦力,例如电热流 (ETF) 或 AC 电渗透。在 NG. Green, A. Ramos 和 H. Morgan, J. Phys. D :Appl. Phys. 33 (2000) 中, EHD 用来显示微粒。例如 PCT WO2004/071668 A1 描述一种利用上述电流体动力学流将微粒浓缩在某些电极上的装置。

[0006] 在“Impedance Spectroscopy Flow Cytometry :On-Chip Label-Free Cell Differentiation” (Cytometry Part A 65A :124-132 (2005), Cheung K, Gawad S, Renuad P) 中使用微粒芯片上集成的阻抗差分传感器来区分流动中的微粒。

[0007] 在“Near-Field Optical Sensors for Particle Shape Measurements” (IEEE Sensor Journal, vol. 3, No. 5, Oct. 2003, pp. 646-651) 中,描述一种基于集成传感器(光电二极管)阵列检测微粒形状的芯片。但是,微粒的移动是通过液体流动来操作的,这需要例如泵或其他模拟机械装置,因此不可能对被分析的微粒的位置进行精确的控制。

[0008] 在 Medoro 等人的意大利专利申请 B02005A000481 中,报告了一些用电极阵列操纵微粒的方法,以及检测它们的方法和装置,但是它有类似于已经陈述过的专利 PCT/WO 00/69565 的区分不同细胞的能力方面的限制。

[0009] 最后,在国际专利申请 NO. PCT/IT02/00524 中描述了一种方法,其中,第一生物学实体通过对第一生物学实体有粘合力的第二生物学实体来识别(反过来也是这样),那里,第一生物学实体被停止在至少部分可选择地激活和寻址的第一电极阵列所限定的表面上,朝向至少一个第二电极,与经过电介质电泳笼框移动的第二生物学实体接触;优选通过以第一频率辐射激励粘合于第二生物学实体的荧光团组,并经过集成在电极中的光学传感器以第二频率检测荧光发射,检测至少一部分第一和第二生物学实体之间的相互粘合作用(如果有的话)。因此,再次存在的问题是消除与光学检测有关系的“噪声”(“固定型噪声”)。

发明内容

[0010] 本发明的目的是提供一种进行任何类型微粒的表征和/或计数的方法和装置,它没有上述缺点,特别是能对获得的微粒进行精密操纵,同时对固定型噪声的不利影响实际上不敏感。

[0011] 特别是,本发明的目的是对存在于样本中的每一微粒的位置起控制作用,以便以确定性或统计学方法使这些微粒位移,以集成光学和/或阻抗计传感器检测它们的存在和/或表征它们的类型。

[0012] 在下面,术语单数的“微粒”或得数的“微粒”意指自然或人造的,微米或纳米实体,如细胞、亚细胞组分、病毒、脂质体、泡囊(niosomes)、微球(中心体)和纳米球,或更小的实体,如大分子、蛋白质、DNA、RNA 等等,以及悬浮介质中不可混合的液滴,例如水中油、油中水,或气体中的液滴(如空气中的水),或液体中的气泡(如水中的空气)。

[0013] 有时,将使用术语细胞,但除非另有说明,意思是作为检测和表征上述广义上的“微粒”的非限制性的示例。

[0014] 因此本发明涉及根据权利要求 1、3、5、9、11、20、22 的对上述微粒进行表征和/或计数的方法和装置。

[0015] 特别是利用非均匀、时变力场和集成光学传感器。力场可以是正的或负的电介质电泳、电泳或电流体动力学运动,其特征在于有关微粒(固体、液体或气体)的一组稳定平衡点;通过利用国际科学界称为电介质上电润湿的效应,同样的方法可适用于操纵小滴(液态微粒)。

[0016] 由此可见,现有技术的限制可通过本发明予以克服。

[0017] 根据本发明的方法的实现,对照射光的空间差别和固定型噪声是不敏感的。此外,本发明能精确地表征和区分在装置中被操纵的微粒,而不需要使用泵或者另外产生液流,这些会引起被分析微粒不大确定的定位。

[0018] 最后,与利用流动使微粒移动的方法相反,通过利用受控力场使微粒相对于传感器移动,能得到更大量的信息,包括例如顺应力场的微粒运动速度。因此能得到表征微粒的附加信息源。这个信息能有利地用于区分微粒的不同类型。

[0019] 本发明的其他特点和优点,从下面参考附图对非限制性的本发明实施例的描述

中,将看得很明显。

附图说明

- [0020] 图 1 示出通过电极阵列产生力场的原理。
- [0021] 图 2 示出基于图 4 和 9 的笼框位移检测和表征方法的有关波形。
- [0022] 图 3 示出 (a) 聚苯乙烯球、(b) K562 细胞、(c) 红细胞的微观图像。
- [0023] 图 4 示出尺寸小于电极的微粒的检测 / 表征步骤序列。
- [0024] 图 5 示出量级为 15-20 μm 大小的细胞或球体通过时所检测灰度值的典型暂态过程图,并指出某些可能的判别参数。
- [0025] 图 6 示出其笼框位移之后的 K562 细胞通过时所检测灰度值的暂态演变。
- [0026] 图 7 示出小细胞或微球通过时所检测灰度值的典型暂态过程图,并指出某些可能的判别参数。
- [0027] 图 8 示出分别在其笼框位移之后的 10 μm 、6 μm 和 3 μm 的聚苯乙烯球通过时所检测灰度值的暂态演变。
- [0028] 图 9 示出可用于尺寸大于一个电极但小于两个电极的微粒的检测 / 表征步骤序列。
- [0029] 图 10 示出可用于通过所有笼框的移动同时检测所有微粒的基本步骤序列。
- [0030] 图 11 示出执行图 10 的基本步骤序列可采集到的三个图像。
- [0031] 图 12 示出不需要移动笼框而同时检测所有微粒的基本步骤序列。
- [0032] 图 13 示出基于激活和无效图 12 的笼框的检测和表征方法的有关波形。
- [0033] 图 14 示出可用于检测 / 表征笼框中微粒的另一步骤序列。
- [0034] 图 15 示出用于微粒特征的高分辨率研究的装置总体结构。
- [0035] 图 16 示出用于在垂直和水平两个方向上实时确定微粒位移的装置总体结构。
- [0036] 图 17 示出某些不同照射和光学检测模式。
- [0037] 图 18 示出用于支持检测发荧光的细胞的专用装置的顶视图和截面图,带有集成在芯片表面上的发射滤光器。
- [0038] 图 19 示出用于支持检测发荧光的细胞的专用装置的顶视图和截面图,带有集成在芯片内层的发射滤光器。
- [0039] 图 20 示出用于支持检测发荧光的细胞的专用装置的顶视图和截面图,带有集成在芯片表面上的多个发射滤光器。
- [0040] 图 21 示出不同类型具体是三种不同类型微粒计数的几何图形表示。

具体实施方式

- [0041] 本发明的目的是提供一种用于操纵和 / 或检测微粒的方法和装置。
- [0042] 本发明的方法是基于使用非均匀力场 (F), 在其作用下单个微粒或微粒组 (BEADS) 被吸引而趋向稳定平衡位置 (CAGE) (图 1)。这种力场可以是例如负的 (NDEP) 或正的 (PDEP) 电介质电泳场 (DEP), 电泳场 (EF) 或电流体动力学 (EHD) 运动场或者还有电介质上电润湿 (EWOD)。
- [0043] 检测可涉及如下几个方面之一或它们的组合:

[0044] 1. 单个微粒的计数或量化；

[0045] 2. 识别和 / 或表征；

[0046] 3. 定位。

[0047] 就此而言,主要的开发是阻抗变化的测量和 / 或荧光透射、漫射或发射的光强度变化的测量。

[0048] 力的产生

[0049] 根据已知的技术有不同的方法通过提供在衬底上的电极 (EL) 的阵列产生移动微粒的力 (图 1)。通常使用覆盖物 (LID),它本身也可以是一个电极,它限定一个微室,其中通常在悬浮液中能发现微粒 (BEAD)。图 1 示出某些不同的力图。在电介质电泳 (DED) 的情况下,所加电压以正号 (+) 标示的是同相周期电压 (V_{phip}),以负号 (-) 标示的是反相周期电压 (V_{phin})。反相电压意味着电压相位相差 180 度。这个场产生作用于微粒的力,吸引微粒趋向平衡点 (CAGE)。在负的 DEP (NDEP) 的情况下,根据已有技术如果覆盖物 (LID) 是导电的电极,可能产生封闭的力笼框;在这种情况下,稳定平衡点 (PEQ) 的提供和每一与 $V_{\text{phin}}(-)$ 相连的电极对应,如果相邻电极与反相的 $V_{\text{phip}}(+)$ 相连并且覆盖物 (LID) 与同相的 $V_{\text{phin}}(-)$ 相连的话,这个平衡点 (CAGE) 通常在液体中与电极隔离,因此,在稳定状态下微粒 (BEAD) 浮起。在正的 DEP (PDEP) 的情况下,平衡点 (CAGE) 通常被发现与提供有电极的表面相对应,并且在稳定状态下微粒 (BEAD) 与电极接触。关于 PDEP,在覆盖物中其他电极的存在是不必要的,因为 PDEP 的平衡点相应于电场的极大值。电极阵列可用于电泳以吸引带电微粒趋向相反极性的电极。关于电流体动力学 (EHD) 运动,电极的配置产生某些流动,它们驱动微粒趋向最小流动的点。关于 EWOD,一般使用包含介电外层的电极覆盖物 (LID),并且在微粒 (通常为空气中的液体小滴) 必须被吸引的一些点,以相对于覆盖物的反相信号对电极阵列进行激励。相反,其上不应存在微粒的电极则仍悬浮。关于 EWOD,在操纵空气中的小滴期间,上述电极阵列、一系列金属线能替换地用作覆盖物。

[0050] 在下面,为了简便起见,仅考虑通过本发明目的的非限制性示例,使用封闭的负的电介质电泳笼框作为执行力来描述本发明的方法和装置 (为此就得使用起电极作用的帽盖)。对于本领域的普通技术人员来说,如何推广下述使用不同的执行力和不同类型的微粒的方法和装置,是明显的。

[0051] 所使用的传感器

[0052] 始终为简化起见,下面仅参考使用光学传感器的情况,这些传感器使能检测与电极集成的光电二极管上的入射光功率。对于本领域的普通技术人员来说,在不同的情况下如何推广下述方法和装置包括可替换或组合地使用集成的阻抗计传感器,是明显的。

[0053] 下面,为简便起见,术语“灰度级”也将用作“从集成传感器来的出射信号”的同义语。这个信号本身也许正比于“入射光功率”(在光学传感器例如光电二极管上),或者正比于所检测的电阻抗 (假如使用集成的阻抗计传感器)。

[0054] 使用光学传感器的方法

[0055] 在光学传感器的情况下,将涉及亮场 (或 BF) 型照射。在这种情况下,光线照射在传感器上。暗场 (或 DF) 照射的方法或基于荧光也是可以的,也在本发明的目的范围内,但为简便起见,它们将不列入下面论述的所有方法中,而仅在这里讨论。

[0056] 在图 17 中,示出一些使用光学传感器的方法。该图涉及带有集成在衬底 (SUB) 中

的光学传感器 (PIXEL) 的装置截面。在传感器与提供电极 (EL) 的不同金属化层之间的电介质,可简单地由氧化物 (OX) 层组成或也包括滤光层 (DFL),例如用薄膜分色镜技术实现。

[0057] 在亮场检测图 (图 17-BF) 中,光线 (LIGHT) 从覆盖物 (LID) 射入,由传感器测得的光功率实际上随微粒 (BEAD) 所引起的畸变和吸收情况而变化。

[0058] 在暗场检测图 (图 17-DF) 中,光线 (LIGHT) 以不直接到达传感器 (PIXEL) 的入射角经过覆盖物 (LID) 射入,由传感器检测到的光功率实际上随被直射光 (LIGHT) 或者随后电极的反射光 (RLIGHT) 照射的微粒 (BEAD) 所发出的漫辐射 (SLIGHT) 而变化。

[0059] 在亮场荧光检测的图 (图 17-BFF) 中,激励光 (EXLIGHT) 从覆盖物 (LID) 射入,由传感器测得的光功率基本上随微粒 (BEAD) 所发射的荧光 (EMLIGHT) 而变化。在这种情况下,为了使发射光 (EMLIGHT) 信号不被激励 (EXLIGHT) 功率压倒,使用下面的一种或多种技巧是可行的:

[0060] • 使用激励所发射的辐射波长的滤光层 (DEL);

[0061] • 使用的激励频率是光学传感器 (PIXEL) 对其有低的量子效率 (即对该波长相对不灵敏) 的频率。例如可以使用相当深的 p-n 结,以及使用波长在 UV 段中激励辐射,特别是波长低于 380nm 更好。

[0062] 在暗场荧光检测图 (图 17-DFF) 中,激励光 (EXLIGHT) 以不直接到达传感器 (PIXEL) 的入射角从覆盖物 (LID) 射入,并且传感器所检测光功率基本上随被直射光 (EXLIGHT) 或随后经电极反射的光 (RLIGHT) 照射的微粒 (BEAD) 所发射的荧光而变化。但为了使发射光 (EMLIGHT) 信号不被微粒的漫射光 (SLIGHT) 功率软化 (degrade),希望使用上述亮场荧光情况下的一种或多种技巧,以便改善系统的选择性。

[0063] 通过笼框的激活或无效来检测满笼框的方法

[0064] 图 12 示出根据本发明方法的一种可能的步骤序列,以便检测哪个笼框是满的 (至少关进一个微粒),哪个是空的,而不需要移动笼框本身。这种方法特别适合于电极的应用图形密集,不允许笼框位移的情况。此外,如果装置中不存在使笼框位移的电路时,这种方法也是有利的。

[0065] 这种方法是基于俘获 / 释放笼框 (CAGE) 中的微粒 (BEAD) 和进行感测这两个执行阶段的交替,其间用集成传感器 (PIXEL) 采集一个或多个图像。图 13 示出简略的波形。

[0066] 在笼框无效时,微粒因稳定而开始淤积,和 / 或由于布朗运动从它们被关进笼框时采取的平衡位置 (PEQ) 开始横向使它们本身位移 (图 12 右面部分 t_sense)。由于这些位移,在满笼框中所检测的灰度级变化,相对于与空笼框有关的传感器 (PIXEL) 上所产生的与读出电路和 / 或光学系统的噪声有关的灰度级变化而言,显著向较高的方向变化。

[0067] 空的或满的笼框的分类方法如下:

[0068] 1. 通过交替地操作笼框 (激活或使无效,时间为几秒至几分之一秒量级) 以及感测一幅或多幅图像 (时间为几分之一秒例如 100ms 至几十秒量级),采集 (感测) 一系列图像。

[0069] 2. 对于一系列图像 NIMG,就与 CAGE_IJ 有关的每一传感器 PIXEL_IJ,计算传感器上的非归一化灰度级标准偏差 (在这一特殊情况下正比于入射光功率),定义为

$$[0070] \quad \tilde{\sigma}_{ij-NIMG} = \sqrt{\sum_{k=1}^{NIMG} (PIXEL_IJ_k - M_IJ_{NIMG})^2}$$

[0071] 其中 $M_{IJ_NIMG} = \frac{1}{NIMG} \sum_{k=1}^{NIMG} PIXEL_IJ_k$ (系列图像 NIMG 中的 PIXEL_IJ 的灰度级平均值)。

[0072] 3. 计算空的参考传感器 (PIXEL_REF) 上的非归一化灰度级标准偏差的

[0073] 平均值: $M_{REF-NIMG} = \frac{1}{NREF} \sum_{r=1}^{NREF} \tilde{\sigma}_{r-NIMG}$ 和非归一化标准偏差的相对标准偏差:

$$[0074] \quad \sigma_{REF-NIMG} = \sqrt{\frac{1}{NREF} \sum_{r=1}^{NREF} (\tilde{\sigma}_{r-NIMG} - M_{REF-NIMG})^2}。$$

[0075] 4. 分类阈值定义为

[0076] $THR = M_{REF-NIMG} + \alpha \cdot \sigma_{REF-NIMG} + \Delta$ 典型值为 $\alpha = 1, \Delta = 0$ 。

[0077] 5. 笼框 IJ 被分类为满的根据是 $\tilde{\sigma}_{ij-NIMG} > THR$, 其余的笼框则被分类为空的, 因为 $\tilde{\sigma}_{ij-NIMG} \leq THR$ 。值得注意的是这种方法与固定型噪声 (受制于光电二极管特性的分散性的固定空间噪声) 无关, 因为所考虑的是相对于每一传感器平均值的信号功率, 不考虑这种平均值的绝对值。

[0078] 为得到高于 95% 的精度, 进行 $NIMG = 50$ 至 100 这样数目的测量 (也就是采集多幅图像) 一般是足够的。

[0079] 考虑使参考像素的标准偏差 (归一化)

$$[0080] \quad \sigma_{r-NIMG} = \sqrt{\frac{1}{NIMG} \sum_{k=1}^{NIMG} (PIXEL_r_k - M_r_{NIMG})^2}$$

[0081] 收敛而趋向它的渐近值所要求的图像数目, 可获得必须采集的图像的数目 NIMG 的动态测量。

[0082] 这个渐近值是常数, 如果忽略受制于轻微变化的噪声 $1/f$ (其中 f 是其中考虑了噪声的综合频率)。

[0083] 因此, 从更一般的意义上说, 上面仅具体参考使用光学传感器的情况所描述的方法, 使能检测微粒 (BEAD) 的存在, 这些微粒 (若有的话) 存在于作用在微粒 (例如细胞) 上的、由电极 (EL) 的阵列产生的任何力场 (F) (因此不仅是电介质电泳一种) 的稳定平衡点 (PEQ)。这种方法包括以下步骤:

[0084] i. 使力场 (F) 无效;

[0085] ii. 测量: 在无效以后并被选择作为无效场中的微粒所经历的稳定和 / 或布朗运动的动态函数的至少一个时间间隔中, 测量由与稳定平衡点 (PEQ) 有关的第一传感器 (PIXEL_IJ) 和由与所述力场 (F) 的当前配置下肯定不能被微粒占据的空间区域有关的第二传感器 (PIXEL_REF) 产生的灰度级;

[0086] iii. 重新激活力场 (F);

[0087] iv. 重复若干次步骤 i) 至 iii), 基本上与假定作为参考的第二传感器 (PIXEL_REF) 所检测灰度级值的方差向其渐近值的收敛速度相当;

[0088] v. 将这样的平衡点分类为被微粒占据的点, 如果在所考察的暂态系列测量中, 与这个稳定平衡点 (PEQ) 有关的传感器上所检测灰度级值的标准偏差结果大于预定阈值 (THR) 的话。

[0089] 通过笼框的移动和灰度级静态值差值的测量来检测满笼框的方法

[0090] 图 10 示出根据本发明通过移动笼框并分析灰度级静态值的方法的系列操作步骤。

[0091] 1. 在第一瞬间 (t_0), 笼框 (CAGE) 将微粒 (BEAD) 放置在各组初始的光学传感器 (PIXEL_STA) 上。采集具有与所述配置相对应的灰度级的图像。

[0092] 2. 在下一瞬间 (t_1), 一旦与笼框移动有关的暂态过程耗尽, 微粒本身以与最终的光学传感器 (PIXEL_TGT) 相对应的方式排列。采集与这种配置相应的带有灰度级的新图像。

[0093] 3. 确定与点 1 和 2 的图像有关的灰度级的差图像。

[0094] 4. 确定差图像的绝对值。

[0095] 5. 确定与每一笼框的开始和最终位置有关的像素对 (PIXEL_STA, PIXEL_TGT) 合成的灰度级。

[0096] 6. 从步骤 1 至 4 重复 NDIFF 次, 并累计与步骤 5 所确定的绝对变化有关的每一笼框的灰度级。

[0097] 7. 类似于上述关于笼框的激活 / 无效的分类方法, 确定分类阈值 THR, 这时, 对所有 NDIFF 次采集到的差图像, 考察与某些肯定是空的传感器 (PIXEL) (例如, 笼框行之间的像素) 相应的差值绝对值的平均值和标准偏差。

[0098] 从更一般的意义上说, 关于微粒 (BEAD) (若有的话) 存在于由电极 (EL) 的阵列产生的作用在所述微粒上的力场 (F) 的稳定平衡点 (PEQ) 上的检测, 采用下列步骤进行:

[0099] i) 首先, 在力场 (F) 的这个第一当前配置下, 测量由与稳定平衡点 (PEQ) 有关的第一传感器 (PIXEL_STA) 和由与肯定不能被微粒占据的空间区域有关的参考传感器 (PIXEL_REF) 产生的灰度级;

[0100] ii) 接着, 改变力场 (F), 从而向其应用第二当前配置, 其中稳定平衡点与第二传感器 (PIXEL_TGT) 相对应地位移, 第二传感器不同于第一传感器。

[0101] iii) 然后, 在力场 (F) 的第二当前配置下, 测量由第二传感器 (PIXEL_TGT) 和由与肯定不能被微粒占据的空间区域有关的参考传感器 (PIXEL_REF) 产生的灰度级;

[0102] iv) 确定前面各点所检测灰度级之间的差值 (DIFF_IMG);

[0103] v) 重复步骤 i) 至 iv);

[0104] vi) 处理差分灰度级值, 以区分被微粒占据的和未被微粒占据的稳定平衡点 (PEQ)。

[0105] 这些处理包括以下步骤: vii) 确定灰度级差值的绝对值, 以及 viii) 将与如下传感器相关的平衡点分类为被占据的平衡点, 所述传感器所检测变化实际大于在力场 (F) 的第一和第二配置下不能被微粒占据的参考传感器的灰度级平均变化。

[0106] 这种基于图像差值绝对值的方法也不受固定型噪声的影响, 与用笼框的激活 / 无效的方法相同, 对照射的不均匀性相当不灵敏。

[0107] 关于第一种方法, 其缺点是要求使笼框位移的电路以及笼框之间的距离, 这个距离使它们的移动能以单义方式确定被关进笼框的细胞 (若有的话) 的位移。

[0108] 这种方法的优点之一是, 为得到一定的分类质量 (低的偶然误差), 通常只要几幅图像和较少的时间, 而用笼框激活 / 无效的方法则需要较多的图像和较多的时间。

[0109] 在图 11 中, 示出用单一步骤 (NDIFF = 1) 就能得到的结果。在图 11(a) 中, 给出

由光学显微镜可检测到的图像,在图 11(b)中,示出相应灰度值的映射(有固定型噪声补偿),相反,在图 11(c)中示出具有初始灰度值的图像和右移之后之间的差值的绝对值归一化图像。

[0110] 通过笼框的移动和灰度级动态值的测量来检测满笼框的方法

[0111] 图 2 示出通过笼框本身的位移,动态检测笼框中微粒存在的方法步骤的波形。

[0112] 一开始,进行笼框的位移但不等待微粒在它们的新平衡位置上稳定,同时检测光学传感器的信号变化,而包含在移动笼框中的细胞(微粒)正在所述传感器上运动。

[0113] 图 4 示出步骤序列,其包括笼框在 IJ 位置上的移动和稳定平衡点(PEQ)的位移,这个位移确定微粒(BEAD)在光学传感器(PIXEL_IJ)上的通过。

[0114] 如果微粒(BEAD)的尺寸大于电极的尺寸,传感器将测量变化但它达不到其上没有微粒的像素的基础值。在这种情况下,可采用稍有不同的图如图 9。这种情况通过测量尺寸比电极大的笼框边缘像素(PIXEL_IJ)上的灰度值,再现相应于电极尺寸为实际电极的双倍的情况。

[0115] 这种技术使能在一次感测中,通过检测细胞水平截面整体(如果光电二极管与细胞一样大并且细胞垂直移动)入射功率的有关灰度值,对细胞进行扫描。改变执行的占空

因数 $\frac{t_{act}}{t_{act} + t_{sense}}$, 能实现不同的扫描。

[0116] 这些操作使能基于笼框满时产生的发光度的峰和谷,检测微粒是否存在。通过处理传感器的信号,本领域的普通技术人员能够容易地检测到一系列参数(例如灰度值的峰间幅度),这些参数使能辨别空笼框和满笼框。

[0117] 因此,根据本发明方法的这种变型,通过执行下列步骤能检测实在的微粒(BEAD)(若有的话)在作用于其上的、由电极(EL)的阵列产生的力场(F)的稳定平衡点(PEQ)上的存在:

[0118] i. 改变力场(F),以使微粒(BEAD)与有关的传感器(PIXEL_IJ)相对应地通过而移动稳定平衡点(PEQ)。

[0119] ii. 以显著高于微粒在新平衡位置上的稳定时间的频率,测量与不同稳定平衡点(PEQ)的移动有关的传感器(PIXEL_IJ)所产生的灰度级。

[0120] iii. 通过对传感器所产生的灰度级量度暂态演变的特征参数的测量,例如在光学传感器情况下基于入射光功率,区分微粒存在或不存在。

[0121] 传感器所产生的灰度级即照射在传感器上的光功率的测量,显然能交替地执行激活作用在微粒上的力场和使其无效的步骤,而后测量入射功率从而得到灰度级;其优点是,能避免传感器读出时的执行电压之间的任何干扰,尽管在原则上这不是必然的,如果传感器基本上与执行电压的激励无关的话。

[0122] 光功率量度暂态演变的参数最好包括灰度级的峰间幅度,并且最好通过与阈值比较的方法进行分类,这个阈值的确定是从所考虑的力场(F)配置下不能被微粒占据的参考传感器上的光功率即灰度级峰间量度出发,提高与参考传感器的峰间值标准偏差成比例的一个系数。

[0123] 由此,由参考传感器上存在的环境照射所致的噪声 $1/f$ 也得以补偿。

[0124] 采用误差补偿的基于满笼框数目的细胞计数方法

[0125] 通过上述方法,能够确定满笼框的数目。本发明的目的也在于找出一种对笼框中的细胞进行计数的方法。由此,只要已知所考察的样本的体积,就能得到细胞的浓度。

[0126] 作为第一级近似,特别是如果每一笼框细胞平均数显著低于约 0.1 的话,满笼框的数目就会近似等于细胞的数目(在这种情况下,细胞数低估大约 5%)。根据本发明,对于较高的细胞平均数,每一笼框的细胞分布统计数据能被补偿,以便获得以较高精度接近芯片上的实际细胞数的计数。

[0127] 我们假定有下列前提条件:

[0128] 1. 细胞在每一体积单位内是均匀分布的;这个假说,在样本被注入空的微室的情况下一般是正确的。相反,如果样本被注入此前已充有缓冲液的微室,那末样本只能是局部均匀的,因为细胞浓度受样本的流动分布的约束而有所变化。

[0129] 2. 与每一笼框最大细胞数目有关的约束被忽略。

[0130] 这个假说,在细胞的总体积(一个细胞的平均体积乘以细胞的平均数)合理地小于笼框体积(意指每一笼框的引力盆(basin of attraction)的体积)时是正确的。

[0131] 在这些假说中,细胞的统计分布采用二项分布表示。我们定义如下:

[0132] $NCAGES$ = 芯片中(或所考察部分)的笼框数

[0133] $n = NCELLS$ = 芯片中(或所考察部分)的细胞数

[0134] 其中,用“芯片”表示由电极(EL)的阵列形成的组,它通常精密地与传感器 PIXEL 一起集成在单一的多层芯片中。

[0135] 那末,一个细胞属于任何笼框引力盆的概率是:

[0136] $p = 1/NCAGES$

[0137] 每一笼框有 k 个细胞的概率从下面的公式导出:

[0138]
$$P[k] = \binom{n}{k} \cdot p^k \cdot (1-p)^{n-k}$$

[0139] 其中
$$\binom{n}{k} = \frac{n!}{k!(n-k)!}$$

[0140] 是 n 个目标一次取 k 个的组合数(二项分布)。

[0141] 每一笼框细胞平均数(ACPC)是

[0142]
$$ACPC = \langle P[k] \rangle = p \cdot n = \frac{NCELLS}{NCAGES}$$

[0143] 因为在芯片上通常有许多笼框,所以每一笼框具有 1、2、... k 个细胞的概率乘以笼框数很接近于具有 1、2、... k 个细胞的实际笼框数。考虑到这一点并检测空和满笼框的总数,通过计算与检测值相应的满和空笼框的期望数,就能估算每一笼框的细胞平均数(ACPC)。

[0144] 空笼框的期望值计算为

[0145]
$$EC_{estimate} = NCAGES \cdot P[0] = NCAGES \cdot (1-p)^n = NCAGES \cdot \left(1 - \frac{1}{NCAGES}\right)^{NCELLS}$$

[0146] 以实际检测到的空笼框数代之便可得细胞的计数值,这个计数值能简单推算为

[0147]
$$NCELLS_{measure} = \frac{\log(NCAGES) - \log(EC_{measure})}{\log(NCAGES) - \log(NCAGES - 1)}$$

[0148] 因此能得到较好的细胞数目估算,并且计数结果的精度对于 ACPC 高于 1 的情况也是适用的,只要空和满笼框的数目是统计有效的;由此可见,事实上,它会减轻别的只对满笼框计数有关的低估细胞数目所导致的误差。很明显,空笼框的检测数目 (EC_{measure}) 应该大于零,并且低于或等于笼框的数目 NCAGES。

[0149] 下面的表格以数字示出有 6400 个笼框和不同细胞浓度的特定例子的情况。如能注意到的那样,计数误差急剧地减少,特别是对于每笼框细胞的平均浓度高的情况。实际上,所报告的值只不过是基于概率密度的值,但给出大量的笼框,概率估算能很好地接近可能的测量值。

[0150] 表 1

[0151]

NCAGES	6400	6400	6400	6400
NCELLS	640	3200	6400	12800
ACPC	0.10 0	0.50 0	1.00 0	2.00 0

[0152]

k	P[k]	笼框	细胞	P[k]	笼框	细胞	P[k]	笼框	细胞	P[k]	笼框	细胞
0	90,48%	5791	0	60,65%	3882	0	36,79%	2354	0	13,53%	866	0
1	9,05%	579	579	30,33%	1941	1941	36,79%	2355	2355	27,07%	1732	1732
2	0,45%	29	58	7,58%	485	970	18,40%	1177	2354	27,07%	1732	3464
3	0,02%	1	3	1,26%	81	243	6,13%	392	1176	18,05%	1155	3465
4	0,00%	0	0	0,16%	10	40	1,53%	98	392	9,02%	577	2308
5	0,00%	0	0	0,02%	1	5	0,31%	20	100	3,61%	231	1155
6	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,05%	3	18	1,20%	77	462
7	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,01%	0	0	0,34%	22	154
8	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,09%	5	40
9	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,02%	1	9
10	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0
11	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0
12	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0
13	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0

14	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0	0
15	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0,00%	0	0	0	0
总计数		609	640		2518	3199		4045	6395	5532	12789
误差		-4,84%	0,00%		-21,31%	-0,03%		-36,80%	0,08%	56,78%	-0,09%

[0153] 换句话说,根据这种方法,从对满和空笼框的计数,根据至止已描述过的方法中的任何一种,能得出实际存在于注入由电极(EL)的阵列和覆盖物(LID)限定的微室的样本中的微粒(例如细胞)总数的计数(若有的话);根据本发明在统计学基础上的估算方法,对

前面已经检测到总体存在的单个微粒进行计数的步骤如下：

[0154] a) 通过传感器测量存在于由电极 (EL) 的阵列产生的力场 (F) 中的稳定平衡点 (PEQ) 的数目 (EC_{measure}), 稳定平衡点, 此后也表示为“笼框”, 其不包含任何微粒 (BEAD)。

[0155] b) 微粒 (BEAD) 的计数 (NCELLS) 由稳定平衡点 (PEQ) 数 (NCAGES) 的对数和不包含任何微粒的稳定平衡点 (PEQ) 的测量数 (EC_{measure}) 的对数之间的差, 与稳定平衡点 (PEQ) 数 (NCAGES) 的对数和稳定平衡点 (PEQ) 数减 1 (NCAGES-1) 的对数之间的差两者之比来确定。

[0156] 通过笼框的移动和灰度级动态值的测量来表征笼框中的细胞的方法

[0157] 如图 3 所示, 因为球 (例如图 3(a))、某一类细胞 (例如 K562, 如图 3(b)) 或者另一类细胞 (例如红细胞, 如图 3(c)) 有不同的尺寸、形状、吸收率分布和折射指数, 所以使笼框在传感器上通过, 不仅能检测笼框是否为满, 而且根据本发明的另一个方面, 能表征所存在的微粒 (若有的话) 的类型。

[0158] 细胞 (以及某些类型的微球体) 呈现出光的畸变 (一种透镜效应), 它引起带有负峰的灰度级 (细胞的暗边缘) 和灰度级的正峰 (细胞集光处的较亮的中心) 的变化。

[0159] 灰度级的动态演变的约束参数如图 5 报告的一个重要的但不被限制的例子, 例如灰度级的负 (Gnp) 和正 (Gpp) 峰的幅值量度, 以及例如笼框的移动与初次灰度变化的检测之间的延时 (t_d) 或者变化的暂态长度, 能够用来获得附加信息和区分细胞的种类。

[0160] 公式：

[0161] 作为第一级近似, 位移速度正比于电介质电泳迁移率, 结果 $v \propto k \cdot R^2$ 。作为第一级近似, 灰度级的变化长度 $t_w = \frac{2R}{kR^2} \propto \frac{1}{R}$ 与微粒的半径成反比 (当 R 增加时它减小)。力场 (F) 的改变和灰度变化开始之间的时间延迟 t_d 作为第一级近似 (图 4 的情况, 单个电极上有一个细胞) 等于 $t_d = \frac{W_{EL} - R}{kR^2}$ (它也是随 R 的增加而减小)。

[0162] 图 6 示出 K562 细胞测量的实际过程。

[0163] 图 7 示出关于非透明球体或小细胞所预期的典型过程, 与上述“透镜”效应相比吸收率效应是主要的。

[0164] 图 8 示出在其笼框位移之后聚苯乙烯球通过 $10 \mu\text{m}$ 、 $6 \mu\text{m}$ 和 $3 \mu\text{m}$ 时所检测灰度值的暂态演变过程。

[0165] 通过提取合适的判别参数, 对于本领域的普通技术人员来说, 显然能确定类似于上述关于满和空笼框的分类的分类准则。

[0166] 特别是, 识别方法可包括提取微粒的判别特征, 以及使用基于中性网络、首次逼近 ks、阈值算法和 / 或主分量分析或它们的组合的算法。

[0167] 图 14 示出基于相同原理的一种可替换的技术, 这种技术采用使细胞在传感器上横向移动的方法, 能在细胞的水平截面以较高的分辨率对细胞进行扫描。事实上, 被考察的细胞“切片” (“Slice”) 具有较小的尺寸。根据细胞经过时的灰度值的导数, 能计算沿细胞水平截面的灰度值的正点值 (punctual value), 其水平分辨率等于采集期间的点数, 垂直分辨率等于电极之间的间隔 (距离)。

[0168] 基于上面的描述, 很明显, 本发明也能通过执行下面的步骤表征存在于由电极

(EL) 的阵列产生的作用在所述微粒上的力场 (F) 的稳定平衡点 (PEQ) 上的微粒 (BEAD) (即例如建立它们的物理特性), 所述步骤如下:

[0169] a. 改变力场 (F), 以使所述稳定平衡点 (PEQ) 位移而使得所述微粒 (BEAD) 的通过与有关传感器 (PIXEL_IJ) 相对应;

[0170] b. 以显著高于微粒在新平衡点上的稳定时间的频率, 测量可被传感器 (PIXEL_IJ) 检测的灰度级, 所述灰度级与包含微粒的不同稳定平衡点 (PEQ) 的移动有关;

[0171] c. 处理用于估计微粒性质的灰度级量度暂态演变的特征参数。

[0172] 总体上通常不受传感器可检测的背景“噪声”即固定型噪声的影响。

[0173] 在所述例子中, 使用的传感器是光学传感器, 灰度级的测量是对照射在传感器上的光功率的测量, 这种测量最好用下面的步骤交替进行:

[0174] i. 激活作用在微粒上的场;

[0175] ii. 使场无效并测量入射光功率;

[0176] 或者使用上述对笼框中微粒的存在进行动态检测的同样的优选系统。光功率量度的暂态演变参数包括基于上述内容的由下列参数组成的组中选择的至少一种参数:

[0177] i. 力场 (F) 的变化与光功率的初始变化之间的延时 (td);

[0178] ii. 光功率的暂态变化的长度 (tw);

[0179] iii. 光功率值的正峰幅度 (Gpp);

[0180] iv. 光功率值的负峰幅度 (Gnp)

[0181] 对非均质样本中不同种类的细胞进行计数的方法

[0182] 根据本发明, 通过对用于单一群体的细胞计数的分类研究法的组合, 可以对单个笼框中的颗粒的特征进行表征, 以确定具有非均质质型微粒的样本的成分。

[0183] 通常, 区分含有多于一个细胞的笼框中的微粒成分是不容易的。但是, 通过对上述作为一个笼框的内容表征而记录的动态灰度级进行处理, 判定该笼框是包含单一微粒还是包含多种微粒 (MC), 则是相当简单的。

[0184] 因为可以假定不同类型的微粒之间的分布是独立 (正交的), 所以通过组合在具有单个颗粒笼框中获得的每种类型的微粒的数目, 以及与空笼框 (EC) 和笼框笼框总数有关的信息, 可以采用数值方法确定不同群体的微粒数的估算。问题是对于各不相同的 NPT (这里 NPT = 微粒类型数) 使函数最简化。在图 21 中, 报告了 NPT = 3 的情况下的问题表示法。

[0185] 对于微粒 $t = 1, \dots, NPT$ 的每一类型, 一旦已假定若干微粒 (NCELLS) 存在, 代表单独存在于笼框中的 t 类型微粒 (略去其他类微粒) 的直至 NPT 维空间超立方体的体积事实上保持固定 (P_{t_1})。参考图 21 (a), 对于第一类微粒, 我们将得到单一笼框中的微粒 P_{1_1} , 多个笼框中的微粒 P_{1_M} 和没有 P_1 类微粒的笼框 P_{1_0} (所示体积的量度)。但是所检测得的单一笼框中的 t 类微粒数必须考虑其他类型的一个或多个微粒也可能出现在同一笼框中。因此, 如图 21 (d) 所示, 每一 t 类单个微粒的检测值 ($P_{t_1_MEAS}$) 对应于 t 类微粒的超立方体的体积 (P_{t_1}) 减去超立方体 P_{t_1} 和 P_{q_h} ($q \neq t, h > 0$) 之间相交的超立方体的体积, 它们包含不同类型的至少一个微粒。空笼框的超立方体的体积 (EC_MEAS) 随即可知。

[0186] 数值 $NCELLS_t, t = 1, \dots, NPT$ 的多元组 (tuple) 用数值方法计算, 借此, (统计) 期望值能较好地相应于实测得的具有每一 t 类单一微粒的笼框数 (P_{t_1}) 和空笼框数 (EC_MEAS)

MEAS)。

[0187] 基于刚才所述内容,很明显,本发明也能通过下面的步骤对存在于由电极 (EL) 的阵列产生的作用在所述微粒上的力场 (F) 的稳定平衡点 (PEQ) 上的多种类型 (NTP) 的微粒 (BEAD) 进行计数,步骤如下:

[0188] a. 改变力场 (F),以使所述稳定平衡点 (PEQ) 位移而使得所述微粒 (BEAD) 的通过与有关的传感器 (PIXEL_IJ) 相对应;

[0189] b. 以显著高于微粒在新平衡点上的稳定时间的频率,测量可被传感器 (PIXEL_IJ) 检测的灰度级,所述传感器与包含微粒的不同稳定平衡点 (PEQ) 的通过有关;

[0190] c. 处理与每一稳定平衡点 (PEQ) 有关的灰度级的暂态演变参数,用以检测有关的笼框是否空的,是否包含某类的一个微粒,或者是否包含更多个微粒;

[0191] d. 用数值方法确定每一类微粒计数 (NCELLSt) 的组合,它较好地近似带有每一类单个微粒 (Pt_1_MEAS) 的笼框和空笼框 (EC_MEAS) 的测量值。

[0192] 用于通过笼框的移动和灰度级动态值的测量高分辨率地表征笼框中的细胞的装置

[0193] 为了提高至此所述的动态检测方法的分辨率,根据本发明,能够以较高空间分辨率为特征,组合与光电二极管 (PIXEL_V1、...、PIXEL_VN) 关联的一系电极 (图 15),通过在不同的电极上连续地移动微粒,连续地分析微粒的不同截面。

[0194] 分辨率的极限决定于光刻分辨率的最小几何形状,并且不需要配置用于对电极 (PIXEL) 寻址的不同的晶体管,这会增加面积。例如,某些开口 (SLITS) 能通过光电二极管上安排金属化来实现,使光电二极管的敏感仅与同样的开口相对应。

[0195] 这样,进一步的步骤能在至此所述的所有方法中实现,其中所述稳定平衡点 (PEQ) 被位移,使所述微粒 (BEAD) 的通过与多个有关所述传感器 (PIXEL_IJ) 相对应;另外,其中传感器 (PIXEL_IJ) 是光学传感器并且被遮蔽 (通过前述的备有预定的和较小幅度的开口 SLITS 的金属化层),以使用传感器检测显著小于微粒和传感器本身尺寸的空间部分上的入射光功率。

[0196] 自动控制笼框的位移速度以操纵细胞的方法

[0197] 用自动控制笼框的位移速度来进行操纵的方法,可以基于上述对细胞的通过的检测。对于在芯片 (与电极的阵列一起) 上移动的具有细胞的笼框,可以监控灰度级的演变过程,并且可以检测到新的平衡点上的稳定瞬态的结束,从而立即开始沿路线进行后面的步骤。除了时间上的最佳化以外,通过动态地使它们适应不同瞬间不同微粒的速度,这种方法也使能证明每一细胞没有停留在堵塞状态。

[0198] 如果单个光学传感器在例如两个电极之间的垂直间隔 (距离) 中与每一电极联系,如图 4 中那样,这个方法就能利用 1×2 个电极宽度 (水平位置为 $1 \times$ 垂直位置为 2) 的笼框来执行。在水平位移中,事实上微粒本身以全速度定位在两个电极之间的传感器上,它的移动能通过监视与初始和 / 或最终平衡点对应的传感器进行跟随。这引起对笼框形状的约束,然而这能通过下述装置予以克服。

[0199] 自动控制笼框的位移速度以操纵细胞而不约束笼框尺寸的装置

[0200] 在图 16 中,示出具有用于在水平 (PIXEL_H) 和垂直 (PIXEL_V) 两个方向上的移动判定的传感器 (像素) 的装置图。这种装置有利于以闭合链控制实现对微粒的操纵,以整

体方式采用一种笼框位移速度进行。利用这种装置,可以采用 1×1 的笼框执行水平位移,因为在任何情况下,细胞 / 微粒在沿水平轴设置在两个电极之间的传感器 (PIXEL_H) 上通过。

[0201] ***

[0202] 采用下面描述的附加方法和装置,可实现上述微粒检测和表征的所有方法中都适用的步骤,这个步骤包括对与包含微粒的稳定平衡点 (PEQ) 的通过有关的传感器可检测的灰度级中的变化过程进行控制,以便确定新平衡位置上的微粒稳定瞬态的结束,并且从这个量度回到新稳定平衡点 (PEQ) 上的微粒 (BEAD) 的位移速度上来。在这个稳定瞬态结束时,由电极本身所产生的力场 (F) 的变化因此能自动地产生 (例如通过在另一类已知的电极阵列 EL (图 15) 的控制单元 CTRL 中执行的适当软件,其目的是使稳定平衡点 (PEQ) 沿预定所希望的路径 (图 15 中用箭头示出) 发生新的位移)。

[0203] 具有借助荧光检测和 / 或表征笼框中细胞的集成分色滤光器的装置

[0204] 关于荧光检测和 / 或表征细胞,这里报告根据本发明的某些优选实施装置。这些实现装置整合滤光器元件,它允许荧光发射通过,但能减轻激发。这些滤光器元件能与芯片所执行的下游处理步骤整合,如以具有恰当折射指数的材料沉积薄膜实现分色滤光器。滤光器效应能够减轻传感器 (PIXEL) 所检测的激发谱带内的光功率部分,因此降低了对传感器本身的动态范围的要求。

[0205] 在图 18 中,示出特别适用于检测和 / 或表征发荧光的细胞的装置图。允许相应发射频率通过的分色滤光器 (DEL),以本领域技术人员已知的技术被沉积在芯片上。在沉积之后,有时为了改善电极 (EL) 与液体之间的电接触,在分色滤光层上开一些与电极本身相应的窗口。这样,例如在电泳的情况下可使用甚高导电性的溶液,而没有与分色滤光器所构成的介电层有关的电压降。这个执行方案与标准的 CMOS 晶片制造是相容的,并且仅包括晶片的后处理。

[0206] 另一种方法,分色滤光器能在电极下面实现,如图 19 中所示。如果 CMOS 工艺能改变的话,这可能是很有用的。然而在不改变 CMOS 工艺的情况下,这个图也能以进行后处理的方法实现,尽管这个后处理更复杂,意味着应用滤光器、在 CMOS 顶部金属上作接触开口以及为实现电极 (EL) 而附加金属化。不管是在电极 (EL) 上面或下面,组建具有不同通带 (DEL1、DELN) 的空间组织的多重分色滤光器是有利的,如图 20 所示。这对于以不同发射频率区分和分别检测细胞 / 微粒的荧光是有用的。

[0207] 显然,通过检测细胞的位置,就能在不同的传感器上按顺序分析它们,例如存在不同的荧光团。根据本发明刚才描述的这个方面,本发明涉及如上所述检测和 / 或表征微粒的装置,但进一步包括传感器遮蔽装置和开口,这些开口在数目上每一传感器至少一个,穿过遮蔽装置而获得并且具有小于被检测 / 表征的微粒的预定尺寸。

[0208] 根据本发明的装置可进一步包括至少一个具有预定通带的分色滤光器,安排成至少部分地遮蔽传感器 (PIXEL) (如果这些是光学传感器的话),最好包括多个分色滤光器,每一个具有不同于其他的通带,它们之间的安排有重叠但至少部分地遮蔽传感器 (PIXEL)。如果至少一个分色滤光器被安排来覆盖电极 (EL),则装备有与每一电极的至少一部分相对应的阻断开口。

[0209] 对激发进行过滤

[0210] 装置可采用或不采用这样的实际操作,即就被分析的荧光团,对(外部)激发源进行过滤和最佳化。这一点采用未集成在装置上的滤光器很容易实现。此外,另一种方法是芯片的帽盖整合与下面的分色滤光器相应的激发过滤部分,按芯片的逐个像素变化或不变化。

[0211] 如果将激发过滤器集成在帽盖上,则必须在较宽的区域用均匀的分色滤光器来实现,以避免不同像素激发之间的串扰。这样,测试下的细胞必须覆盖较大的距离以便分析不同的荧光团。根据本发明的这个附加方面,至此所描述的装置可包括至少一个具有预定通带的,安排成与帽盖(LID)相对应的分色滤光器,所述帽盖与电极一起限定一个小室或微室,其适用于接收和容纳包含被检测/表征的微粒的液体样本。

[0212] 照射噪声的补偿方法

[0213] 在上述所有方法中,当使用光学传感器时,检测或表征微粒的信号依赖于照射功率。因此,这种类型的变化能引起被检测的光功率等级的某些变化,而它们与信号(微粒的存在和/或位置)没有关系。虽然这一般不是问题,但这些方法的性能(较高的精度、较快的速度),可以通过使用参考像素(无疑与空笼框相对应的像素,有关于它的光入射功率仅受照射功率的影响)的平均检测值的归一化值补偿上述变化,而得到改善。

[0214] 这主要对低频照射噪声来说是很确实的,因为噪声功率的谱密度(正比于 $1/f$)使得它的影响更多地产生。

[0215] 阻抗计传感器的噪声补偿方法

[0216] 在上述所有方法中,当使用阻抗计传感器时,检测和表征微粒的信号依赖于微粒的悬浮介质的导电性和介电常数,其依次依赖于例如温度、盐的浓度或者其他分子等等。因此,它们的变化能引起被检测的阻抗等级的变化,而它们与信号(微粒的存在和/或位置)没有关系。尽管这一般不是问题,但这些方法的性能(较高的精度、较快的速度),可以通过使用参考像素(无疑与空笼框相对应的像素,其阻抗仅受悬浮介质的导电性和介电常数的影响)的平均检测值的归一化值补偿上述变化,而得到改善。

[0217] ***

[0218] 在到止为止所描述的检测和表征的所有方法中,可以引入进一步的步骤,这就是使用与所考虑的力场(F)当前配置下肯定不能被微粒占据的空间区域有关的参考传感器(PIXEL_REF)的平均检测值的归一化值,补偿所述传感器(PIXEL_IJ)所检测的灰度级。

[0219] 关于应用的注释

[0220] 到这里为止,所述方法和装置是一般使用的,但还有多种应用,作为例子但不限制本发明,我们叙述一些最重要的应用:

[0221] • 分析血液样本;在芯片(使用例如封闭电介质电泳笼框)上引入样本,对红细胞计数,作为第一级近似,对所有被占据的笼框计数(事实上,别的细胞也可能存在,但其浓度对通常所要求的精度来说低到可以忽略)。

[0222] • Emochroma:表征血液中的细胞数目和类型;在这种情况下,采用对每一个存在的细胞进行精确表征的上述方法,将它分类为红细胞、血小板、淋巴细胞等等。

[0223] • 对存在于样本中的细菌计数;通过在芯片上(具有DEP封闭笼框)注入已知体积的样本,检测所有存在的细菌,如有必要也可检测类型,假如采用光学传感器所检测的它们的特征标记是可辨别的话。

[0224] • 从混合群体中分离 / 计数具有荧光标记的细胞。这类问题在研究和诊断学两方面广泛受到关注。

[0225] 例如,可以检测乳制品样本例如牛奶、酸奶、冰淇淋制品等等中的细菌。

[0226] 作为一个例子,可以检测鲜葡萄汁的发酵细菌(例如酿酒的应用)。

[0227] 作为又一个例子,可以检测存在于饮用水体中的细菌。

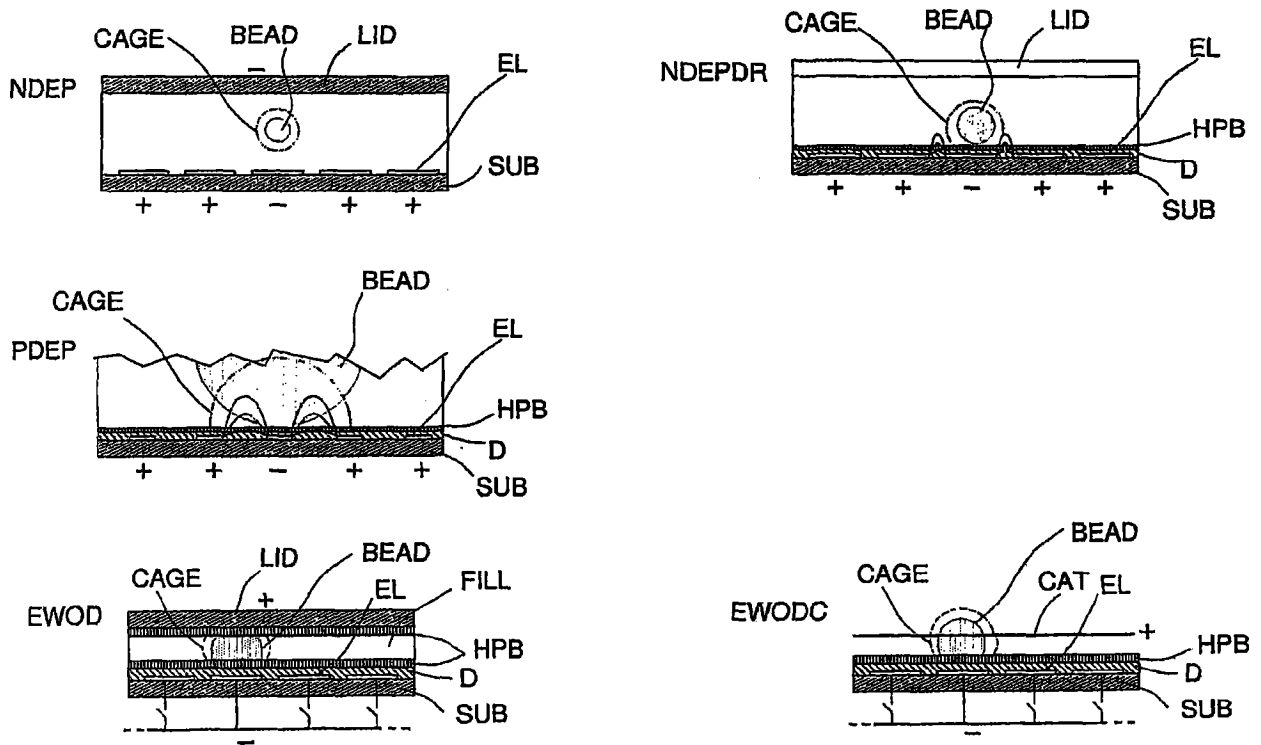


图 1

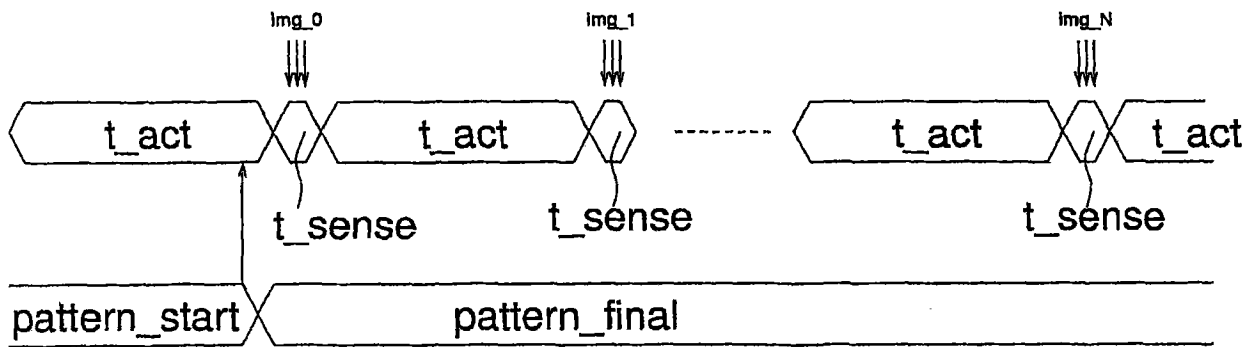


图 2

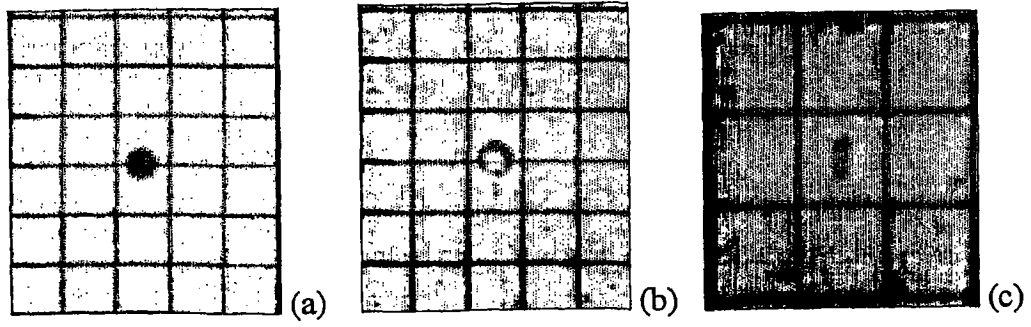


图 3

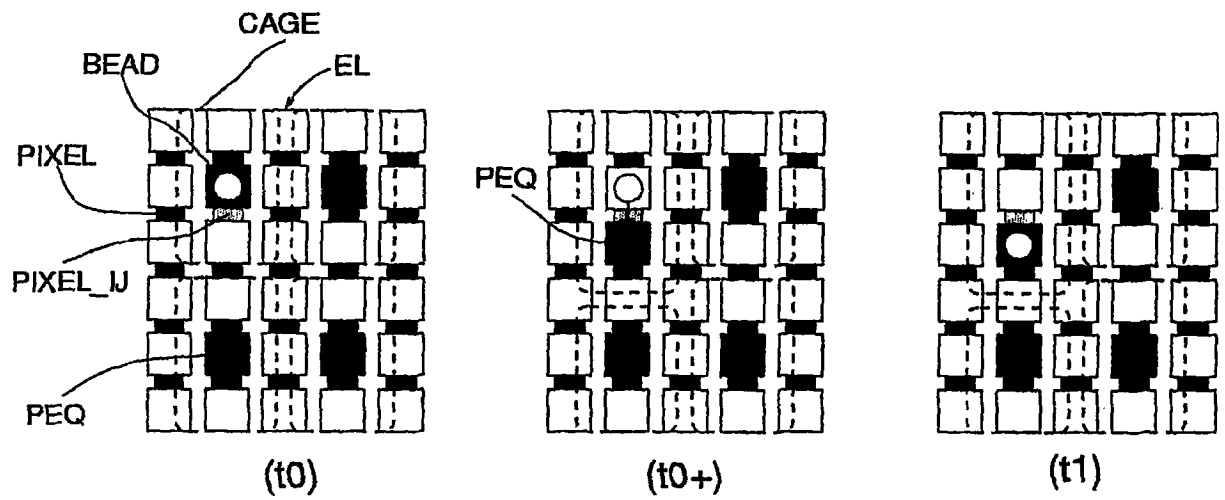


图 4

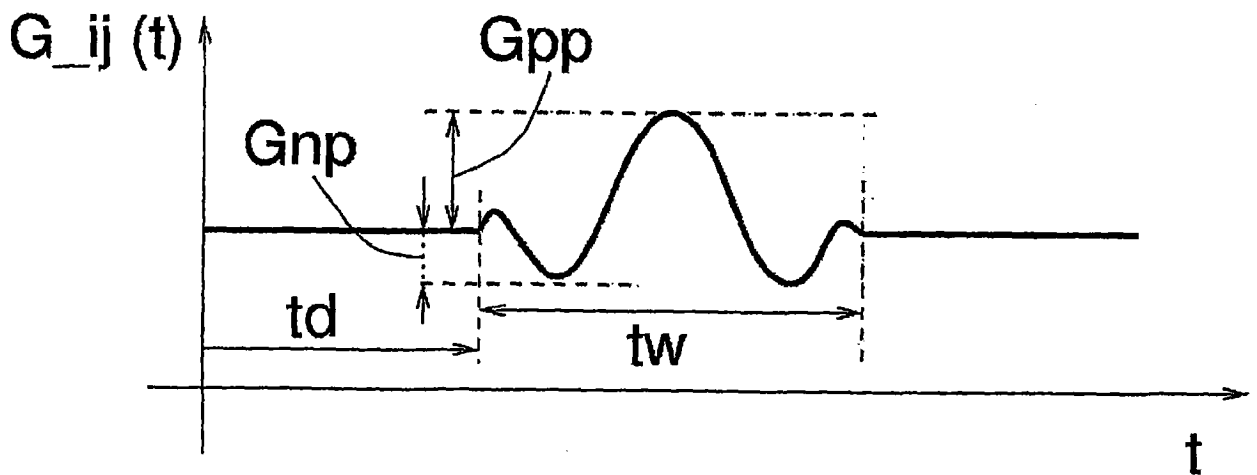


图 5

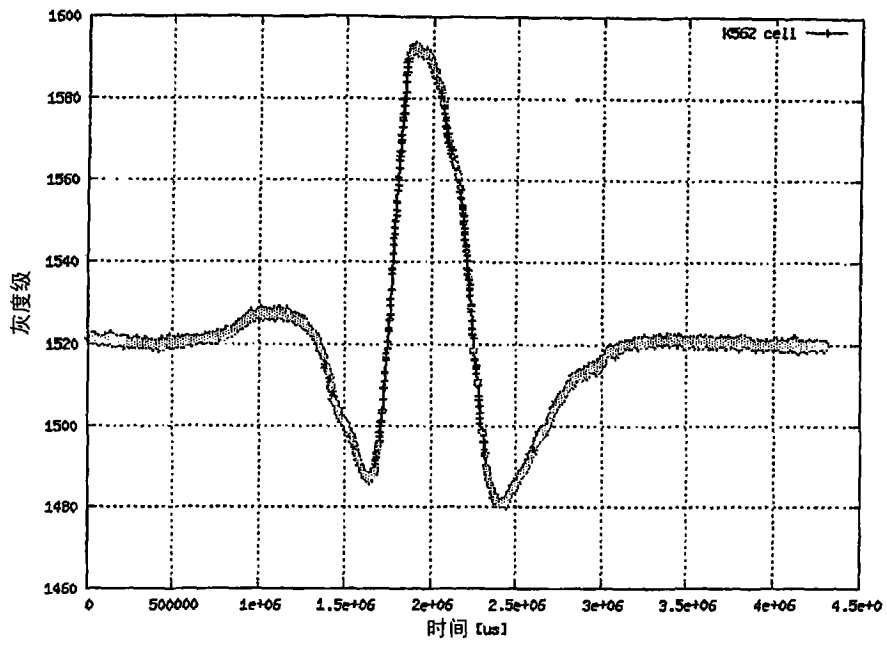


图 6

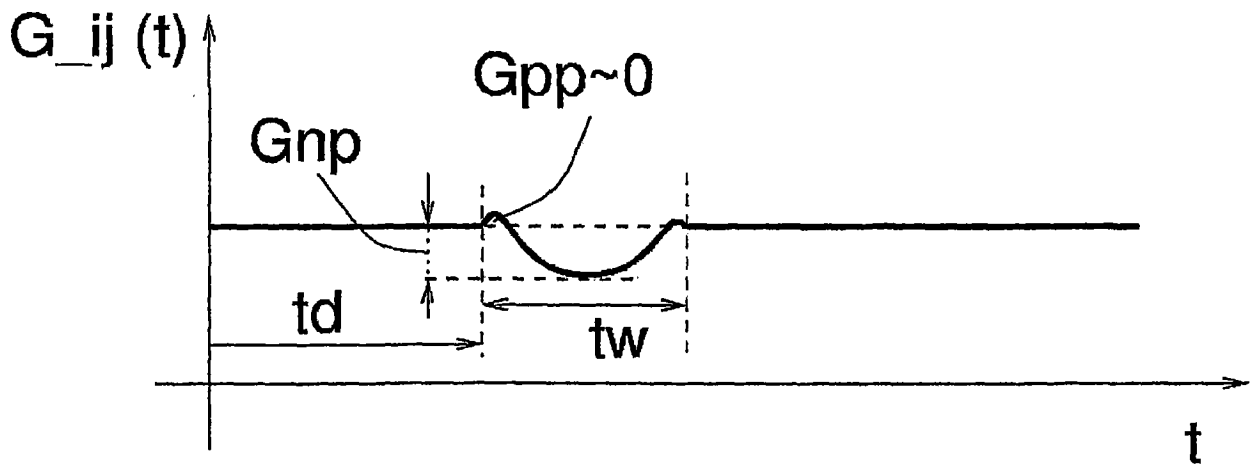


图 7

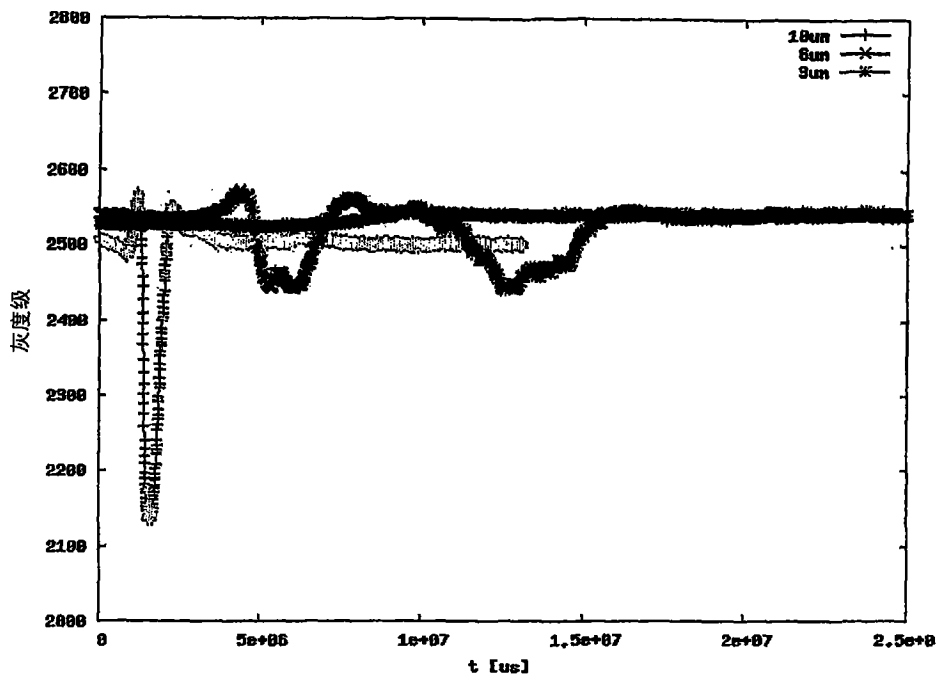


图 8

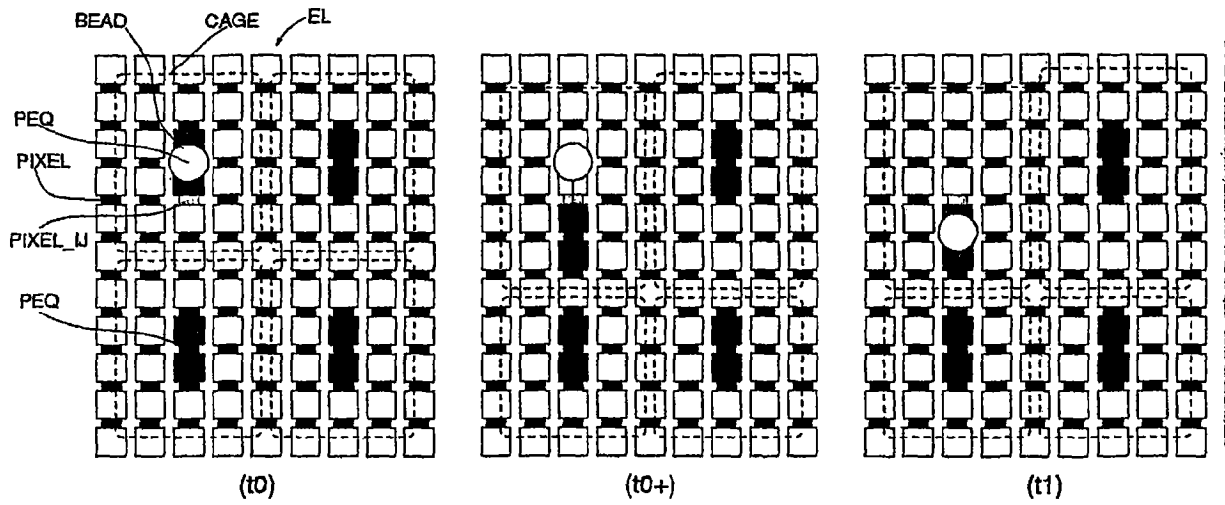


图 9

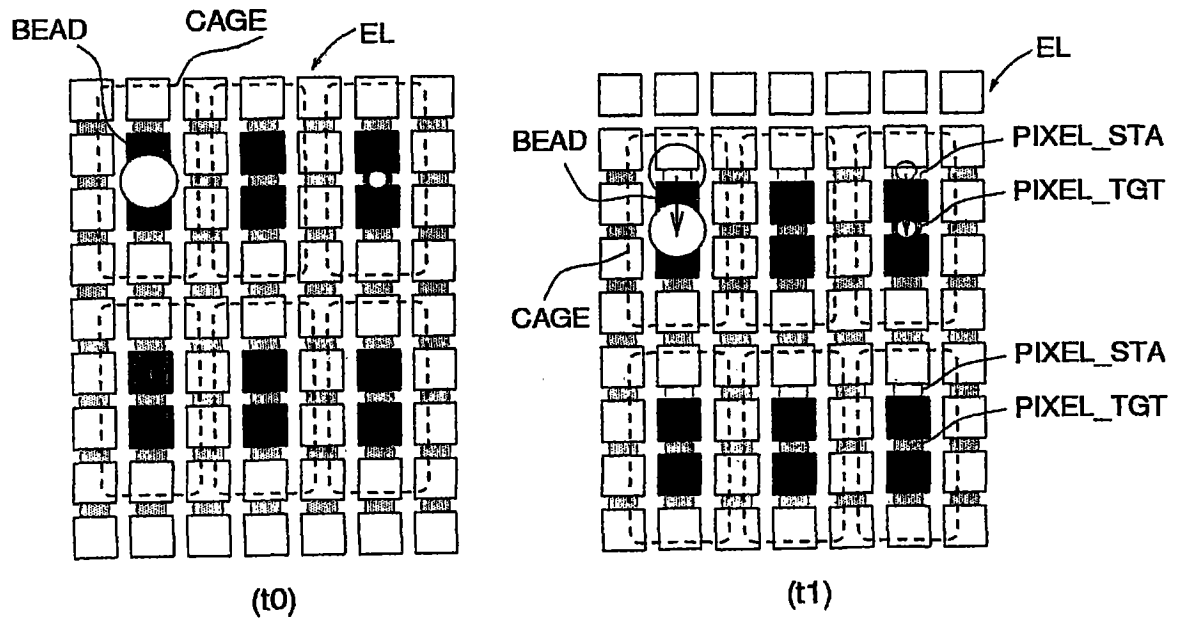


图 10

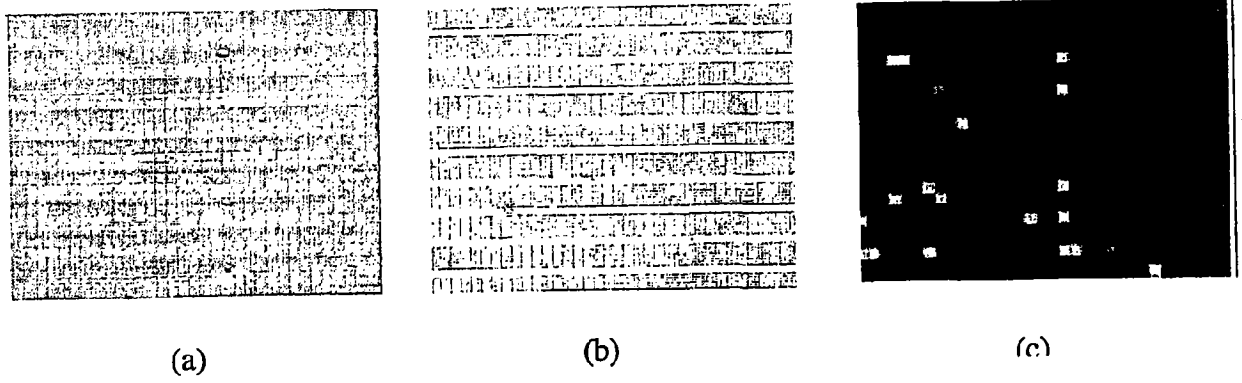


图 11

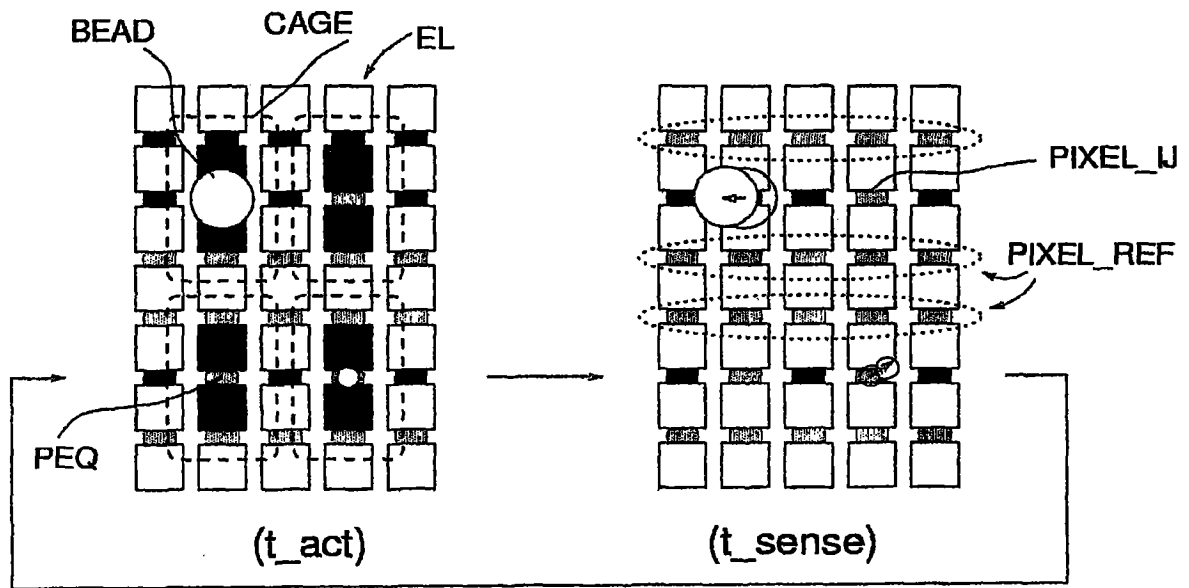


图 12

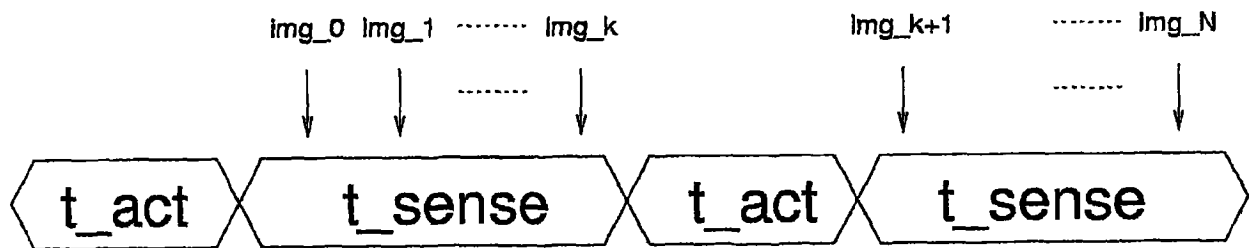


图 13

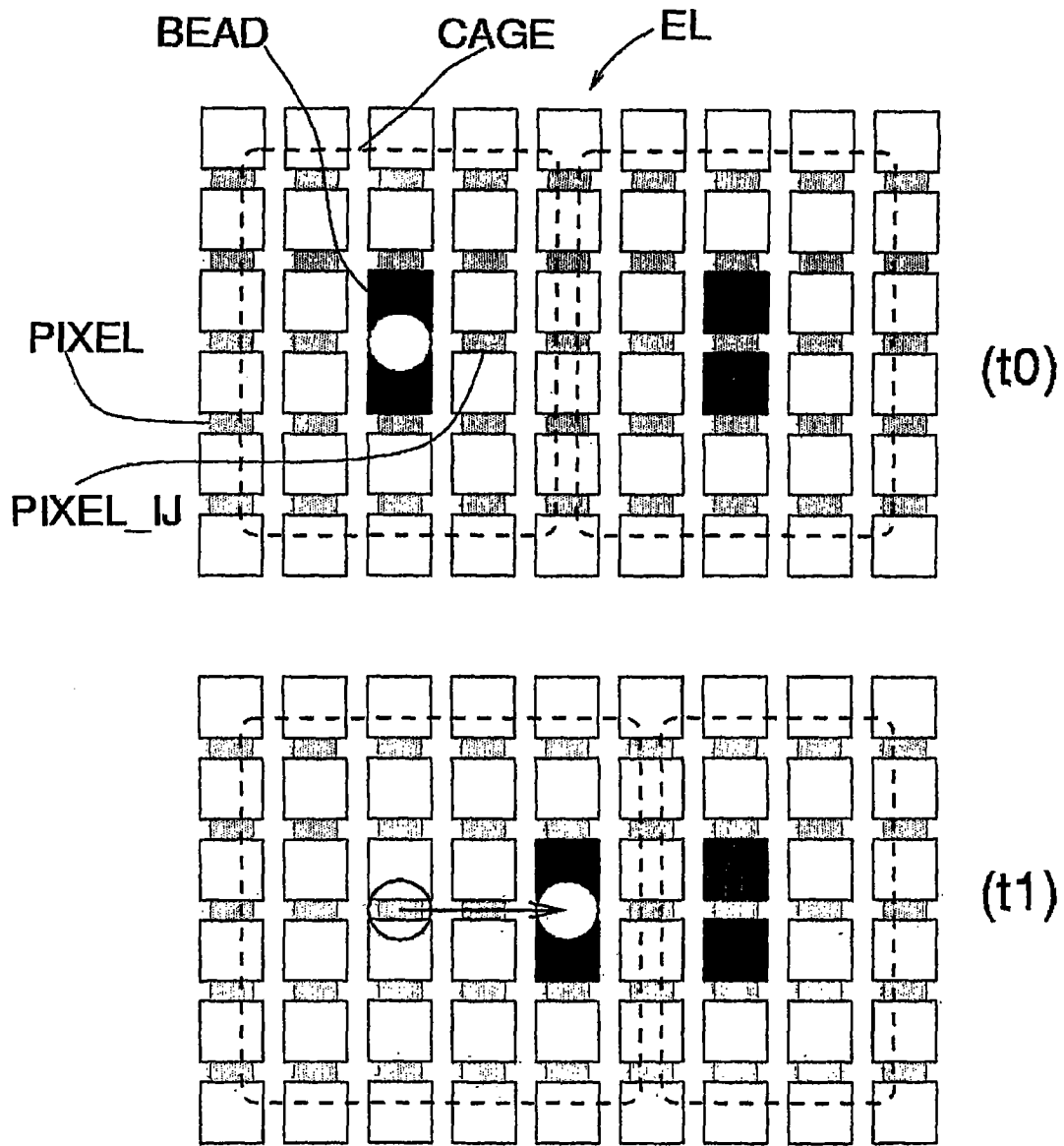


图 14

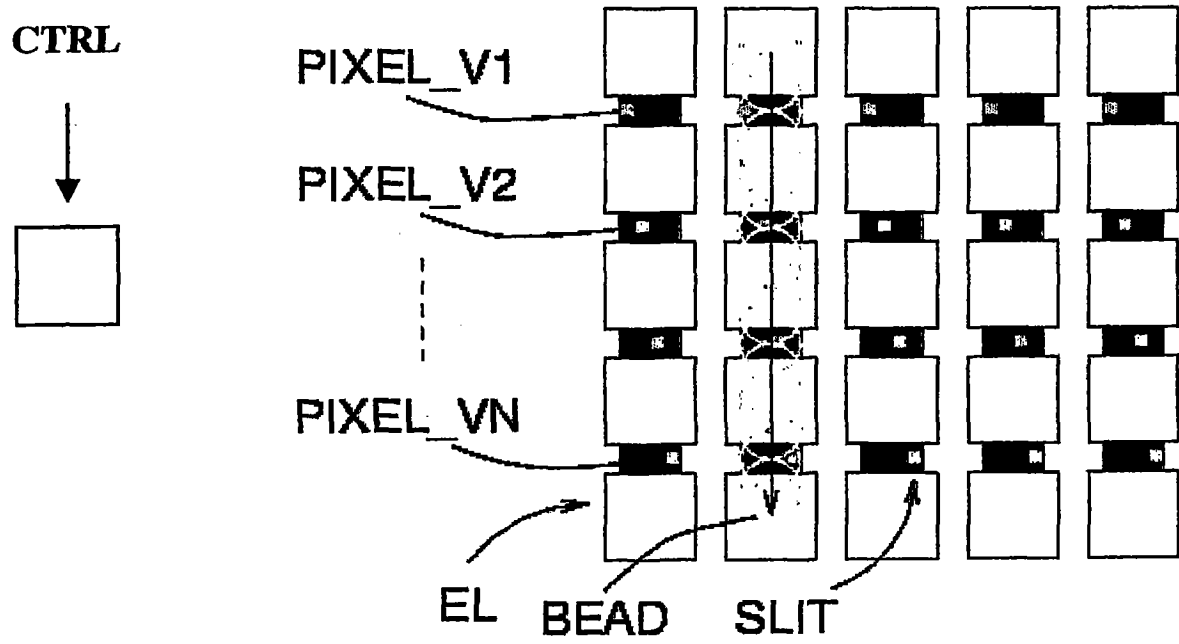


图 15

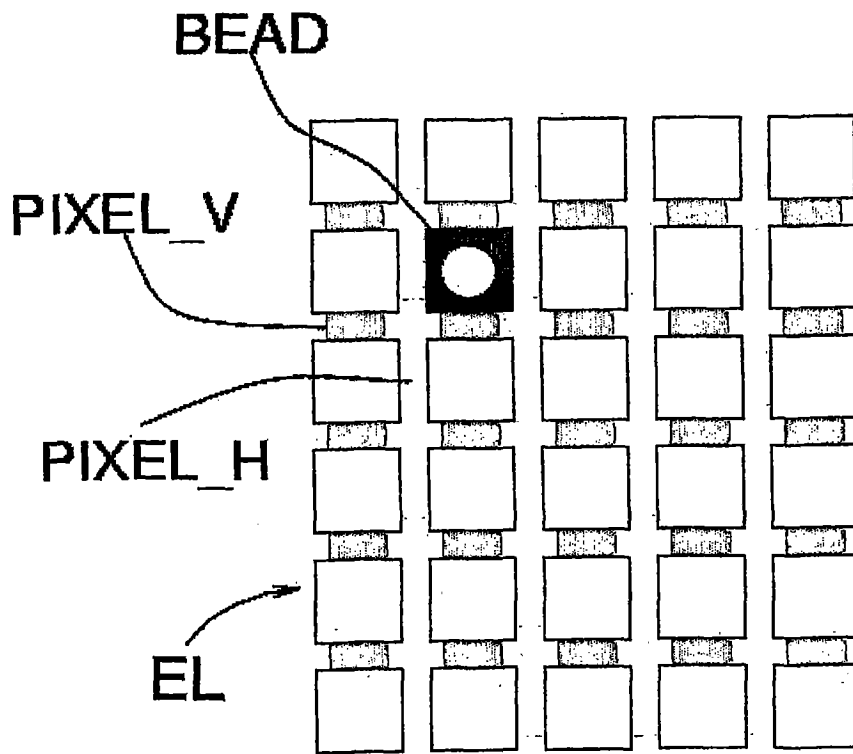
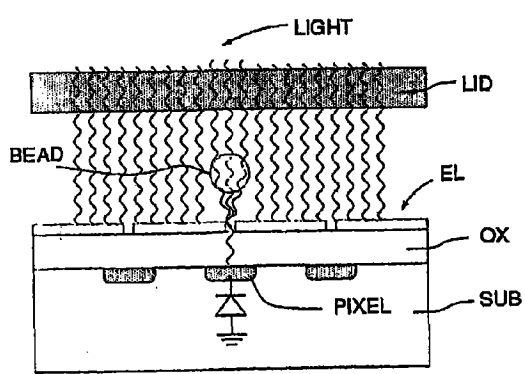
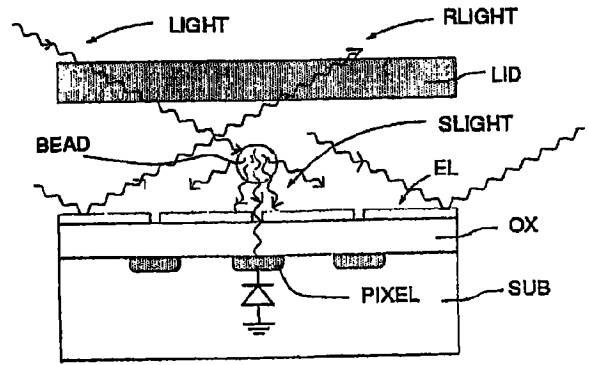


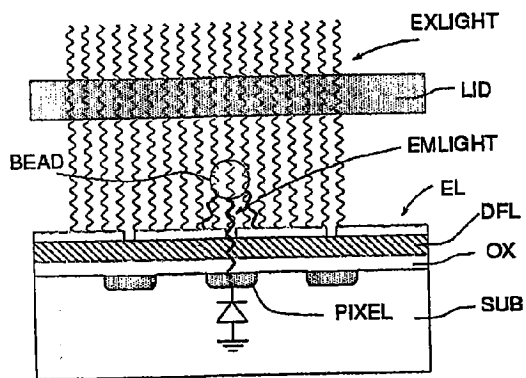
图 16



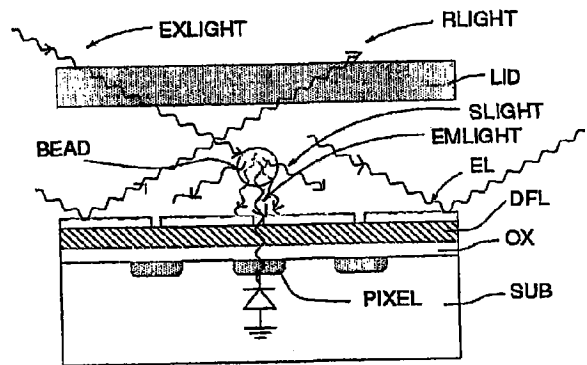
(BF)



(DF)



(BFF)



(DFF)

图 17

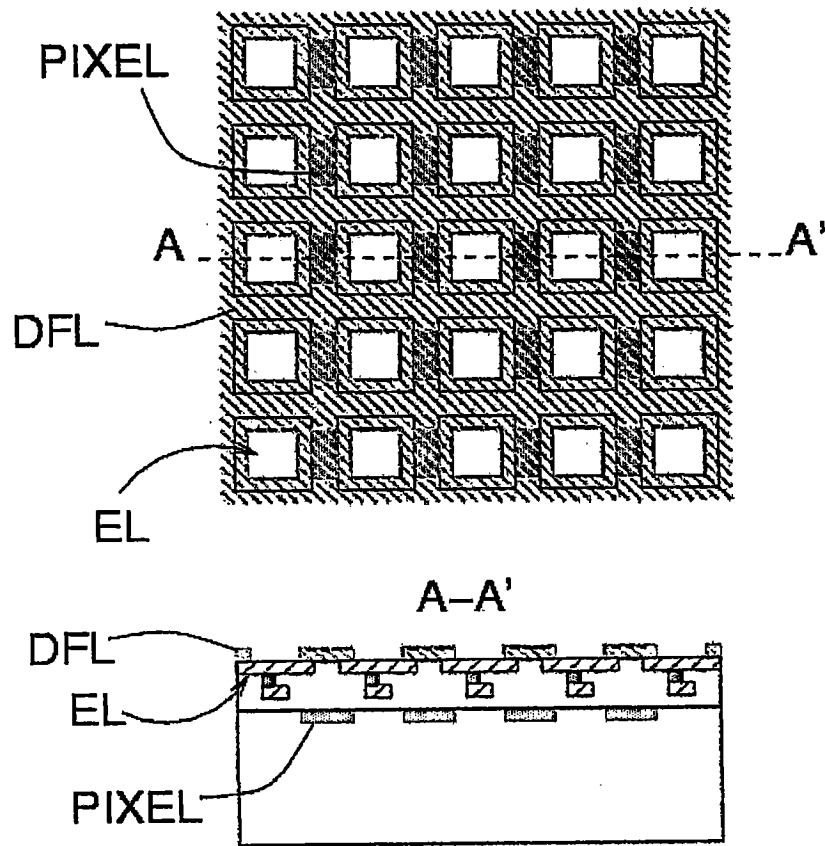


图 18

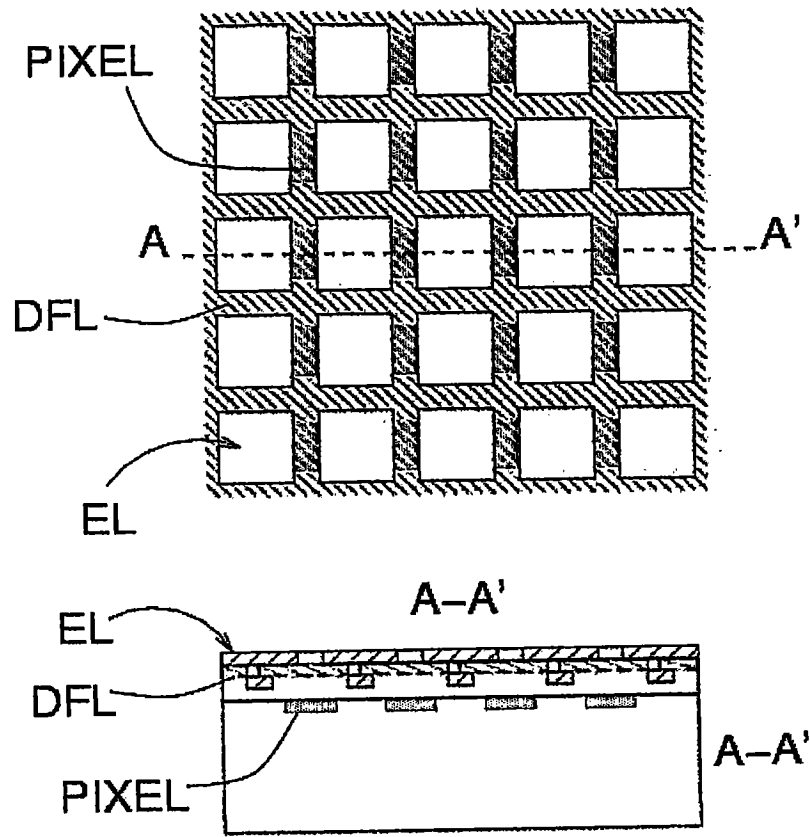


图 19

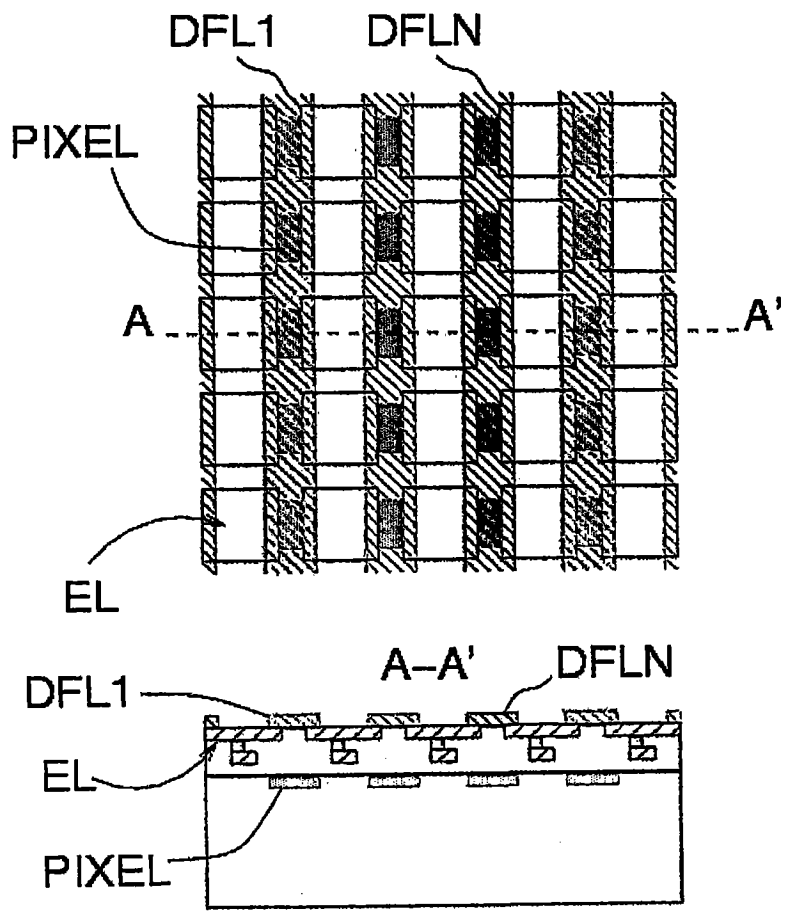


图 20

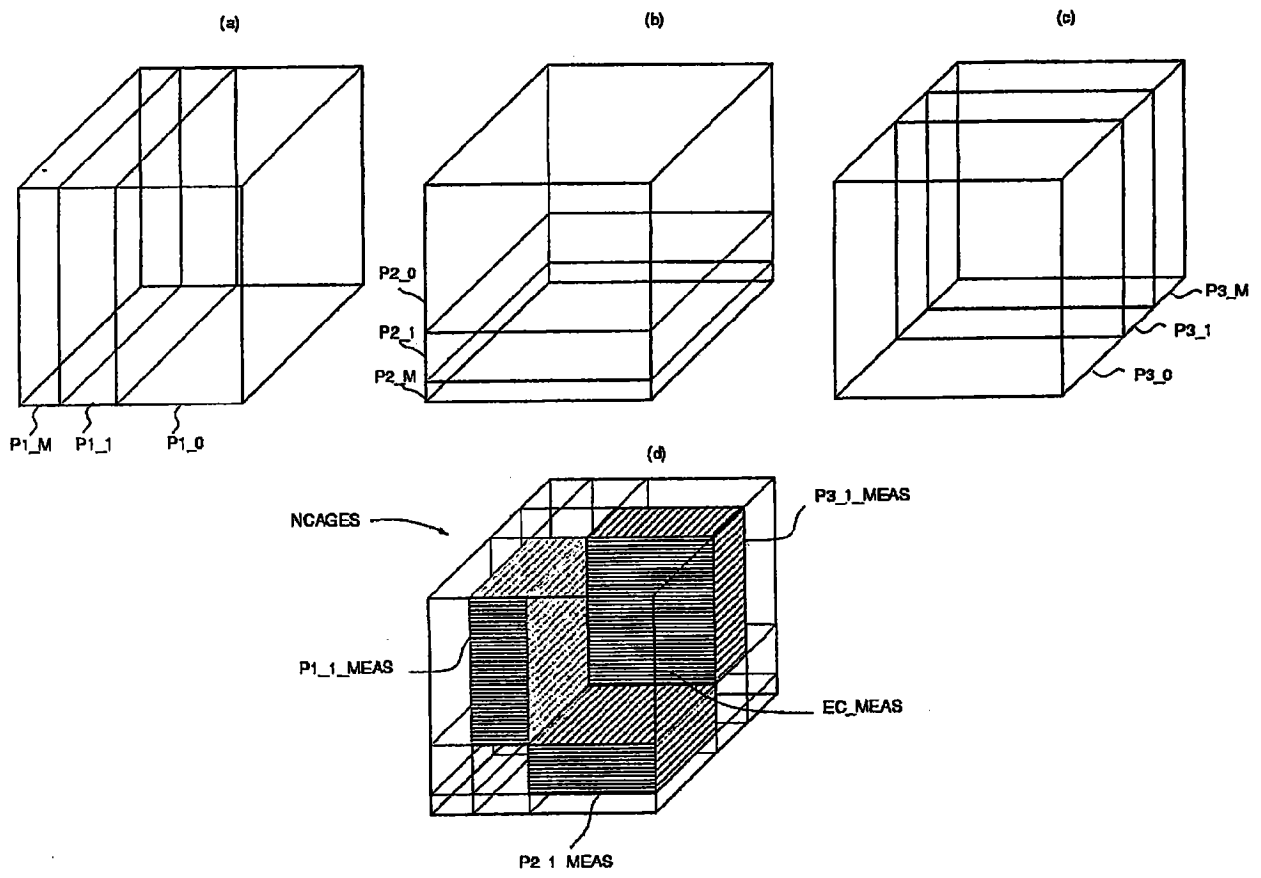


图 21