



# (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 103620389 B

(45)授权公告日 2016.08.17

(21)申请号 201280029689.X

(22)申请日 2012.04.18

(30)优先权数据

2011-092168 2011.04.18 JP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2013.12.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/JP2012/060487 2012.04.18

(87)PCT国际申请的公布数据

W02012/144528 JA 2012.10.26

(73)专利权人 奥林巴斯株式会社

地址 日本东京都

(72)发明人 中田秀孝

(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277

代理人 刘新宇

(51)Int.Cl.

G01N 21/64(2006.01)

(56)对比文件

CN 101946180 A,2011.01.12,全文.

CN 101147055 A,2008.03.19,说明书第4,6,9,10,17-18,20,21页、附图1,8,10.

WO 2007/118209 A2,2007.10.18,全文.

审查员 崔秀艳

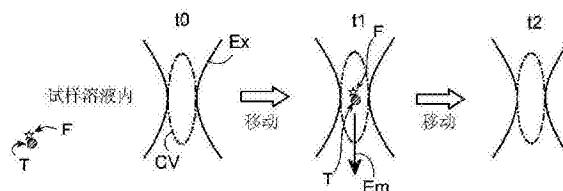
权利要求书3页 说明书26页 附图11页

## (54)发明名称

目标粒子的定量方法、光分析装置以及光分析用计算机程序

## (57)摘要

该目标粒子的定量方法具有以下工序:调制包含所述目标粒子和与所述目标粒子结合的发光探针的试样溶液,使所述目标粒子与所述发光探针在所述试样溶液中结合;(b)移动工序,使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统,使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;检测工序,一边使所述光学系统的所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动,一边检测从所述光检测区域中的所述发光探针发出的光信号,来直接或间接地逐个检测所述目标粒子;(c)计数工序,对在所述检测工序中检测出的所述目标粒子的个数进行计数;以及计算工序,基于对所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度或量与所述目标粒子的所述个数的相关关系进行近似的检量线,根据所述工序(b)中所计数出的所述目标粒子的所述个数,计算所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度。



1. 一种目标粒子的定量方法,对在试样溶液中分散且随机运动的目标粒子进行定量,具备以下工序:

(a)调制包含所述目标粒子和与所述目标粒子结合的发光探针的试样溶液,使所述目标粒子与所述发光探针在所述试样溶液中结合;

(b)移动工序,使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统,使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;

检测工序,一边使所述光学系统的所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动,一边检测从所述光检测区域中的所述发光探针发出的光信号,来直接或间接地逐个检测所述目标粒子;

(c)计数工序,对在所述检测工序中检测出的所述目标粒子的个数进行计数;以及

计算工序,基于对所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度或量与所述目标粒子的所述个数的相关关系进行近似的检量线,根据所计数出的所述目标粒子的所述个数来计算所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度,

其中,在上述检测工序中,将具有反映上述光检测区域的光强度分布的轮廓的、光强度随时间的变化逐个检测为来自各个上述目标粒子的光的信号。

2. 根据权利要求1所述的目标粒子的定量方法,其特征在于,  
在所述移动工序中以规定的速度移动所述光检测区域的所述位置。

3. 根据权利要求1所述的目标粒子的定量方法,其特征在于,  
在所述移动工序中,以比扩散移动速度快的速度移动所述光检测区域的所述位置,所述扩散移动速度是所述发光探针或与所述发光探针结合的目标粒子的快的一方的扩散移动速度。

4. 根据权利要求1所述的目标粒子的定量方法,其特征在于,  
在所述检测工序中,根据所检测出的按照时间顺序的所述光信号的形状,来检测所述发光探针或与发光探针结合的所述目标粒子进入到所述光检测区域的情形。

5. 根据权利要求1所述的目标粒子的定量方法,其特征在于,  
所述发光探针具有在相互接近时产生荧光能量转移现象的能量供体部位和能量受体部位,

在所述发光探针与所述目标粒子结合的结合状态和未与所述目标粒子结合的非结合状态之间,所述能量供体部位与所述能量受体部位之间的距离不同,

所述结合状态与所述非结合状态的从所述发光探针发出的光的发光特性不同。

6. 根据权利要求1所述的目标粒子的定量方法,其特征在于,  
所述目标粒子为核酸,  
所述发光探针是与所述目标粒子特异地杂交且结合有荧光能量转移现象中的成为能量供体的荧光物质和成为能量受体的物质中的至少一个的单链核酸。

7. 根据权利要求1所述的目标粒子的定量方法,其特征在于,  
还具备以下工序(d),在所述工序(a)之后,从所述试样溶液中,分离未与所述目标粒子结合的发光探针来回收包含所述目标粒子和所述发光探针的复合物。

8. 根据权利要求7所述的目标粒子的定量方法,其特征在于,  
还具备以下工序(e),从在所述工序(d)中回收的所述复合物离解出所述发光探针之

后,将游离的发光探针和所述目标粒子相互分离来进行回收。

9.一种光分析装置,使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统检测来自在试样溶液中分散且随机运动的发光粒子的光,该光分析装置包括:

光检测区域移动部,其通过改变所述光学系统的光路来使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;

光检测部,其检测所述光检测区域中的所述发光粒子的光;

信号处理部,其一边使所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动,一边逐个地检测来自由所述光检测部检测出的各个所述发光粒子的所述光的光信号,对逐个地检测出的来自所述发光粒子的所述光信号的个数进行计数来对在所述光检测区域的所述位置移动过程中检测出的所述发光粒子的个数进行计数;

存储部,其存储对所述试样溶液中的所述发光粒子的浓度或量与从所述试样溶液计数出的所述发光粒子的所述个数的相关关系进行近似的检量线;

浓度计算部,其基于所述检量线,根据所述信号处理部所计数出的所述发光粒子的所述个数来计算所述试样溶液中的所述发光粒子的浓度;以及

显示部,其显示由所述浓度计算部计算出的所述试样溶液中的所述发光粒子的所述浓度,

其中,上述信号处理部将具有反映上述光检测区域的光强度分布的轮廓的、光强度随时间的变化逐个检测为来自各个上述发光粒子的所述光的光信号。

10.根据权利要求9所述的装置,其特征在于,

所述光检测区域移动部以规定的速度移动所述光检测区域的所述位置。

11.根据权利要求9所述的装置,其特征在于,

所述光检测区域移动部以比所述发光粒子的扩散移动速度快的速度移动所述光检测区域的所述位置。

12.根据权利要求9所述的装置,其特征在于,

根据由所述光检测部检测出的按照时间顺序的所述光信号的形状,所述信号处理部检测所述发光粒子中的一个发光粒子进入到所述光检测区域的情形。

13.根据权利要求12所述的装置,其特征在于,

在检测出强度大于规定的阈值的所述光信号时,所述信号处理部检测出所述发光粒子中的一个发光粒子进入到了所述光检测区域。

14.根据权利要求9所述的装置,其特征在于,

所述信号处理部根据检测出的所述发光粒子的个数,来确定所述试样溶液中的所述发光粒子的数密度或浓度。

15.根据权利要求9所述的装置,其特征在于,

所述发光粒子是与发光探针结合的目标粒子,

所述光检测部进行检测的光是从与所述目标粒子结合的状态的所述发光探针发出的光。

16.根据权利要求9所述的装置,其特征在于,

所述发光粒子是与发光探针结合的目标粒子,

所述光检测部进行检测的光是从发光探针发出的光,该发光探针是从包含目标粒子和

所述发光探针的复合体中游离出的发光探针。

## 目标粒子的定量方法、光分析装置以及光分析用计算机程序

### 技术领域

[0001] 本发明涉及使用共聚焦显微镜、多光子显微镜的光学系统等能够检测到来自溶液中的微小区域的光的光学系统而求出在试样溶液中分散并随机运动的粒子的浓度的方法。

[0002] 本申请基于2011年04月18日在日本提交的日本特愿2011-092168号主张优先权，本文援引其内容。

### 背景技术

[0003] 随着近年来光学测量技术的发展，使用共聚焦显微镜的光学系统和还能够进行光子计数(单光子检测)的超高灵敏度的光检测技术，能够测量/测定单光子或单分子荧光水平的微弱光。因此，提出了使用这样的微弱光的检测技术来进行生物分子等分子间相互作用或者分子间的结合/解离反应的检测的各种装置或方法。例如，对于荧光相关光谱分析(Fluorescence Correlation Spectroscopy:FCS。例如，参见专利文献1、2、非专利文献1~3)中，使用激光共聚焦显微镜的光学系统和光子计数技术，测定来自在试样溶液中的微小区域(被称为显微镜的激光聚光到的焦点区域-共焦区组织。)内出入的荧光分子或进行了荧光标记的分子(荧光分子等)的荧光强度。基于由测定出的荧光强度的自相关函数的值决定的、微小区域内的荧光分子等的平均滞留时间(平移扩散时间)以及滞留的分子个数的平均值，能够取得荧光分子等的运动速度或大小、浓度这类信息，或者检测分子的结构或大小的变化、分子的结合/解离反应或分散/聚集这类各种现象。此外，利用荧光强度分布分析(Fluorescence-Intensity Distribution Analysis:FIDA。例如，专利文献3)或光子计数直方图(Photon Counting Histogram:PCH。例如：专利文献4)，生成与FCS同样地测量到的出入共焦区组织内的荧光分子等的荧光强度的直方图。对于该直方图的分布拟合统计学模型式，由此估算荧光分子等的固有明亮度的平均值和滞留于共焦区组织内的分子个数的平均值，根据这些信息，推测分子结构或大小的变化、结合/解离状态、分散/聚集状态等。此外，专利文献5、6中提出了基于使用共聚焦显微镜的光学系统测量出的试样溶液的荧光信号的时程来检测荧光性物质的方法。专利文献7中使用光子计数技术测量在流式细胞仪内流过的荧光微粒或固定在基板上的荧光微粒所发出的微弱光。而且，提出了一种用于利用微弱光检测流中或基板上的荧光微粒的存在的信号运算处理技术。

[0004] 特别的是，通过应用FCS、FIDA等、使用了共聚焦显微镜的光学系统和光子计数技术的微小区域的荧光测定技术的方法，测定所必需的试样的浓度比以前低得多且可以是微量(一次测定使用的量最多数十 $\mu$ L左右)，测定时间也大幅地缩短(一次测定中重复进行数次秒数量级时间的测量)。因此，特别在对于医学/生物学的研究开发领域中经常使用的稀少或高价的试样进行分析的情况下或者在疾病的临床诊断、生理活性物质的筛选等被检体数量多的情况下，这些技术与现有的生物化学的方法相比较，可以期待成为能够低廉或迅速地实施实验或检查的强有力的工具。

[0005] 专利文献1：日本特开2005-098876号公报

[0006] 专利文献2：日本特开2008-292371号公报

- [0007] 专利文献3:日本专利第4023523号公报
- [0008] 专利文献4:国际公开第2008-080417号
- [0009] 专利文献5:日本特开2007-20565号公报
- [0010] 专利文献6:日本特开2008-116440号公报
- [0011] 专利文献7:日本特开平4-337446号公报
- [0012] 非专利文献1:金城政孝、蛋白質核酸酵素、1999年、第44卷、第9号、第1431~1438页。
- [0013] 非专利文献2:Meyer-Alms、Fluorescence Correlation Spectroscopy、R.Rigler 著、Springer、柏林、2000年、第204~224页。
- [0014] 非专利文献3:加藤则子等4名、遺伝子医学、2002年、第6卷、第2号、第271~277页。

## 发明内容

### [0015] 发明要解决的问题

[0016] 所述FCS、FIDA、PCH等光分析技术简而言之是通过统计学处理计算所测量出的荧光强度随时间波动的大小,根据该波动的大小确定在试样溶液中的微小区域内出入的荧光分子等的各种特性。因此,为了在所述的光分析技术中得到有意义的结果,作为试样溶液中的观测对象的荧光分子等的浓度或数密度适合调制成在平衡状态下在一次秒数量级长度的测量时间中有能够进行统计学处理的个数的荧光分子等出入微小区域内,优选调制成在微小区域内总是存在有一个左右的荧光分子等(典型地,共焦区组织的体积为1fL左右,所以荧光分子等的浓度优选为1nM左右或其以上。)。换言之,试样溶液中的观测对象粒子的浓度或数密度大幅地低于能够进行统计学处理的程度时(例如,大幅地低于1nM时),产生测量时间内只有稀少的观测对象物进入微小区域内的状态。于是,在荧光强度的测量结果中,随着观测对象物在微小区域内完全不存在的状态长时间地存在而有意义的荧光强度的观测测量变少。其结果,如上所述的基于荧光强度的统计学波动的光分析技术无法期望有意义的或精度良好的分析结果。

[0017] 在专利文献5、6中所述的、使用共聚焦显微镜的光学系统的荧光性物质的检测方法中公开了以下内容:不进行如所述的与荧光强度波动相关的统计学处理,根据数秒的测量时间内有无有意义的强度的荧光信号的产生,能够确定试样中的成为观测对象的荧光分子等的有无。由此得到有意义的强度的荧光信号的频率与试样中的荧光分子等的粒子数的相关性。特别是在专利文献6中,暗示了当产生搅拌试样溶液的随机流动时检测灵敏度提高。然而,即便是这些方法,也只停留在检测通过扩散或随机流动而概率地进入微小区域内的荧光分子等的存在,不能把握微小区域内的荧光分子等粒子的行为。未实现例如:粒子的计数、定量地计算粒子的浓度或数密度。此外,专利文献7中记载的技术是逐个检测流式细胞仪的液流中的荧光微粒或固定在基板上的荧光微粒的存在的技术,而不是用于检测试样溶液中通常在通常的状态下溶解或分散的分子或胶体等的粒子,即不是用于对在试样溶液中随机运动的粒子进行检测的技术。因而,未实现定量地计算在试样溶液中溶解或分散的粒子的浓度或数密度。另外,专利文献7的技术包含流式细胞仪中的测量或者荧光粒子向基板上的固定化处理这类过程。因此可以认为检测所需要的试样量远大于FCS、FIDA、PCH等光分析技术的情况,并且对实施者要求复杂且高难度的操作技术。

[0018] 本发明是鉴于所述的问题点而想出的,其目的在于提供如下一种方法:通过不包含FCS、FIDA、PCH等光分析技术中实施那样的统计学处理而能够对观测对象粒子的浓度或数密度低于这些光分析技术中处理水平的、试样溶液中的观测对象粒子的状态或特性进行检测的新型的光分析技术,对在试样溶液中分散且随机运动的目标粒子进行定量。

[0019] 用于解决问题的方案

[0020] 本发明的发明者们为了解决所述问题而潜心研究的结果为一种对在试样溶液中分散且随机运动的目标粒子进行定量的方法,将从在试样溶液中分散且随机运动的观测对象粒子(具体而言,是指与目标粒子结合的发光探针或者发光探针。以下相同。)发出的光作为标识进行检测的情况下,发现以下两点而完成了本发明。即,(1)通过使用扫描分子计数法进行观测对象粒子的检测,由此即便在试样溶液中的目标粒子的浓度非常低的情况下,也能够高灵敏度地检测出目标粒子;以及(2)通过使用根据观测对象粒子的浓度已知的标准试样溶液的测量结果制作出的检量线,根据通过扫描分子计数法求出的观测对象粒子的个数,能够计算试样溶液中的目标粒子的浓度。

[0021] 在此,扫描分子计数法是在日本特愿2010-044714中由本申请的申请人提出的新型的光分析技术。

[0022] 即,根据本发明的第1方式所涉及的目标粒子的定量方法,对在试样溶液中分散且随机运动的目标粒子进行定量,该方法具备以下工序:(a)调制包含所述目标粒子和与所述目标粒子结合的发光探针的试样溶液,使所述目标粒子与所述发光探针在所述试样溶液中结合;(b)移动工序,使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统,使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;检测工序,一边使所述光学系统的所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动,一边检测从所述光检测区域中的所述发光探针发出的光信号,来直接或间接地逐个检测所述目标粒子;(c)计数工序,对在所述检测工序中检测出的所述目标粒子的个数进行计数;以及计算工序,基于对所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度或量与所述目标粒子的所述个数的相关关系进行近似的检量线,根据在所述工序(b)中计数出的所述目标粒子的所述个数来计算所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度。

[0023] 根据本发明的第2方式,是在所述第1方式中,优选在所述移动工序中以规定的速度移动所述光检测区域的所述位置。

[0024] 根据本发明的第3方式,是在所述第1方式或所述第2方式中,优选在所述移动工序中,以比扩散移动速度快的速度移动所述光检测区域的所述位置,所述扩散移动速度是所述发光探针或与所述发光探针结合的目标粒子的快的一方的扩散移动速度。

[0025] 根据本发明的第4方式,是在所述第1方式至所述第3方式中的任一个方式中,优选在所述检测工序中,根据所检测出的按照时间顺序的所述光信号的形状,来检测所述发光探针或与发光探针结合的所述目标粒子进入到所述光检测区域的情形。

[0026] 根据本发明的第5方式,是在所述第1方式至所述第4方式中的任一个方式中,优选所述发光探针具有在相互接近时产生荧光能量转移现象的能量供体部位和能量受体部位,在所述发光探针与所述目标粒子结合的结合状态和未与所述目标粒子结合的非结合状态之间,所述能量供体部位与所述能量受体部位之间的距离不同,所述结合状态与所述非结合状态的从所述发光探针发出的光的发光特性不同。

[0027] 根据本发明的第6方式,是在所述第1方式至所述第5方式中的任一个方式中,优选所述目标粒子为核酸,所述发光探针是与所述目标粒子特异地杂交且结合有荧光能量转移现象中的成为能量供体的荧光物质和成为能量受体的物质中的至少一个的单链核酸。

[0028] 根据本发明的第7方式,是在所述第1方式至所述第6方式中的任一个方式中,优选还具备以下工序(d),在所述工序(a)之后,从所述试样溶液中,分离未与所述目标粒子结合的发光探针来回收包含所述目标粒子和所述发光探针的复合体。

[0029] 根据本发明的第8方式,是在所述第7方式中,优选还具备以下工序(e),在从在所述工序(d)中回收的所述复合体离解出所述发光探针之后,将游离的发光探针和所述目标粒子相互分离来回收。

[0030] 根据本发明的第9方式所涉及的光分析装置,使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统检测来自在试样溶液中分散且随机运动的多个发光粒子的光,该光分析装置包括:光检测区域移动部,其通过改变所述光学系统的光路,来使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;光检测部,其检测所述光检测区域中的所述发光粒子的光;信号处理部,其一边使所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动,一边逐个地检测来自所述光检测部检测出的各个所述发光粒子的所述光的光信号,对逐个地检测出的来自所述发光粒子的所述光信号的个数进行计数来对在所述光检测区域的所述位置移动过程中检测出的所述发光粒子的个数进行计数;存储部,其存储对所述试样溶液中的所述发光粒子的浓度或量与从所述试样溶液计数出的所述发光粒子的所述个数的相关关系进行近似的检量线;浓度计算部,其基于所述检量线,根据所述信号处理部所计数出的所述发光粒子的所述个数来计算所述试样溶液中的所述发光粒子的浓度;以及显示部,其显示由所述浓度计算部计算出的所述试样溶液中的所述发光粒子的所述浓度。

[0031] 根据本发明的第10方式,是在所述第9方式中,优选所述光检测区域移动部以规定的速度移动所述光检测区域的所述位置。

[0032] 根据本发明的第11方式,是在所述第9方式或所述第10方式中,优选所述光检测区域移动部以比所述发光粒子的扩散移动速度快的速度移动所述光检测区域的所述位置。

[0033] 根据本发明的第12方式,是在所述第9方式至所述第11方式中的任一个方式中,优选根据由所述光检测部检测出的按照时间顺序的所述光信号的形状,所述信号处理部检测所述发光粒子中的一个发光粒子进入到所述光检测区域的情形。

[0034] 根据本发明的第13方式,是在所述第12方式中,优选在检测出强度大于规定的阈值的所述光信号时,所述信号处理部检测出所述发光粒子中的一个发光粒子进入到所述光检测区域。

[0035] 根据本发明的第14方式,是在所述第9方式至所述第13方式中的任一个方式中,优选所述信号处理部根据检测出的所述发光粒子的个数,来确定所述试样溶液中的所述发光粒子的数密度或浓度。

[0036] 根据本发明的第15方式,是在所述第9方式至所述第14方式中的任一个方式中,优选所述发光粒子是与发光探针结合的目标粒子,所述光检测部进行检测的光是从与所述目标粒子结合的状态的所述发光探针发出的光。

[0037] 根据本发明的第16方式,是在所述第9方式至所述第14方式中的任一个方式中,优选所述光检测部进行检测的光是从所述发光探针发出的光,该发光探针是从包含所述目标

粒子和所述发光探针的复合体中游离出的发光探针。

[0038] 根据本发明的第17方式所涉及的光分析用计算机程序,用于使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统检测来自在试样溶液中分散且随机运动的多个发光粒子的光,该光分析用计算机程序使计算机执行以下步骤:改变步骤,改变所述光学系统的光路以使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;光检测步骤,在使所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动的过程中检测所述光检测区域中的所述发光粒子的所述光;光信号检测步骤,逐个地检测来自所述检测出的各个所述发光粒子的所述光的光信号;发光粒子数计数步骤,对来自所述逐个地检测出的所述发光粒子的所述光的所述光信号的个数进行计数来对在所述光检测区域的所述位置移动过程中检测出的所述发光粒子的个数进行计数;以及浓度计算步骤,基于对所述试样溶液中的所述发光粒子的浓度或量与从所述试样溶液计数出的所述发光粒子的所述个数的相关关系进行近似的检量线,根据所述计数出的多个发光粒子的所述个数来计算所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度。

[0039] 根据本发明的第18方式,是在所述第17方式中,优选在所述改变步骤中,以规定的速度移动所述光检测区域的所述位置。

[0040] 根据本发明的第19方式,是在所述第17方式或所述第18方式中,优选在所述改变步骤中,以比所述发光粒子的扩散移动速度快的速度移动所述光检测区域的所述位置。

[0041] 根据本发明的第20方式,是在所述第17方式至所述第19方式中的任一个方式中,优选在所述光信号检测步骤中,根据所检测出的按照时间顺序的所述光信号的形状,检测所述发光粒子中的一个发光粒子进入到所述光检测区域的情形。

[0042] 根据本发明的第21方式,是在所述第17方式至所述第20方式中的任一个方式中,优选在所述光信号检测步骤中,在检测出强度大于规定的阈值的所述光信号时,检测出所述发光粒子中的一个发光粒子进入到所述光检测区域。

[0043] 根据本发明的第22方式,是在所述第17方式至所述第21方式中的任一个方式中,优选还包括以下步骤:根据所述检测出的所述发光粒子的所述个数,来确定所述试样溶液中的所述发光粒子的数密度或浓度。

[0044] 根据本发明的第23方式,是在所述第17方式至所述第22方式中的任一个方式中,优选在所述光检测步骤中,从所述光检测区域检测出的光是从与所述目标粒子结合的状态的所述发光探针发出的光。

[0045] 根据本发明的第24方式,是在所述第17方式至所述第22方式中的任一个方式中,优选在所述光检测步骤中,从所述光检测区域检测出的光是从所述发光探针发出的光,该发光探针是从包含所述目标粒子和所述发光探针的复合体游离出的发光探针。

[0046] 发明的效果

[0047] 在所述的目标粒子的定量方法中,不实施计算荧光强度的波动之类的统计学处理。因而,通过所述的目标粒子的定量方法,即便在作为解析对象的目标粒子在试样中仅极微量存在的情况下,也能够求出试样中的目标粒子的浓度。进一步,在所述的目标粒子的定量方法中,通过使用基于目标粒子浓度已知的标准试样制作出的检量线,能够根据所计数出的目标粒子的个数更简单地求出试样溶液中的目标粒子的浓度。

附图说明

- [0048] 图1A是用于扫描分子计数法的光分析装置的内部结构的示意图。
- [0049] 图1B是共焦区组织(共聚焦显微镜的观察区域)的示意图。
- [0050] 图1C是改变反射镜的方向来在试样溶液内部移动光检测区域的位置的机构的示意图。
- [0051] 图2A是说明用于该扫描分子计数法的基于光分析技术的光检测原理的示意图。
- [0052] 图2B是所测量的光强度的时间变化的示意图。
- [0053] 图3A是观测对象粒子一边进行布朗运动一边横穿光检测区域时的模型图。
- [0054] 图3B是表示图3A中的光子计数(光强度)的时间变化的例子图。
- [0055] 图4A是以快于观测对象粒子的扩散移动速度的速度移动试样溶液内的光检测区域的位置、从而观测对象粒子横穿光检测区域时的模型图。
- [0056] 图4B是表示图4A中的光子计数(光强度)的时间变化的例子图。
- [0057] 图5是以流程图的形式显示通过扫描分子计数法测量出的光子计数(光强度)的时间变化进行粒子的计数的处理过程的图。
- [0058] 图6A是示意性地表示与观测对象粒子对应的光强度的变化的图。
- [0059] 图6B是说明根据通过扫描分子计数法测量出的光子计数(光强度)的时间变化进行粒子计数的处理过程中检测信号的信号处理工序的例子图。
- [0060] 图7表示通过扫描分子计数法测量出的光子计数数据的实测例(柱状图)、将数据平滑化而获得的曲线(虚线)和峰存在区域中拟合的高斯函数(实线)。
- [0061] 图8是示意性地表示使用了分离用探针和与所述分离用探针结合的固相载体的方式的图。
- [0062] 图9是表示在本发明的一个实施方式所涉及的装置的显示部上显示的数据的一个方式的图。
- [0063] 图10是表示在本发明的装置的显示部上显示的数据的一个方式的图。
- [0064] 图11是以流程图的形式显示通过扫描分子计数法进行的试样溶液中的发光粒子(与发光探针结合的目标粒子)的计数直到试样溶液中的目标粒子的浓度测定的处理过程的图。
- [0065] 图12是表示在参考例1中将横轴设为试样溶液中的荧光物质ATT0633的浓度、将纵轴设为峰数来对各试样溶液的计数值进行绘制所制作出的检量线的曲线图(用对数刻度表示)。
- [0066] 图13是表示在参考例1中将横轴设为试样溶液中的荧光物质ATT0633的浓度、将纵轴设为峰数来对各试样溶液的计数值进行绘制所制作出的检量线的曲线图(用通常刻度表示)。
- [0067] 图14是表示在实施例1中将横轴设为标准试样溶液中的目标核酸的浓度、将纵轴设为峰数来对各标准试样溶液的计数值进行绘制所制作出的检量线的曲线图。
- [0068] 图15是表示在实施例1中将横轴设为标准试样溶液中的目标核酸的浓度、将纵轴设为峰数来对各标准试样溶液的计数值进行绘制所制作出的检量线的曲线图。

### 具体实施方式

- [0069] 首先,对于本发明的一个实施方式所涉及的扫描分子计数法进行说明。扫描分子

计数法一边通过微小区域扫描试样溶液内,一边当在试样溶液中分散并随机运动的发出光的粒子(以下,称为“发光粒子”。)横穿微小区域内时,检测从微小区域中的发光粒子发出的光。由此,扫描分子计数法一个一个逐个检测试样溶液中的多个发光粒子,能够获得与发光粒子的计数、试样溶液中的发光粒子的浓度或数密度相关的信息。与FIDA等光分析技术同样地,测定所需的试样也可以是微量(例如,数十 $\mu\text{L}$ 左右)的。另外,测定时间短,并且与FIDA等光分析技术的情况相比,对于更低浓度或数密度的发光粒子,能够定量检测其浓度或数密度等特性。

[0070] 发光粒子是指通过荧光、磷光、化学发光、生物发光、光散射等发出光的粒子。本发明的一个实施方式所涉及的目标粒子的定量方法中,目标粒子与发光探针结合而成为发光粒子。

[0071] 在本发明的一个实施方式中,共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统的“光检测区域”是指在这些显微镜中检测光的微小区域,当由物镜提供照明光时,相当于该照明光聚光的区域。在共聚焦显微镜中,该光检测区域尤其根据物镜与小孔(pin hole)之间的位置关系确定。

[0072] 在试样溶液内边移动光检测区域的位置,即,边通过光检测区域扫描试样溶液内边逐次地进行光的检测。当进行光的检测时,在移动的光检测区域包含了与随机运动的粒子结合或缔合的发光探针时,检测到来自发光探针的光。由此,检测到一个粒子的存在。此时,可以直接检测想要检测的粒子(目标粒子)的存在,也可以间接地检测想要检测的粒子(目标粒子)的存在。直接检测的情况是指通过检测与目标粒子结合的发光探针来进行的检测。间接检测的情况是指通过检测发光探针暂时与目标粒子结合之后从粒子离解出的发光探针的光来进行的检测。在这些情况下,在逐次检测到的光中逐个检测来自发光探针的光信号,由此,一个一个地逐个逐次地检测粒子的存在,能够得到关于粒子在溶液内的状态的各种信息。具体而言,例如,在所述构成中,可以对逐个检测到的粒子进行计数,从而对在光检测区域的位置移动中检测到的粒子的个数进行计数(粒子的计数)。根据该构成,通过组合粒子的个数与光检测区域的位置的移动量,能够获得与试样溶液中的粒子的数密度或浓度相关的信息。特别是如果通过任意手法例如以规定速度移动光检测区域的位置等来确定光检测区域的位置移动轨迹的总体积,则能够具体计算粒子的数密度或浓度。当然,也可以不是直接确定绝对数密度值或浓度值,而计算对于多个试样溶液、或者对于成为浓度或数密度基准的标准试样溶液的相对数密度或浓度的比。另外,扫描分子计数法中,采用改变光学系统的光路而移动光检测区域的位置的结构。因此,光检测区域的移动是迅速的,并且在试样溶液中实质上不产生机械振动、流体力学的作用。由此,作为检测对象的粒子不受力学的作用的影响而能够以稳定的状态进行光的测量。在试样溶液中有振动或流动作用时,粒子的物理性质有可能发生变化。并且,由于流通试样溶液的结构不是必需的,因此能够与FCS、FIDA等情况同样地以微量(1~数十 $\mu\text{L}$ 左右)的试样溶液进行测量和分析。

[0073] 在逐个地检测所述的粒子的工序中,对于根据逐次检测到的光信号判定发光探针是否进入光检测区域,可以根据按照时间顺序检测到的光信号的形状而进行。该发光探针包括一个发光探针与一个粒子结合的情况、多个发光探针与一个粒子结合的情况、以及根据实验方式的、与一个粒子结合之后从粒子解离的情况下的发光探针。以下相同。

[0074] 本实施方式中,典型地,可以是当检测到具有比规定阈值大的强度的光信号时,检

测为发光探针进入到了光检测区域。在此,规定的阈值是指预先设定的光强度的值,是通过实验或为了符合分析目的而设定的值。

[0075] 此外,在所述移动光检测区域的位置的工序中,可以根据发光探针的特性或试样溶液中的数密度或浓度,适当改变试样溶液内的光检测区域的位置的移动速度。如本领域技术人员所理解的那样,从发光探针检测到的光的形态可能会根据其特性或试样溶液中的数密度或浓度而改变。特别是,光检测区域的移动速度快时,从发光探针得到的光量降低,因此,为了精度良好或灵敏度良好地测量来自发光探针的光,优选适当地改变光检测区域的移动速度。

[0076] 进一步,在所述移动光检测区域的位置的工序中,适当的是将试样溶液内的光检测区域的位置的移动速度设定为高于与作为检测对象的目标粒子结合的发光探针的扩散移动速度(由布朗运动造成的粒子的平均移动速度)。如所述说明,通过扫描分子计数法,当光检测区域经过存在有与一个粒子结合的发光探针的位置时,检测由该发光探针发出的光而逐个检测发光探针。然而,当与粒子结合的发光探针在溶液中由于布朗运动随机移动而多次出入光检测区域时,从一个发光探针多次检测到表示希望检测的粒子存在的光信号。其结果,难以将检测到的光信号与一个检测到的粒子的存在对应起来。因此,如上所述,将光检测区域的移动速度设定为高于与粒子结合的发光探针的扩散移动速度。具体而言,设定为以快于与目标粒子结合的状态的发光探针的扩散移动速度的速度进行移动。另外,在检测从发光探针发出的光信号来间接地检测目标粒子的情况(也就是说,在观测对象粒子是发光探针的情况)下,设定成以快于发光探针的扩散移动速度的速度进行移动。即,将光检测区域的位置设定成以快于发光探针或与发光探针结合的目标粒子的扩散移动速度中的快的一方的速度进行移动。由此,能够使发光探针对应于一个(表示粒子的存在的)光信号。扩散移动速度随着观测对象粒子而改变,所以如上所述,优选根据观测对象粒子的特性(特别是扩散常数),适当改变光检测区域的移动速度。

[0077] 可以以任意方式进行用于移动光检测区域的位置的光学系统的光路改变。

[0078] 例如,可以使用激光扫描型光学显微镜中采用的检流计镜改变光路来改变光检测区域的位置。光检测区域的位置的移动轨迹可以任意地设定。例如,能够选自圆形、椭圆形、矩形、直线和曲线即可。

[0079] 对于扫描分子计数法,其光检测机理自身与FIDA等光分析技术的情况相同,构成为对来自共聚焦显微镜或多光子显微镜的光检测区域的光进行检测,因此,试样溶液的量同样地为微量即可。然而,扫描分子计数法中,不实施计算荧光强度的波动这样的统计学处理,因此,扫描分子计数法的光分析技术能够适用于粒子的数密度或浓度大幅低于FIDA等光分析技术所需要的水平的试样溶液。

[0080] 另外,扫描分子计数法中,在溶液中分散或溶解的每个粒子被逐个检测出,因此,使用该信息,能够定量地进行粒子的计数、试样溶液中的粒子的浓度或数密度的计算、或者取得与浓度或数密度相关的信息。即,通过扫描分子计数法,使通过光检测区域的粒子与检测到的光信号一对一地对应而将粒子一个一个地检测出。由此,能够进行在溶液中分散并随机运动的粒子的计数,相比于以往,能够精度良好地确定试样溶液中的粒子的浓度或数密度。根据逐个检测发光探针并对其个数进行计数来确定粒子浓度的、所述的目标粒子的定量方法,即使试样溶液中的发光探针的浓度是比根据荧光分光光度计或酶标仪测量到的

荧光强度能够确定的浓度更低的浓度,也能够定量地测定目标粒子。

[0081] 进一步,通过改变光学系统的光路、以光检测区域扫描试样溶液中的方式,不对试样溶液产生机械振动或流体力学作用,在使试样溶液均一或使试样溶液机械上稳定的状态下观察试样溶液内部。一般地说,在使样本流动的情况下,难以始终赋以一样的流速并且装置结构复杂。另外,必要的试样量大幅地增大,并且由于流动导致的流体力学的作用而溶液中的粒子、发光探针或结合体或者其他的物质有可能变质或变性。根据本实施方式,不对试样溶液施加机械振动和流体力学作用地进行测量,因此,例如与使试样发生流动的情况相比较,定量检测结果的可靠性提高。另外,对于试样溶液中的成为检测对象的粒子,能够在没有力学作用的影响或没有人为影响的状态下进行测量。

[0082] <用于扫描分子计数法的光分析装置的结构>

[0083] 如图1A中示意性的示例,能够通过基本结构中组合能够实施FCS、FIDA等的共聚焦显微镜的光学系统和光检测器而成的光分析装置实现扫描分子计数法。如图1A所示,光分析装置1具备光学系统2~17和用于控制光学系统的各部分的行为并获得、分析数据的计算机18。光分析装置1的光学系统可以与通常的共聚焦显微镜的光学系统相同。自光源2放射的在单模光纤3内传播的激光( $E_x$ )在光纤的射出端成为以固有的NA规定的角度发散的光而放射。放射的光通过准直仪4成为平行光,该平行光在分色镜5、反射镜6、7处发生反射,入射至物镜8。在物镜8的上方,典型地配置有分注了1~数十 $\mu\text{L}$ 的试样溶液的试样容器或排列有孔10的微孔板9。自物镜8射出的激光在试样容器或孔10内的试样溶液中聚焦,形成光强度强的区域(激发区域)。在试样溶液中分散或溶解有作为观测对象物的粒子、与该粒子结合的发光探针、典型地是带有荧光色素等发光标记的分子。当与发光探针结合或缔合的粒子(根据实施方式,与粒子暂时结合后从粒子解离出的发光探针)进入激发区域时,发光探针在这期间被激发而发出光。发出的光( $E_m$ )经过物镜8、分色镜5,在镜子11处反射,在聚光镜12处聚光。聚光的光通过小孔13,透过二次滤片14(在此,只选择特定的频带的光成分),被导入至多模光纤15而到达光检测器(光检测部)16。并且,在光检测器16中转换成按照时间顺序的电信号之后,输入至计算机18,进行用于后述的光分析的处理。如本领域技术人员已知那样,在所述的结构中,小孔13配置于与物镜8的焦点位置共轭的位置上。因此,仅图1B中示意地所示那样从激光的焦点区域即激发区域内发出的光通过小孔13,而来自激发区域以外的光被挡住。图1B所例示的激光的焦点区域通常是具有1~10fL左右的实际体积的、位于本光分析装置中的光检测区域(典型地,光强度呈现以区域的中心为顶点的高斯型分布或洛伦兹型分布。实际体积是以光强度为 $1/e^2$ 的面为界面的大致椭球体的体积。),被称为共焦区组织。另外,扫描分子计数法中,检测到来自一个粒子与发光探针的结合体或来自发光探针的光,例如,来自一个或数个荧光色素分子的微弱光。因此,光检测器16优选使用能够用于光子计数的超高灵敏度的光检测器。此外,为了改变欲进行观察的孔10,在显微镜的平台(没有图示)上可以设有用于移动微孔板9的水平方向位置的平台位置改变装置17a。可以通过计算机18控制平台位置改变装置17a的动作。通过该结构,即便被检体为多个,也能够实现快速的测量。

[0084] 进一步,在所述的光分析装置的光学系统中,设置有改变光学系统的光路、通过光检测区域扫描试样溶液内的机构,即,用于在试样溶液内移动焦点区域(即,光检测区域)的位置的机构。作为该用于移动光检测区域的位置的机构,例如如图1C示意性示例的,可以采

用改变反射镜7的方向的镜转向器17。该镜转向器17可以与装备在普通的激光扫描型显微镜中的检流计镜装置相同。另外,用于实现预期的光检测区域的位置移动模式的镜转向器17在计算机18的控制下,与光检测器16的光检测协调地被驱动。光检测区域的位置的移动轨迹可任意地选自圆形、椭圆形、矩形、直线、曲线或它们的组合。即,能够在计算机18的程序中选择各种移动模式即可。图中没有显示,但也可以通过上下移动物镜8而使光检测区域的位置沿上下方向移动。如上所述,通过不是移动试样溶液而是改变光学系统的光路来移动光检测区域的位置的结构,试样溶液内实质上不发生机械振动或流体力学的作用。其结果,能够排除对观测对象物的力学作用的影响,实现稳定的测量。

[0085] 当粒子与发光探针的结合体或发光探针通过吸收多光子而发光时,所述光学系统作为多光子显微镜使用。在此情况下,仅在激发光的焦点区域(光检测区域)中发出光,因此可以去除小孔13。此外,当粒子与发光探针的结合体或发光探针不依赖激发光而通过化学发光或生物发光现象发光时,可以省略用于产生激发光的光学系统2~5。当粒子与发光探针的结合体或发光探针通过磷光或散射发光时,直接使用所述共聚焦显微镜的光学系统。进一步,在光分析装置1中,如图所示,可以设置有多个激发光源2,可以根据用于激发粒子与发光探针的结合体或发光探针的光的波长,能够适当选择激发光的波长。同样地,也可以为如下结构:可以还设置有多个光检测器16,当试样中包含波长不同的多种粒子与发光探针的结合体或发光探针时,根据波长分别检测来自它们的光。

[0086] <扫描分子计数法的光分析技术的原理>

[0087] FIDA等光谱分析技术与现有的生物化学分析技术相比,其优点是必需的试样量非常少并且能够快速实施检查。然而,在FIDA等光谱分析技术中,原理上根据荧光强度的波动计算观测对象粒子的浓度或特性。因此,为了获得精度良好的测定结果,要求试样溶液中的观测对象粒子的浓度或数密度是如下水平:在荧光强度测量中在光检测区域CV内总是存在一个左右的观测对象粒子,在测量时间内总是检测到有意义的光强度(光子计数)。如果观测对象粒子的浓度或数密度低于所述时,例如,当观测对象粒子为只是偶尔进入光检测区域CV内的水平时,仅在一部分测量时间内出现有意义的光强度(光子计数),难以以良好的精度计算光强度的波动。此外,在观测对象粒子的浓度大幅地低于测量中在光检测区域内总是存在一个左右的观测对象粒子的水平时,光强度波动的运算易受背景的影响。进一步,为了获得对运算而言为充分量的有意义的光强度数据,测量时间延长。与此相对,用扫描分子计数法,即便当观测对象粒子的浓度低于FIDA等光谱分析技术要求的水平时,也能够检测观测对象粒子的数密度或浓度等特性。

[0088] 作为在扫描分子计数法的光分析技术中实施的处理,直接了当地说,是驱动用于移动光检测区域的位置的机构(光检测区域移动部:镜偏转器17)而改变光路,如在图2A中示意性地描述那样,一边在试样溶液内移动光检测区域CV的位置即利用光检测区域CV扫描试样溶液内,一边实施光检测。例如图2A所示,在光检测区域CV移动的期间(图中为时间 $t_0 \sim t_2$ ),当通过存在一个粒子(在图中,作为发光探针的荧光色素F与对象粒子T结合)的区域时( $t_1$ ),如图2B所描述那样检测出有意义的光强度( $E_m$ )。通过实施所述的光检测区域CV的位置的移动和光检测并一个一个地检测在此期间出现的图2B所例示的有意义的光强度,能够逐个检测发光探针、或发光探针所结合的目标粒子。在本实施方式中,针对直接进行检测的情况、即检测与目标粒子结合的发光探针的情况进行说明,但是也能够是间接地进行检

测的情况,即也能够检测发光探针暂时与目标粒子结合之后从粒子离解出的发光探针的光。

[0089] 通过对检测出的粒子的个数进行计数,能够得到与存在于所测量的区域内的粒子的个数或者浓度或数密度相关的信息。在该扫描分子计数法的光分析技术的原理中,不进行如荧光强度的波动的计算这类统计学运算处理而一个一个地检测粒子。因此,即便是欲观测粒子浓度低至无法用FIDA等以充分精度分析程度的试样溶液,也能够得到关于粒子的浓度或数密度的信息。

[0090] 另外,通过扫描分子计数法这类对试样溶液中的粒子逐个检测、计数的方法,与根据通过荧光分光光度计或酶标仪测量的荧光强度来测定被荧光标记的粒子的浓度的情况相比,能够以更低的浓度进行测定。当通过荧光分光光度计或酶标仪来测定被荧光标记的粒子的浓度时,通常假设荧光强度与被荧光标记的粒子的浓度成比例。然而,该情况下,被荧光标记的粒子的浓度充分低时,噪音信号的量相对于从被荧光标记的粒子发出的光的信号量变大(S/N比恶化)。其结果,被荧光标记的粒子的浓度与光信号量之间的比例关系瓦解,确定的浓度值的精度恶化。另一方面,扫描分子计数法在根据被检测的光信号检测对应于各个粒子的信号的工序中,从检测结果中排除了噪音信号,只将对应于各个粒子的信号进行计数来计算浓度。因此,与假设荧光强度与被荧光标记的粒子的浓度成比例而检测浓度的情况相比较,能够检测至更低的浓度。

[0091] <利用扫描分子计数法的试样溶液的光强度的测定>

[0092] 对于扫描分子计数法的光分析中的光强度的测定,除了在测定中驱动镜转向器17来在试样溶液内移动光检测区域的位置(试样溶液内部的扫描)以外,可以以与FCS或FIDA中的光强度测定工序相同的方式实施光强度测定。在操作处理中,典型地,在微孔板9的孔10中注入试样溶液而载置于显微镜的平台上之后,使用者对计算机18输入测定开始指示。计算机18根据存储装置(没有图示)存储的程序,开始试样溶液内光检测区域中的激发光的照射以及光强度的测量。该程序包括为了在试样溶液内移动光检测区域的位置而对光路进行改变的过程(改变过程)、和在光检测区域的位置的移动中检测来自光检测区域的光的过程(光检测过程)。在该测量中,在根据计算机18的程序的处理操作的控制下,镜偏向器17驱动镜7(检电镜),在孔10内实施光检测区域的位置的移动。与此同时,光检测器16将逐次检测到的光转换为电信号,传送给计算机18。计算机18以任意方式从送达的光信号生成按照时间顺序的光强度数据并保存。典型地光检测器16为能够检测到单光子到达的超高灵敏度光检测器,因此,光的检测是以如下方式实施的光子计数:在规定时间内,间隔规定的单位时间(BINTIME)如每10 $\mu$ 秒逐次地测量到达光检测器的光子的个数。按照时间顺序的光强度的数据可以为按照时间顺序的光子计数数据。

[0093] 光强度测量中的光检测区域的位置移动速度可以是任意地、例如通过实验或以适合分析目的的方式设定的规定速度。当根据所检测到的观测对象粒子的个数获得与其数密度或浓度相关的信息时,光检测区域所经过的区域的大小或体积是必需的。因此,以掌握移动距离的方式实施光检测区域的位置移动。测量中的经过时间与光检测区域的位置的移动距离成比例关系的方式,能够容易地解释测定结果,所以,移动速度基本上优选为恒定速度,然而,移动速度不限于于此。

[0094] 此外,对于光检测区域的位置的移动速度,为了从测量到的按照时间顺序的光强

度数据逐个检测观测对象粒子,或以良好的精度定量实施观测对象粒子的个数的计数,优选将所述的移动速度设定为比观测对象粒子的随机运动即布朗运动导致的移动速度更快的值。更严密地,观测对象粒子是指粒子与发光探针的结合体或者与粒子结合后分解而游离的发光探针,本发明的一个实施方式中,为与发光探针结合的目标粒子。扫描分子计数法的光分析技术的观测对象粒子是分散或溶解在溶液中的自由地随机运动的粒子,因此,由于布朗运动,位置随时间而移动。因此,在光检测区域的位置的移动速度比粒子的布朗运动导致的移动慢时,如图3A示意地描述那样,粒子在区域内随机地移动。因此,光强度如图3B所示那样随机地变化,难以确定对应于各个观测对象粒子T的有意义的光强度的变化。具体来说,如上所述,光检测区域的激发光强度以区域的中心为顶点向外侧降低。因此,优选如图4A所描述那样粒子(荧光色素F以及对象粒子T)大致直线地横穿光检测区域。因此,在按照时间顺序的光强度数据中,如图4B例示那样,对应于各个粒子的光强度变化的轮廓大致一样。另外,为了能够容易地确定各个观测对象粒子T与光强度的对应,将光检测区域的位置的移动速度设定为快于粒子的布朗运动导致的平均的移动速度(扩散移动速度)。在此,在粒子大致直线地通过光检测区域的情况下,光强度变化的轮廓与激发光强度分布大致相同。

[0095] 具体而言,由于布朗运动,具有扩散系数D的观测对象粒子(更严密地是粒子与发光探针的结合体、或与粒子结合后分解而游离的发光探针)经过半径 $W_0$ 的光检测区域(共焦区组织)时所需的时间 $\Delta t$ 根据均方位移的关系式

$$[0096] \quad (2W_0)^2 = 6D \times \Delta t \quad (1)$$

[0097] 成为

$$[0098] \quad \Delta t = (2W_0)^2 / 6D \quad (2)$$

[0099] 因此,观测对象粒子通过布朗运动移动的速度(扩散移动速度) $V_{dif}$ 大约是

$$[0100] \quad V_{dif} = 2W_0 / \Delta t = 3D / W_0 \quad (3)$$

[0101] 此处,光检测区域的位置的移动速度可以参考扩散移动速度 $V_{dif}$ 而设定为与之相比足够快的值。例如,在假定观测对象粒子的扩散系数为 $D = 2.0 \times 10^{-10} \text{m}^2/\text{s}$ 左右的情况下,如果将 $W_0$ 设为 $0.62 \mu\text{m}$ 左右,则 $V_{dif}$ 为 $1.0 \times 10^{-3} \text{m/s}$ ,因此,光检测区域的位置的移动速度可以设定为其大致10倍的 $15 \text{mm/s}$ 。当观测对象粒子的扩散系数未知时,可以对光检测区域的位置移动速度进行各种设定,重复实施用于发现光强度变化的轮廓成为预期轮廓(典型地是与激发光强度分布大致相同)的条件的预备实验,确定适当的光检测区域的位置的移动速度。

[0102] <利用扫描分子计数法的光强度的分析>

[0103] 经所述处理获得试样溶液的按照时间顺序的光强度数据时,可以在计算机18中,通过按照存储在存储装置中的程序进行的处理(从检测到的光逐个检测来自各个发光粒子的光信号的过程),实施如下所述的光强度的分析。

[0104] (i) 一个观测对象粒子的检测

[0105] 在按照时间顺序的光强度数据中,在一个观测对象粒子经过光检测区域时的轨迹是如图4A所示那样大致直线状时,与该粒子相对应的光强度变化如图6A示意性地描述那样,具有反映(由光学系统决定的)光检测区域的光强度分布的轮廓(通常、大致吊钟状)。因此,在观测对象粒子的检测的手法之一中,可以对光强度设定阈值 $I_0$ ,超过该阈值的光强度

持续时间宽度  $\Delta \tau$  在规定的范围时,判定为该光强度的轮廓与一个粒子通过光检测区域相对应而进行一个观测对象粒子的检测。对于光强度的阈值  $I_0$  以及对于时间宽度  $\Delta \tau$  的范围是根据预想为从观测对象粒子与发光探针的结合体(或者与粒子结合后分解而游离的发光探针)所发出的光的强度的轮廓而决定的,所述观测对象粒子与发光探针的结合体相对于光检测区域以规定的速度相对地移动。具体的值可以通过实验任意地设定,也可以根据观测对象粒子与发光探针的结合体(或者与粒子结合后分解而游离的发光探针)的特性而选择性地决定。

[0106] 此外,作为观测对象粒子的检测的其他方法,光检测区域的光强度分布能够假定为高斯分布:

$$[0107] \quad I = A \times \exp(-2t^2/a^2) \quad (4)$$

[0108] 在对有意义的光强度的轮廓(可以明确判断为非背景的轮廓)拟合式(4)而计算出的强度  $A$  和宽度  $a$  落入规定范围内时,可判断为该光强度的轮廓对应于一个观测对象粒子经过了光检测区域而进行一个观测对象粒子的检测。当强度  $A$  和宽度  $a$  落在规定范围之外时,可以作为噪音或异物而在分析中无视。

[0109] (ii) 观测对象粒子的计数

[0110] 对于观测对象粒子的计数,可以是任意方法计数通过所述观测对象粒子的检测方法检测到的粒子的个数(发光粒子数计数过程)来进行。然而,当粒子的个数大时,可以通过例如图5和图6B所示例的处理来进行。

[0111] 参照图5和图6B,在根据按照时间顺序的光强度(光子计数)数据进行粒子计数的方法的一个例子中,在进行上述说明的光强度测定、即用光检测区域扫描试样溶液内和进行光子计数而获得按照时间顺序的光信号数据(光子计数数据)后(步骤100),对该按照时间顺序的光信号数据(图6B最上部分“检测结果(未处理)”),进行SMOOTHING(平滑化)处理(步骤110,图6B中上部分“SMOOTHING”)。粒子和发光探针的结合体或发光探针发出的光是概率地发出的,在微小的时间内可能产生数据值的欠缺,但是,通过平滑化处理,能够无视如前述的数据值的欠缺。平滑化处理可以例如通过移动平均法而进行。可以根据获得光信号数据时的光检测区域的位置移动速度(扫描速度)、BIN TIME,适当设定实施平滑化处理时的参数、例如在移动平均法中一次取平均的数据点数或移动平均的次数等。

[0112] 然后,为了在平滑化处理后的按照时间顺序的光信号数据中检测存在有意义的信号的时间区域(峰存在区域),运算平滑化处理后的按照时间顺序的光信号数据的时间的一阶微分值(步骤120)。按照时间顺序的光信号数据的时间微分值如图6B中下部分的“时间微分”所例示那样,信号值变化时间点处的值的变化变大,因此通过参考该时间微分值能够有利地确定有意义的信号(峰信号)的起点和终点。

[0113] 之后,在按照时间顺序的光信号数据上,逐次检测有意义的信号(峰信号),判断检测到的峰信号是否是观测对象粒子相对应的信号。具体而言,首先,在按照时间顺序的光信号数据的按照时间顺序的时间微分值数据上,逐次地参照时间微分值,搜索并确定一个峰信号的始点和终点,从而确定峰存在区域(步骤130)。当确定了一个峰存在区域时,对该峰存在区域中的平滑化的按照时间顺序的光信号数据进行吊钟形函数拟合(图6B下部分的“吊钟形函数拟合”)。然后,计算吊钟形函数的峰强度  $I_{max}$ 、峰宽度(半高全宽(full width half maximum))  $w$ 、拟合中的(最小二乘法的)相关系数等参数(步骤140)。拟合的吊钟形函

数典型地是高斯函数,也可以是洛伦兹型函数。然后,判断计算出的吊钟形函数的参数是否落入针对一个粒子与发光探针的结合体或发光探针经过光检测区域时检测到的光信号所描述的吊钟形轮廓的参数想定的范围内,即,峰强度、峰宽度、相关系数是否分别落入规定范围内等(步骤150)。如图7左侧所示,对于被判断为计算出的吊钟形函数的参数落入对与一个粒子和发光探针的结合体或者与发光探针对应的信号想定的范围内的信号,判定为是与一个观测对象粒子对应的信号。由此,检测到一个观测对象粒子,计数为一个粒子(粒子数的计数增加。步骤160)。另一方面,如图7右侧所示,将计算出的吊钟形函数的参数不在想定范围内的峰信号(附加为“噪声”的信号)作为噪音或者异物所导致的信号而无视。

[0114] 所述的步骤130~160的处理中的峰信号的搜索和判定可以在按照时间顺序的光信号数据的整个区域内重复地实施,每检测到一个观测对象粒子,就作为粒子而计数。然后,在结束对按照时间顺序的光信号数据的全部区域的峰信号搜索后(步骤170),将到此为止所获得的粒子计数值作为在按照时间顺序的光信号数据中检测到的观测对象粒子的个数。

[0115] (iii)观测对象粒子的数密度或浓度的确定

[0116] 进行了观测对象粒子的计数后,使用在获得按照时间顺序的光信号数据的过程中光检测区域所经过的区域的总体积,确定观测对象粒子的数密度或浓度。然而,光检测区域的实际体积依赖于激发光或检测光的波长、透镜的数值孔径、光学系统的调整状态而改变,因此,通常难以从设计值算出光检测区域的实际体。因此,计算光检测区域所经过的区域的总体积也不简单。在此,典型地是,在与欲要检查的试样溶液的测定相同的条件下,对已知粒子浓度的溶液(参照溶液)进行上文说明的光强度测定、粒子的检测和计数。也可以根据检测到的粒子的个数和参照溶液的粒子的浓度,确定光检测区域所经过的区域的总体积,即确定观测对象粒子的检测数和浓度之间的关系。

[0117] 作为参照溶液的粒子,可以优选为与观测对象粒子所形成的粒子和发光探针的结合体(或与观测对象粒子结合后游离的发光探针)具有相同发光特性的发光标记(荧光色素等)。具体而言,例如,对于粒子浓度为C的参照溶液,当将其粒子的检测数设为N时,光检测区域所经过的区域总体积 $V_t$ 则根据

$$[0118] \quad V_t = N/C \quad (5)$$

[0119] 而得到。另外,准备多个不同浓度的溶液作为参照溶液,对各参照溶液实施测定,将计算出的 $V_t$ 的平均值作为光检测区域所经过区域的总体积 $V_t$ 而采用。并且,当得到 $V_t$ 值时,粒子的计数结果为n的试样溶液的粒子的数密度c根据

$$[0120] \quad c = n/V_t \quad (6)$$

[0121] 而获得。可以不通过所述方法,而利用任意方法例如FCS、FIDA等得到光检测区域的体积、光检测区域所经过区域的总体积。此外,本实施方式的光分析装置也可以是如下结构:对于想定的光检测区域的移动模式,将各种标准粒子的浓度C和粒子数N之间的关系(式(5))的信息预先存储在计算机18的存储装置中,装置的使用者在实施光分析时能够适当利用存储的关系信息。

[0122] <目标粒子的定量方法>

[0123] 本发明的一个实施方式所涉及的目标粒子的定量方法是对在试样溶液中分散且随机运动的目标粒子进行定量的方法,使发光探针结合试样溶液中的目标粒子来对其进行

标识。其特征在于,之后,根据通过扫描分子计数法计数出的与发光探针结合的目标粒子的个数,基于使用目标粒子的浓度已知的标准试样制作出的检量线,计算该试样溶液中的目标粒子的浓度(浓度计算过程)。扫描分子计数法是在分子离散的状况下能够按每一个粒子测量发光粒子的测定方法,因此针对pM数量级以下的浓度比较低的发光粒子也能够进行测定。因此,根据本发明的一个实施方式所涉及的目标粒子的定量方法,即便在试样溶液中的解析对象的目标粒子的浓度非常低的情况下,也能够高灵敏度地对目标粒子进行计数。并且,本发明的一个实施方式所涉及的目标粒子的定量方法通过将目标粒子与发光探针结合起来检测目标粒子,但是由于使用检量线,因此能够更简单且容易地求出试样溶液中的目标粒子的浓度。

[0124] 另外,目标粒子的定量方法也可以包括根据检测出的发光粒子的个数来确定试样溶液中的所述发光粒子的数密度或浓度的过程。

[0125] 具体而言,本发明的一个实施方式所涉及的目标粒子的定量方法具有下述工序(a)~(c)。

[0126] (a)调制包含所述目标粒子和与所述目标粒子结合的发光探针的试样溶液,使所述目标粒子与所述发光探针在所述试样溶液中结合。

[0127] (b)对在所述工序(a)中调制出的溶液中存在的所述目标粒子的个数进行计数。

[0128] (c)根据对所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度或量与所述目标粒子的所述个数之间的相关关系进行近似的检量线,基于在所述工序(b)中计数出的所述目标粒子的所述个数来计算所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度。

[0129] 并且,所述工序(b)具有以下工序:移动工序,使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统,使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;以及检测工序,一边使所述光学系统的所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动,一边检测从所述光检测区域中的所述发光探针发出的光信号,来逐个地检测所述目标粒子。下面,按各工序进行说明。

[0130] 首先,作为工序(a),调制包含目标粒子和与该目标粒子结合的发光探针的试样溶液,使所述目标粒子与所述发光探针在该试样溶液中结合。

[0131] 在本发明的一个实施方式中,“在试样溶液中分散并随机运动的粒子”是指在试样溶液中分散或溶解的原子、分子或者它们的聚集体等粒子(可以为发光的粒子和不发光的粒子中的任一者),是指非固定于基板等而在溶液中自由地进行布朗运动的粒子。

[0132] 目标粒子为在试样溶液中分散并随机运动的粒子,是定量该试样溶液中的浓度的目的粒子。作为目标粒子,可列举出例如:蛋白质、肽、核酸、核酸类似物质、脂质、糖链、氨基酸或它们的聚集体等生物分子、病毒、细胞等粒子状的生物学的对象物或非生物学的粒子(例如:原子、分子、胶束、金属胶体等)等。核酸可以为DNA,也可以为RNA,也可以为cDNA这样的人工扩增物质。

[0133] 核酸类似物质可列举DNA或RNA这类天然类型核苷酸(天然存在的核苷酸)的侧链等被氨基等官能团修饰的物质、用蛋白质或低分子化合物等标记的物质等。更具体而言,可列举出例如:交联核酸(BNA,Bridged nucleic acid)、天然型核苷酸的4'位氧原子被硫原子取代的核苷酸、天然型核糖核苷酸的2'位羟基被甲氧基取代的核苷酸、己糖醇核酸(HNA,Hexitol Nucleic Acid)、肽核酸(PNA)等。

[0134] 另外,在本发明的一个实施方式中使用的发光探针为与目标粒子特异地或非特异地结合或者吸附的物质,只要是在与目标粒子结合的状态和单独存在的状态下发出的光的发光特性不同的物质,就没有特别地限定。例如,也可以为使发光物质结合在与目标粒子特异地或非特异地结合或者吸附的物质上。作为发光物质,典型地为荧光性物质,但也可以为通过磷光、化学发光、生物发光、光散射等发出光的物质。作为荧光物质,只要是由特定波长的光照射而发出荧光的物质,则没有特别地限定,能够从用于FCS或FIDA等的荧光色素中适当地选择使用。

[0135] 例如,目标粒子为核酸或核酸类似物质的情况下,发光探针可列举出:使与目标粒子杂交的寡核苷酸结合荧光物质等发光物质而成的物质、结合有荧光物质等发光物质的核酸结合性蛋白质、与核酸结合的色素分子等。作为寡核苷酸,可以为DNA,也可以为RNA,也可以为cDNA这样的人工扩增物质,也可以包含部分或全部核酸类似物质,所述核酸类似物质能够与天然的核酸碱基同样地形成核苷酸链或碱基对。另外,目标粒子为蛋白质的情况下,作为发光探针,可以使用将目标粒子的抗原或抗体、目标粒子的配体或受体用荧光物质等发光物质标记了的物质。与核酸、蛋白质等目标粒子特异或非特异地结合或吸附的物质同发光物质的结合能够通过常规方法进行。

[0136] 在本发明的一个实施方式中使用的发光探针可以为与目标粒子非特异地结合等的物质,但是从目标粒子的检测/定量的精度的观点出发,优选特异地结合等的物质。作为与目标粒子特异地结合的发光探针,只要是相比于物理或化学的性质与目标粒子类似的其他物质而更优先与目标粒子结合的物质,则不需要是与除了目标粒子以外的物质完全不结合的物质。例如,目标粒子为核酸的情况下,被作为发光探针使用的发光物质标记的寡核苷酸既可以具有与目标粒子的碱基序列完全地互补的碱基序列,也可以具有与该目标粒子的碱基序列错配的碱基序列。

[0137] 另外,在与目标粒子结合的状态以及单独存在的状态下发光探针的发光特性不同是指在与目标粒子结合的状态以及单独存在的状态下,特定的波长的光强度不同。使发光探针在单独存在的状态以及与目标粒子结合的状态下特定波长的光的强度不同(例如,使荧光强度不同),由此能够在扫描分子计数法中区别地检测出两者。

[0138] 目标粒子为蛋白质的情况下,与蛋白质结合且改变周围环境时荧光强度、荧光波长变化的色素(例如,疏水性探针ANS、MANS、TNS这类的荧光色素)能够作为发光探针使用。另外,发光探针也可以其自身不发光。例如,在目标粒子为核酸或核酸类似物质的情况下,使用与目标粒子杂交的寡核苷酸作为发光探针,在试样溶液中与发光探针一起添加与双链结构特异地结合的荧光性双链核酸结合物质。由此,能够在发光探针单独存在的状态(非结合状态)以及与目标粒子结合的状态(结合状态)下使发光特性不同。作为与双链结构特异地结合的荧光性双链核酸结合物质,可列举出荧光性嵌入剂或结合了荧光物质的沟结合剂等。

[0139] 其他的,也可以使用例如由至少两个构成要素形成的、通过与目标粒子结合使前述的至少两个构成要素的相互位置变化而发出荧光的物质作为发光探针。作为这样的物质的例子,可列举出与某粒子结合时结构变化而发出强的荧光的荧光性蛋白质、或者与某粒子结合时聚集而形成荧光性金属络合物的分子(络合物的配体)。通过该结构,在所有情况下,单独的发光探针或不与目标粒子结合的发光探针均几乎不发光,或者即便发光也由于

与目标粒子和发光探针的结合体的波长不同而能够选择地检测从目标粒子和发光探针的结合体发出的光。

[0140] 另外,通过利用荧光能量转移现象(FRET),能够使试样溶液中单独存在的发光探针、和与目标粒子结合的状态的发光探针的发光特性不同。例如,使在FRET中成为能量供体的荧光物质和成为能量受体的物质(荧光物质、猝灭物质)以在发光探针单独存在的状态下产生FRET且在与目标粒子结合的状态下不产生FRET的条件结合在与目标粒子结合的物质上。由此,该结合物质能够用作发光探针。与目标粒子结合后的发光探针不再产生FRET,所以从成为能量供体的荧光物质发出荧光。另外,从单独存在的发光探针中,检测不到从成为能量供体的荧光物质发出的荧光,或检测到的荧光是减弱的。因此,通过检测从成为能量供体的荧光物质发出的荧光,能够与单独存在的发光探针区别地检测与发光探针结合的目标粒子。

[0141] 例如,在目标粒子为核酸或核酸类似物质的情况下,以在单链核酸分子的状态下产生FRET且在与其它单链核酸分子杂交形成缔合体的状态下不产生FRET的条件,使FRET中成为能量供体的荧光物质和成为能量受体的物质结合在当为单链核酸分子的状态时形成分子内结构体的寡核苷酸上来形成分子信标探针。能够优选使用该分子信标探针作为发光探针。本发明的一个实施方式中优选的是:3'末端侧结合有成为能量供体的荧光物质或成为能量受体的物质、5'末端侧结合有剩余的另一者并且3'末端侧区域和5'末端侧具有彼此互补的碱基序列,这些碱基序列形成碱基对由此形成分子内结构(所谓的茎-环结构)的物质。分子信标探针的形成分子内碱基对的彼此互补的区域,夹着与目标粒子杂交的区域而存在即可,3'末端侧的区域和5'末端侧的区域既可以为分别包含3'末端或5'末端的区域,也可以为不包含3'末端或5'末端的区域。此外,对于形成碱基对的区域的碱基数或碱基序列,为所形成的碱基对的稳定性低于与目标粒子的缔合体的稳定性、且在测定条件下能够形成碱基对的程度即可。

[0142] 另外,使用与双链结构特异地结合的荧光性双链核酸结合物质,即便该荧光性双链核酸结合物质与标记了发光探针的荧光物质之间产生FRET,也能够区别单独存在的发光探针和与目标粒子结合的发光探针。即,荧光性双链核酸结合物质和标记了发光探针的荧光物质中的任一者成为FRET的能量供体,另一者成为FRET的能量受体。从单独存在的发光探针检测到由标记该发光探针的荧光物质发出的荧光。与此相对,与目标粒子结合的发光探针和荧光性双链核酸结合物质结合,所以从结合体能够检测到由于FRET而发出的荧光,结果是能够与单独存在的发光探针相区别来进行检测。

[0143] 此外,当进入发光探针与目标粒子的缔合体的碱基对之间的荧光性嵌入剂的量过多时,检测由于FRET而发出的荧光时的背景变得过高,有可能影响检测精度。因此,优选将发光探针设计成在发光探针与目标粒子的缔合体中形成双链的区域为400bp以下。

[0144] 其他的,在本发明的一个实施方式中,也可以使用两种发光探针。例如,在目标粒子为核酸或核酸类似物质的情况下,将两种发光探针设计成相对于目标粒子相互邻接而杂交。并且,将一者的发光探针用FRET中的成为能量供体的荧光物质标记,将另一者的发光探针用该FRET中的成为能量受体的物质标记。该情况下,单独存在的发光探针不产生FRET,而通过与目标粒子结合,所述两种发光探针相互接近(例如,两种发光探针的间隔约为1nm~10nm)而产生FRET。因此,通过检测由于FRET而发出的荧光,能够检测出目标粒子。

[0145] 具体而言,工序(a)首先将目标粒子和发光探针添加到适当的溶剂中来调制试样溶液。该溶剂如果是不妨碍从发光探针发出的光的检测以及利用扫描分子计数法对发光探针的检测的溶剂,就不特别地进行限定,能够从在本技术领域一般使用的缓冲液中适当地选择使用。作为该缓冲液,例如有PBS(磷酸缓冲生理盐水、pH7.4)等磷酸缓冲液、Tris缓冲液等。

[0146] 在只是使目标粒子与发光探针共存于相同的溶液中就能够使两者结合的情况下,调制试样溶液之后,只需根据需要以规定时间孵育该试样溶液,就能使目标粒子与发光探针在试样溶液中结合。

[0147] 另一方面,在目标粒子、发光探针为双链结构的核酸或者核酸类似物质的情况下,优选使试样溶液中的核酸等变性之后使两者缔合。“使核酸或核酸类似物质变性”是指使碱基对解离。例如,是指使分子信标探针中彼此互补的碱基序列所形成的碱基对解离而解开分子内结构成为单链结构,或使双链核酸分子成为单链核酸分子。当发光探针是包含PNA等核酸类似物质的寡核苷酸时,即便目标粒子是双链核酸分子,有时不进行特别的变性处理也能够形成包含该发光探针和目标粒子的缔合体。

[0148] 作为变性处理,可列举出利用高温处理的变性(热变性)或利用低盐浓度处理的变性等。其中,热变性对于荧光物质等发光物质的影响比较小且操作简便,所以优选进行热变性。具体而言,热变性中,能够通过对于试样溶液实施高温处理而使该试样溶液中的核酸等变性。通常地,DNA在90℃下、RNA在70℃下保温数秒至2分钟左右,能够使之变性,但根据目标粒子的碱基的长度等进行变性的温度不同,只要能够变性,就对其温度没有限定。另一方面,通过低盐浓度处理进行变性能够通过例如利用纯水等稀释而将该试样溶液的盐浓度调整至足够低来进行。

[0149] 根据需要进行了变性之后,使前述试样溶液中的目标粒子与发光探针缔合。当进行了热变性时,在高温处理后,使该试样溶液的温度降至目标粒子能够与发光探针特异地杂交的温度,由此能够使该试样溶液中的两者适当缔合。另外,当通过低盐浓度处理进行了变性时,通过添加盐溶液等使该试样溶液的盐浓度升高至目标粒子能够与发光探针特异地杂交的浓度,由此能够使该试样溶液中的两者适当缔合。

[0150] 能够根据两者形成的缔合体的熔解曲线求出两条单链核酸分子能够特异地杂交的温度。例如能够使仅含有两者的溶液的温度从高温向低温变化,测定该溶液的吸光度或荧光强度来求出熔解曲线。根据所获得的熔解曲线,能够将从变性的两条单链核酸分子开始形成缔合体的温度至几乎全部成为缔合体的温度这一范围内的温度,作为两者能够特异地杂交的温度。通过代替温度而使溶液中的盐浓度自低浓度向高浓度变化,同样能够确定熔解曲线,求出两条单链核酸分子能够特异地杂交的浓度。

[0151] 通常能够用 $T_m$ 值(熔解温度)代替两条单链核酸分子能够特异地杂交的温度。例如,利用普遍使用的引物/探针设计软件等,根据发光探针的碱基序列信息,能够计算与目标粒子杂交的区域的 $T_m$ 值(双链DNA的50%解离为单链DNA的温度)。

[0152] 此外,为了抑制非特异杂交,在形成缔合体时,优选使试样溶液的温度较缓慢地下降。例如,使试样溶液温度为70℃以上而使核酸分子变性后,能够按0.05℃/秒以上的降温速度降低该试样溶液的液温。

[0153] 此外,为了抑制非特异地杂交,优选预先在试样溶液中添加表面活性剂、甲酰胺、

二甲亚砷或尿素等。这些化合物可以只添加一种,也可以组合添加2种以上。通过添加这些化合物,在较低温度环境下也能够防止非特异地杂交的发生。

[0154] 之后,作为工序(b),通过扫描分子计数法对调制出的试样溶液中的目标粒子的个数进行计数。具体而言,将使目标粒子与标识用探针结合之后的试样溶液设置在用于前述扫描分子计数法的光分析装置中,通过所述方法,检测从标识用探针发出的光并进行解析。由此计算目标粒子的个数。

[0155] 在工序(a)之后,作为工序(d),从所述试样溶液中,与未与所述目标粒子结合的发光探针相分离来回收所述复合体。在使用逐个检测用发光探针标识的目标粒子的光分析技术的本发明的一个实施方式的方法中,如果来自以游离的发光探针为代表的未与目标粒子结合的发光探针的光没有与来自发光探针的光区分开而被检测到,则导致目标粒子的检测精度变差。因此,在工序(d)中,从所述复合体中去除以游离的发光探针为代表的未与目标粒子结合的发光探针。

[0156] 对于与未与目标粒子结合的发光探针相分离来回收所述复合体的方法,没有特别地进行限定,在利用大小或分子量、针对任意的物质的亲和性、带电状态等的差异来将多个物质物理分离时,能够从所述技术领域通常进行的物质分离方法中适当地选择实施。作为所述分离方法,例如列举出包含吸附、抽出或清洗的操作。具体地说,列举有色谱(亲水/疏水性色谱、亲和色谱、离子交换色谱等)、超滤、电泳、相分离、离心分离、溶剂抽出、过滤吸附等。

[0157] 也能够利用与发光探针相独立地与目标粒子结合的分离用探针,与未与目标粒子结合的发光探针相分离来回收所述复合体。具体地说,在工序(a)中,在所述试样溶液中还添加分离用探针,形成包含目标粒子、发光探针以及分离用探针的复合体。接着,在工序(d)中,利用所述复合体中的分离用探针与其它物质的相互作用,将所述复合体与未与目标粒子结合的发光探针相分离来进行回收。

[0158] 分离用探针只要是独立于发光探针而与目标粒子特异地或非特异地结合或吸附的物质,就不特别地进行限定。所述分离用探针也可以通过其它的物质间接地与目标粒子结合,但是优选与目标粒子直接结合的物质。作为能够用作分离用探针的直接与目标粒子特异地或非特异地结合或吸附的物质,与发光探针中所列举的物质中的发光物质结合之前的物质相同。例如在目标粒子是核酸分子或核酸类似物质的情况下,是与目标粒子杂交的寡核苷酸,在目标粒子是蛋白质的情况下,是目标粒子的抗原或抗体、目标粒子的配体或受体。

[0159] 作为在本发明的一个实施方式中使用的分离用探针,优选具有与固相载体结合的部位,在与目标粒子结合的状态下进一步与固相载体直接或间接结合。在使用所述分离用探针的情况下,通过使用与分离用探针直接或间接结合的固相载体的固液分离处理,能够更简单地进行工序(d)中的复合体的回收以及以后的工序(e)中的游离的发光探针的回收。

[0160] 作为固相载体,只要是具备与分离用探针结合的部位,其形状、材质等就不特别地进行限定。例如可以是珠粒等能够悬浮于水且通过通常的固液分离处理能够与液体分离的粒子,也可以是薄膜,还可以是容器、芯基板等。作为固相载体,具体而言,例如列举有磁珠、硅珠、琼脂糖凝胶珠、聚丙烯酰胺树脂珠、乳胶珠、聚苯乙烯珠等塑胶珠、陶瓷珠、氧化锆珠、硅胶模、硅胶过滤器、塑胶板等。

[0161] 例如在分离用探针是寡核苷酸的情况下,能够使用表面结合有与所述寡核苷酸中的与目标粒子杂交的区域以外的区域杂交的寡核苷酸的珠粒、过滤器作为固相载体。另外,在分离用探针具有生物素(biotin)作为与固相载体结合的部位的情况下,能够使用表面结合有抗生物素蛋白、链霉抗生物素蛋白的珠粒、过滤器来作为固相载体。另外,在分离用探针中的与固相载体结合的部位是谷胱甘肽(Glutathione)、DNP(dinitrophenol)、地高辛配基(digoxigenin、Dig)、地高辛(digoxin)、由两个以上的糖构成的糖链、由四个以上的氨基酸构成的多肽、生长素、赤霉素、类固醇、蛋白质、亲水性有机化合物以及它们的类似物等的情况下,能够使用表面结合有这些物质的抗体、抗原、配体、或受体的珠粒、过滤器作为固相载体。此外,固相载体可以与分离用探针非特异地结合等,但是从目标粒子的检测、定量的精度的观点出发,优选特异地结合等。

[0162] 具体而言,使固相载体接触所述试样溶液,并根据需要进行孵育,由此所述试样溶液中的包含目标粒子、发光探针以及分离用探针的复合体通过所述复合体中的分离用探针来与固相载体结合。之后,通过进行固液分离处理,能够将与固相载体结合的复合体分离于游离的发光探针等未与以液相存在的目标粒子结合的发光探针来进行回收。

[0163] 作为固液分离处理,只要是能够将试样溶液中的固相载体与液体成分相分离来进行回收的方法,就不特别地进行限定,能够从使用于固液分离处理的公知的处理中适当地选择使用。例如在固相载体是珠粒等粒子的情况下,也可以针对包含固相载体的悬浮液进行离心分离处理,使固相载体沉淀来去除上清液。另外,也可以利用滤纸或过滤器对所述试样溶液进行过滤,将残留在滤纸等的表面的固相载体回收。另外,在固相载体是磁珠的情况下,使磁铁接近放入有所述试样溶液的容器,在使固相载体会聚至所述容器的最接近所述磁体的面之后,去除上清液。在内壁被与分离用探针结合的物质覆盖的容器是固相载体的情况下,将包含所述复合体的试样溶液注入到所述容器内,并根据需要进行孵育,之后将所述容器内的液体排出。此外,在固相载体是薄膜、过滤器的情况下,通过使包含所述复合体的试样溶液透过所述固相载体,能够通过一个操作进行固相载体与所述复合体的结合以及所述复合体与未与目标粒子结合的发光探针的分离和回收。

[0164] 在本发明的一个实施方式中,在工序(a)中,也可以将固相载体与目标粒子、发光探针以及分离用探针一起预先添加到试样溶液中,形成与固相载体结合的包含目标粒子、发光探针以及分离用探针的复合体,之后进行固液分离处理,由此将与固相载体结合的所述复合体分离于未与目标粒子结合的发光探针并回收。另外,在工序(a)中,也可以预先添加与固相载体结合的状态下的分离用探针、目标粒子以及发光探针来调制试样溶液。此外,此时使用的分离用探针与固相载体可以可逆结合,也可以不可逆结合。

[0165] 通过针对所回收的固相载体添加适当的溶剂,来调制包含与固相载体结合的复合体的试样溶液。对于所回收的固相载体,以包含其的试样溶液的方式提供给工序(e)。所述溶剂只要是在后面的工序中不妨碍从发光探针发出的光的检测的溶剂,就不特别地进行限定。能够从在所述技术领域通常使用的缓冲液中适当地选择使用。作为所述缓冲液,例如有PBS(磷酸缓冲生理盐水、pH7.4)等磷酸缓冲液、Tris缓冲液等。

[0166] 所回收的固相载体也可以在工序(e)之前通过适当的溶剂进行清洗。通过清洗,能够将游离的发光探针更严格地分离于与固相载体结合的复合体而去除。清洗固相载体的溶剂只要不破坏复合体与固相载体的结合,就不进行限定,可以与调制包含与提供给工序(e)

的固相载体结合的复合体的试样溶液时使用的溶剂相同,也可以是不同的溶剂。

[0167] 之后,作为工序(e),从在工序(d)中所回收的复合体离解出所述发光探针,之后将游离的发光探针与所述目标粒子相互分离来进行回收。

[0168] 使复合体中的发光探针离解出的方法只要是能够解除所述复合体中的目标粒子与发光探针的结合的方法,就不特别地进行限定。

[0169] 例如目标粒子是由核酸分子或核酸类似物质构成的寡核苷酸,在发光探针中的与目标粒子结合的部位是由核酸分子或核酸类似物质构成并与目标粒子杂交的寡核苷酸的情况下,使包含所述复合体的试样溶液的温度充分地高于目标粒子与发光探针的特异地缔合条件,或者使包含所述复合体的试样溶液的盐浓度充分地低于目标粒子与发光探针的特异地缔合条件。由此,能够解除发光探针与目标粒子的结合,使发光探针从所述复合体离解出。

[0170] 将离解出的发光探针与单体或形成复合体的目标粒子相互分离来进行回收的方法不特别地进行限定,考虑到发光探针与单体的目标粒子或包含目标粒子的复合体的大小差异、针对任意物质的亲和性的差异等,能够从所述技术领域通常进行的物质分离方法中适当地选择实施。具体地说,例举出色谱(亲水/疏水性色谱、亲和色谱、离子交换色谱等)、超滤、电泳、相分离、离心分离、溶剂抽出、过滤吸附等。

[0171] 图8是示意性地表示使用分离用探针D和与所述分离用探针D结合的固相载体S的方式的图。首先,目标粒子T、发光探针E以及分离用探针D结合而形成复合体C。在使所述复合体C通过分离用探针D与固相载体S结合之后,通过清洗去除游离的发光探针E,之后使发光探针E从复合体C离解出,将游离的发光探针E和通过分离用探针D与固相载体S结合的目标粒子T分离回收。

[0172] 最后,作为工序(c),基于对溶液中的所述目标粒子的浓度或量与从溶液计数出的与发光探针结合的目标粒子的个数之间的相关关系进行近似的检量线,根据所述工序(b)中计数出的目标粒子的个数计算所述试样溶液中的所述目标粒子的浓度。在本发明的一个实施方式中,通过使用检量线,能够根据通过发光探针检测出的目标粒子的个数,容易地求出试样溶液中的目标粒子的浓度。

[0173] 关于检量线,具体而言,首先调制目标粒子的浓度不同的标准试样系列。例如能够用水、缓冲液等溶剂阶段性地稀释目标粒子的浓度已知的溶液来调制标准试样系列。构成标准试样系列的标准试样溶液的个数不特别地进行限定,优选为3~20种左右。另外,各标准试样溶液的目标粒子的浓度也不特别地进行限定,能够考虑目标粒子的种类、发光探针与目标粒子的亲和性、解析对象的试样溶液中的所期望的目标粒子的浓度等来适当地调制。就标准试样系列而言,可以将各标准试样溶液的目标粒子的浓度设定为等间隔,也可以设定为不等间隔。

[0174] 接着,对于标准试样系列的各个标准试样溶液,以针对作为解析对象的试样溶液的相同的条件进行工序(a)和(b),对在各标准试样溶液中存在的与发光探针结合的目标粒子的个数进行计数。即,通过在与解析对象的试样溶液同种的溶剂中添加各标准试样溶液和浓度与该试样溶液相同那样的发光探针来调制测定用溶液。然后,通过进行与工序(a)相同的处理,来在各测量用溶液中使目标粒子与所述发光探针结合。之后,利用与工序(b)相同的装置、程序来进行利用扫描分子计数法的测量,计算与标识用探针结合的目标粒子的

个数。针对各标准试样溶液的一系列的测定可以与工序(a)和(b)实质上同时地进行,也可以在工序(a)之前预先进行,还可以在工序(b)之后进行。

[0175] 能够根据针对各标准试样溶液计数出的与发光探针结合的目标粒子的个数和所述标准试样溶液的目标粒子的浓度,求出对两者的关系进行近似的可连续微分的函数。使用所得到的可连续微分的函数作为检量线。检量线的制作方法不特别地进行限定,通常可以使用在制作两种定量数据的关系的近似线时使用的运算解析方法中的任一个来进行制作。例如在将横轴作为目标粒子的浓度、将纵轴作为目标粒子的个数得到的曲线图中,对从各标准试样溶液得到的数据进行绘制。通过针对各标绘点进行最小二乘法等,能够制作检量线。在多数情况下,通过在对目标粒子的浓度进行对数显示的单对数曲线图上绘制测量值,能够制作近似于S形曲线的检量线。

[0176] <本实施方式的装置和程序>

[0177] 通过使用对用于扫描分子计数法的光分析装置和用于该装置的程序进一步追加了用于进行工序(c)的结构和过程的装置等,能够通过所述装置进行工序(b)~(c)。

[0178] 具体而言,一种在所述的扫描分子计数法中使用的光分析装置,使用共聚焦显微镜或多光子显微镜的光学系统检测来自在试样溶液中分散且随机运动的发光粒子的光,该光分析装置具有:光检测区域移动部,其通过改变所述光学系统的光路,来使所述光学系统的光检测区域的位置在所述试样溶液内移动;光检测部,其检测来自所述光检测区域的光;以及信号处理部,其一边使所述光检测区域的所述位置在所述试样溶液内移动一边逐个地检测由所述光检测部检测出的来自各个所述发光粒子的光信号,对所述逐个地检测出的来自所述发光粒子的所述光信号的个数进行计数来对在所述光检测区域的所述位置移动中检测出的所述发光粒子的个数进行计数。光分析装置还具备:存储部,其存储对试样溶液中的所述发光粒子的浓度或量与从该试样溶液计数出的所述发光粒子的所述个数的相关关系进行近似的检量线;浓度计算部,其基于所述检量线,根据所述信号处理部所计数出的所述发光粒子的所述个数来计算所述试样溶液中的所述发光粒子的浓度;以及显示部,其显示由所述浓度计算部计算出的所述试样溶液中的所述发光粒子的所述浓度。

[0179] 例如,计算机18也可以具备所述信号处理部、存储部、浓度计算器。

[0180] 在所述显示部中,用数值、表、曲线图等不问形式地显示基于检量线计算出的试样溶液中的发光粒子的浓度。另外,还优选显示检量线自身、或者所述信号处理部所计数出的所述发光粒子的个数。在图9和图10中示出该显示部显示的数据的一个方式。在该显示部中,除此之外还可以显示检测来自光检测区域的光的条件(试样溶液的量、测定环境时的温度、从光学系统发射的光的波长、强度、光检测区域的位置、光信号数据获取时的光检测区域的位置移动速度(扫描速度)等)。作为该显示部,能够使用液晶显示器等公知的图像显示装置。

[0181] 通过对例如如图1所示那样的使用于扫描分子计数法的光分析装置进一步设置存储检量线的存储装置、根据检量线计算试样溶液中的发光粒子的浓度的运算装置以及显示所计算出的试样溶液中的发光粒子的浓度的显示器(显示部)19的装置,能够进行工序(b)~(c)。该存储装置和运算装置能够利用图1A所示的计算机18。

[0182] 另外,如以图11所示的流程图所表示的那样,能够根据以下程序通过所述装置进行工序(b)~(c),该程序除用于基于通过扫描分子计数法测量出的光子计数光强度的时间

变化进行粒子的计数的处理步骤,还具有参照对试样溶液中的所述发光粒子的浓度(或量)与从试样溶液计数出的所述发光粒子的个数的相关关系进行近似的检量线,根据计数出的发光粒子的个数计算该溶液中的目标粒子的浓度的步骤。

[0183] 实施例

[0184] 接着,示出实施例等来更详细地说明本发明的实施方式,但是本发明的实施方式不局限于下面的实施例。

[0185] [参考例1]

[0186] 进行了表示利用浓度不同的荧光色素能够制作基于扫描分子计数法的测量值的检量线的实验。

[0187] 在测量中,作为光分析装置,使用了具备共聚焦荧光显微镜的光学系统和光子计数系统的单分子荧光测定装置MF20(奥林巴斯株式会社)。

[0188] 首先,将ATTO(注册商标)633(ATTO-TEC公司产)利用磷酸缓冲液(包含0.1%的PluronicF-127)分别调制成为100pM、10pM、1pM、100fM或10fM。接着,在进行了光分析装置的光学调整之后,针对所述各试样溶液进行测量,获取按照时间顺序的光子计数数据。此时,利用633nm的激光照射1mW的激发光,利用带通滤波器使检测光波长成为660nm~710nm。试样溶液中的光检测区域的位置的移动速度设为15mm/秒,将BIN TIME设为10 $\mu$ 秒,对于100pM、10pM以及1pM的试样,将测定时间设为2秒,对于100fM和10fM的试样,将测定时间设为20秒(在2秒内对曲线图中的峰数进行换算)。另外,对各试样进行5次测定,计算出其平均。在测定出光强度之后,根据关于各试样溶液获取到的按照时间顺序的光子计数数据来对在按照时间顺序的数据中检测出的光信号进行计数。在利用数据的移动平均法的平滑中,一次平均的数据点设为9个,将移动平均处理重复进行5次。另外,在拟合时,通过最小二乘法使高斯函数拟合按照时间顺序的数据,确定(高斯函数中的)峰强度、峰宽度(半高全宽)、相关系数。并且,在峰的判断处理中,只将满足下述条件的峰信号判定为对应于观测对象分子的光信号,

[0189]  $20\mu\text{s} < \text{峰宽度} < 400\mu\text{s}$

[0190] 峰强度  $> 1$  [光子/10 $\mu\text{s}$ ]

[0191] 相关系数  $> 0.95$ 。

[0192] 另一方面,将不满足所述条件的峰信号作为噪声而无视,对判断为是对应于观测对象分子的光信号的信号的个数作为“峰数”来进行计数。

[0193] 图12是将横轴设为试样溶液中的荧光物质ATTO633的浓度、将纵轴设为峰数并对各试样溶液的计数值进行绘制得到的曲线图(用对数刻度表示)。其结果,确认出ATTO633的浓度与峰数的关系具有比例关系。

[0194] 另外,图13是将图12的曲线图用普通刻度表示的曲线图。其结果可知,溶液中的荧光物质ATTO633的浓度和所计数出的峰数具有强的正相关,通过使用根据各测定值求出的检量线(图13内所示。),能够容易地确定浓度未知的试样的浓度。例如在测定浓度未知的试样时的峰数为100的情况下,该试样的ATTO633的浓度能够计算为2.5pM。

[0195] [实施例1]

[0196] 作为目标粒子,使用了由序列编号1表示的碱基序列构成的核酸。下面,在本实施例中,将该核酸称为目标核酸。另外,作为与该目标核酸结合的发光探针,使用了在由用序

列编号2表示的碱基序列构成的寡核苷酸的5'末端附加Alexa Fluor488、在3'末端附加BHQ-1的分子信标探针。这些寡核苷酸委托Sigma-Genosys株式会社合成得到。表1示出目标核酸和分子信标探针的碱基序列。在表1中,分子信标探针中的附加有下划线的碱基是在形成分子内结构体时彼此杂交的区域。

[0197] [表1]

	碱基序列	序列编号
[0198] 目标核酸	ATGACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGCTGGTGGCGTAG GCAAGAGTGCCTTGACGATACAGCTAATTCAGAAT	1
分子信标探针	Alexa488-CCTACGCCACCAGCTCCGTAGG-BHQ1	2

[0199] 通过将所述的分子信标探针以100pM、将目标核酸以100nM、10nM、1nM、100pM、或10pM的方式溶解于磷酸缓冲液(10mM Tris-HCl、1mM EDTA、400mM NaCl、pH8.0),由此调制出用于制作检量线的标准试样溶液。

[0200] 在通过将各标准试样溶液在95℃下加热5分钟来使其变性之后,使液温慢慢地下降至20℃,形成了目标核酸与分子信标探针结合的缔合体。具体而言,将降温速度设为0.1℃/秒,在90℃下进行5分钟的降温处理,在80℃下进行10分钟的降温处理,在70℃下进行10分钟的降温处理,在60℃下进行10分钟的降温处理,在50℃下进行10分钟的降温处理,在40℃下进行10分钟的降温处理,在30℃下进行10分钟的降温处理。

[0201] 通过扫描分子计数法对降温处理后的各标准试样溶液中的缔合体的分子数进行了计数。具体地说,在测量中,作为光分析装置,使用具备共聚焦荧光显微镜的光学系统和光子计数系统的单分子荧光测定装置MF20(奥林巴斯株式会社),对于所述的各标准试样溶液得到了按照时间顺序的光子计数数据。此时,利用488nm的激光照射300μW的激发光,利用带通滤波器使检测光波长成为510nm~560nm。标准试样溶液中的光检测区域的位置的移动速度设为15mm/秒,将BIN TIME设为10μ秒,测定时间设为2秒。另外,对各试样进行5次测定,计算出其平均和标准偏差。在测定出光强度之后,根据对各标准试样溶液获取到的按照时间顺序的光子计数数据来对在按照时间顺序的数据中检测出的光信号进行计数。在利用数据的移动平均法的平滑中,一次平均的数据点设为9个,重复进行5次移动平均处理。另外,在拟合时,通过最小二乘法使高斯函数拟合按照时间顺序的数据,确定(高斯函数中的)峰强度、峰宽度(半高全宽)、相关系数。并且,在峰的判断处理中,只将满足下述条件的峰信号判定为是对应于观测对象核酸的光信号,

[0202]  $20\mu\text{s} < \text{峰宽度} < 400\mu\text{s}$

[0203] 峰强度  $> 1$  [光子/10μs]

[0204] 相关系数  $> 0.95$ ,

[0205] 另一方面,将不满足所述条件的峰信号作为噪声而无视,将判断为是对应于观测对象核酸的光信号的信号的个数作为“峰数”来进行计数。

[0206] 图14是将横轴设为标准试样溶液中的目标核酸的浓度、将纵轴设为峰数并对从各标准试样溶液得到的计数值进行绘制的曲线图。其结果,确认出依赖于目标核酸的浓度而峰数发生变化。

[0207] 将各曲线的近似曲线设为检量线,求出浓度未知的试样溶液的目标核酸浓度。具体而言,针对未知试样溶液,与上述标准试样溶液同样地添加分子信标探针,在形成与分子

信标探针的缔合体之后,利用光分析装置进行测定,计算出峰数。其结果,从该未知试样溶液计数出的峰数是421。参照图13所示的检量线,能够计算出该未知试样溶液的目标核酸浓度是1.4nM。

[0208] [实施例2]

[0209] 作为目标粒子,使用了由序列编号3所表示的碱基序列构成的核酸。下面,在本实施例中,将所述核酸称为目标核酸2。另外,作为发光探针,使用荧光探针,作为分离用探针,使用生物素探针,作为固相载体,使用由链亲合素涂敷后的磁珠。

[0210] 另外,作为与所述目标核酸2结合的发光探针,使用了在由序列编号4所表示的碱基序列构成的寡核苷酸的5'末端附加有ATT0647N的荧光探针。进一步,使用了在与所述目标核酸2结合的由序列编号5所表示的碱基序列构成的寡核苷酸的3'末端附加有生物素的生物素探针。这些寡核苷酸委托Sigma-Genosys株式会社合成得到。表2示出目标核酸2以及荧光探针、生物素探针的碱基序列。

[0211] [表2]

	碱基序列	编号
[0212] 目标核酸2	GACTGAATATAAACTTGTGGAGCCTGGGAAAGTCCCCTGAACT	3
荧光探针	ATTO 647N-AGTTGAGGGGAACTTTGCCAGGC	4
生物素探针	CCACAAGTTTATATTCAGTC-Biotin	5

[0213] 使用Tris缓冲液(10mM Tris-HCl、400mM NaCl、0.05%TritonX-100),以目标核酸2为30fM、10fM、3fM、或1fM、荧光探针为20pM、生物素探针为200pM、Poly(deoxyinosinic-deoxycytidylic)acid(Sigma-Aldrich社)为0.1U/mL(1U为水中(光路长度1cm)260nm的吸光度为1.0的量)而调制试样溶液(100 $\mu$ L)。还准备了不包含目标核酸2的试样。将那些试样溶液在95 $^{\circ}$ C下加热5分钟之后,以0.1 $^{\circ}$ C/分的速度降至25 $^{\circ}$ C。添加0.1%的BSA(牛血清白蛋白)1 $\mu$ L,使其与由链亲合素涂敷的磁珠(Invitrogen社、Cat.no.650)10 $\mu$ g在25 $^{\circ}$ C下边振动90分钟边反应。接着,使用磁体,通过500 $\mu$ L的清洗缓冲液(10mM Tris-HCl、400mM NaCl、0.05%TritonX-100)清洗3次之后,添加100 $\mu$ L的脱附缓冲液(10mM Tris-HCl、0.05% TritonX-100),50 $^{\circ}$ C下放置5分钟。用磁体收集磁珠之后,回收上清液,将它们作为标准试样溶液,通过扫描分子计数法进行测量。

[0214] 在测量中,作为光分析装置,使用具备共聚焦荧光显微镜的光学系统和光子计数系统的单分子荧光测定装置MF20(奥林巴斯株式会社),对于所述上清液,获取了按照时间顺序的光子计数数据。此时,利用642nm的激光照射1mW的激发光,利用带通滤波器使检测光波长成为660nm~710nm。试样溶液中的光检测区域的位置的移动速度设为67.5mm/秒,将BIN TIME设为10 $\mu$ 秒,测定时间设为600秒。另外,进行5次测定,计算出其平均和标准偏差。在测定出光强度之后,根据对于各上清液获取到的按照时间顺序的光子计数数据来对在按照时间顺序的数据中检测出的光信号进行计数。在利用数据的移动平均法的平滑中,一次平均的数据点设为11个,重复进行5次移动平均处理。另外,在拟合时,通过最小二乘法使高斯函数拟合按照时间顺序的数据,确定(高斯函数中的)峰强度、峰宽度(半高全宽)、相关系数。并且,在峰的判断处理中,只将满足下述条件的峰信号判定为是对应于荧光探针的光信号,

[0215]  $20\mu\text{s} < \text{峰宽度} < 400\mu\text{s}$

[0216] 峰强度 $>1$ [光子/ $10\mu\text{s}$ ]

[0217] 相关系数 $>0.90$ ,

[0218] 另一方面,将不满足所述条件的峰信号作为噪声而无视,将判断为是对应于荧光探针的光信号的信号的个数作为“峰数”来进行计数。

[0219] 图14是将横轴设为标准试样溶液中的目标核酸2的浓度、将纵轴设为峰数并对从各标准试样溶液得到的计数值进行绘制得到的曲线图。其结果,确认出依赖于目标核酸2的浓度而峰数发生了变化。

[0220] 将各标绘点的近似曲线设为检量线,求出浓度未知的试样溶液的目标核酸浓度。具体而言,针对浓度未知试样溶液,与所述标准试样溶液同样地制作测定用试样,利用光分析装置进行测定,计算出峰数。其结果,从所述浓度未知试样溶液计数出的峰数是724。参照图14所示的检量线,能够计算出所述浓度未知试样溶液的目标核酸浓度是 $4.6\text{fM}$ 。

[0221] 产业上的可利用性

[0222] 根据所述的目标粒子的定量方法,能够通过扫描分子计数法定量地测定试样溶液中的仅以非常低的浓度存在的目标粒子的浓度,因此能够在临床检体等解析对象物质的浓度是微量的试样的解析、检查等领域中利用。

[0223] 附图标记说明

[0224] F:荧光色素(发光探针);T:对象粒子(目标粒子);1:光分析装置(共聚焦显微镜);2:光源;3:单模光纤(single-mode optical fiber);4:准直仪;5:分色镜;6、7、11:反射镜;8:物镜;9:微孔板;10:孔(试样溶液容器);12:聚光镜(condenser lens);13:小孔;14:二次滤片;15:多模光纤(multi-mode optical fiber);16:光检测器;17:镜转向器(光检测区域移动部);17a:平台位置改变装置;18:计算机;19:显示器(显示部)。

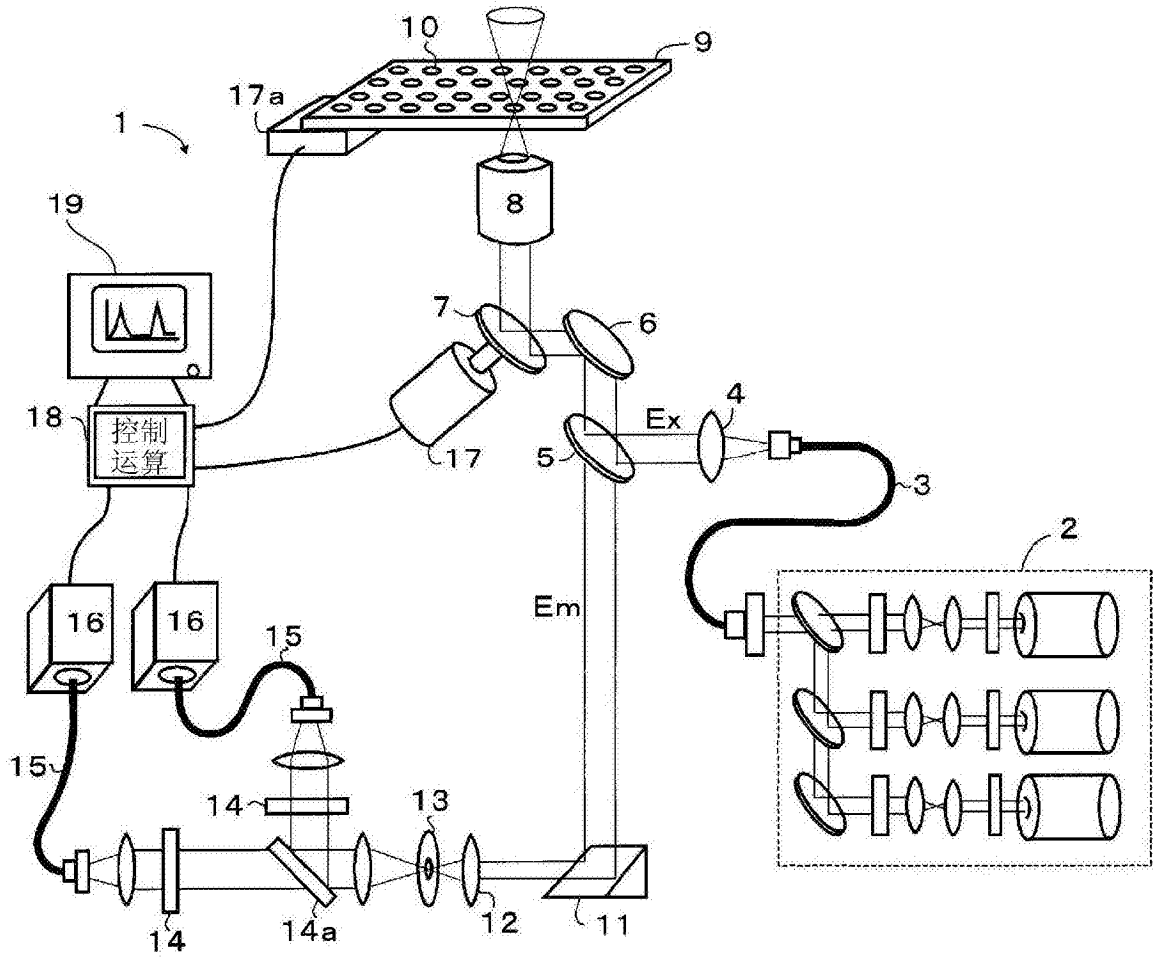


图1A

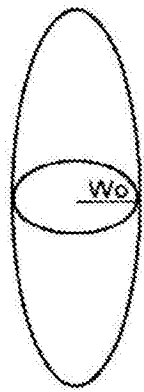


图1B

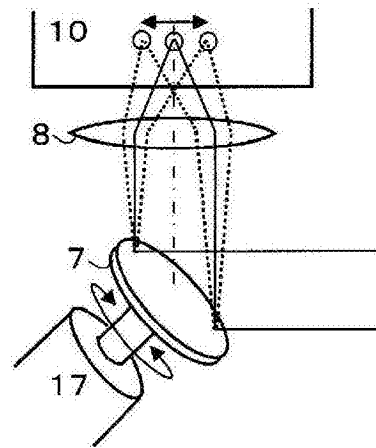


图1C

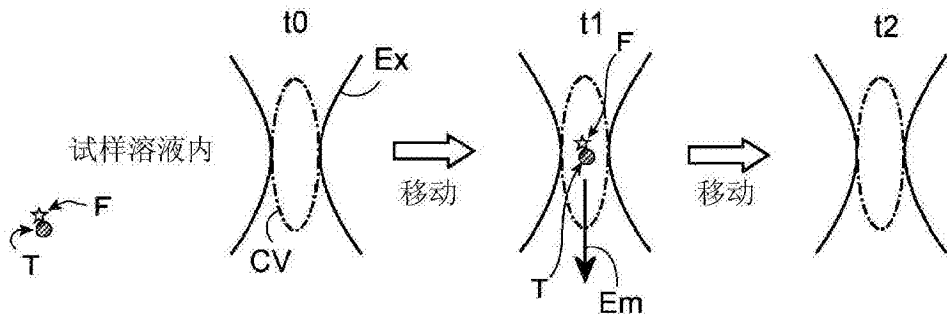


图2A

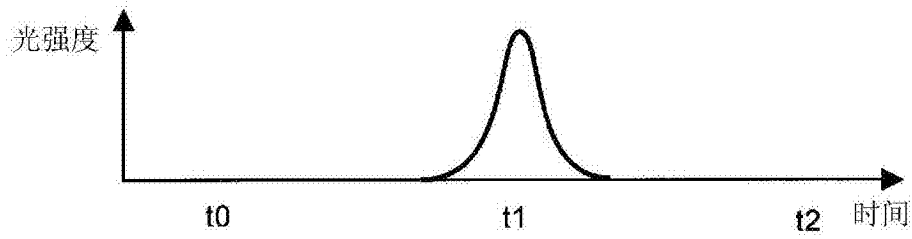


图2B

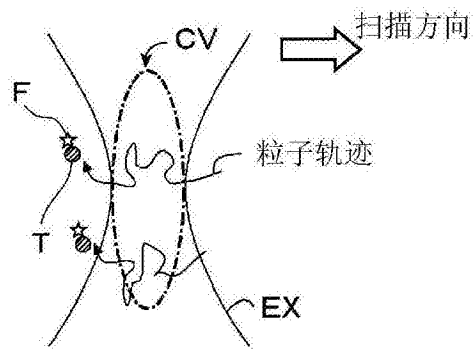


图3A

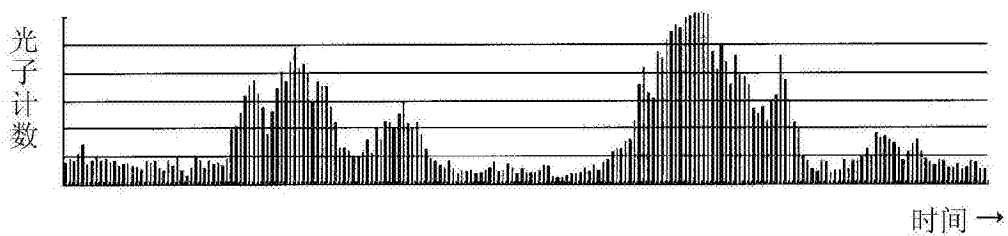


图3B

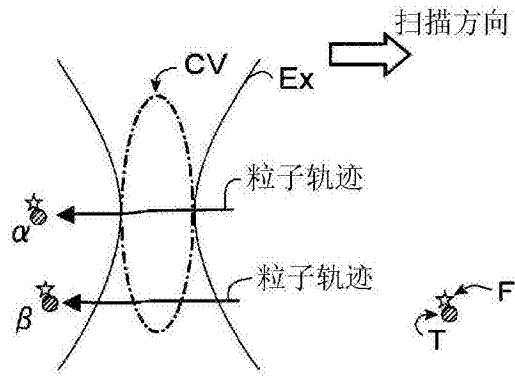


图4A

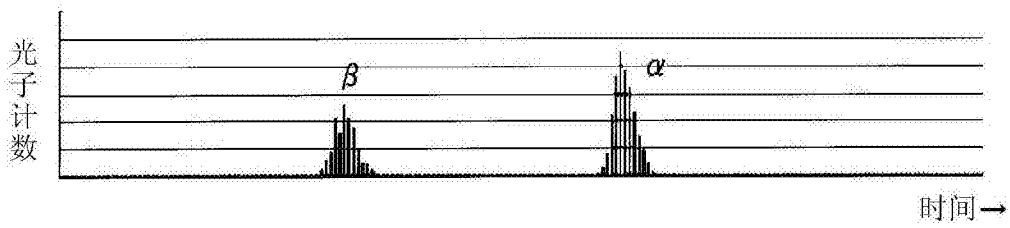


图4B

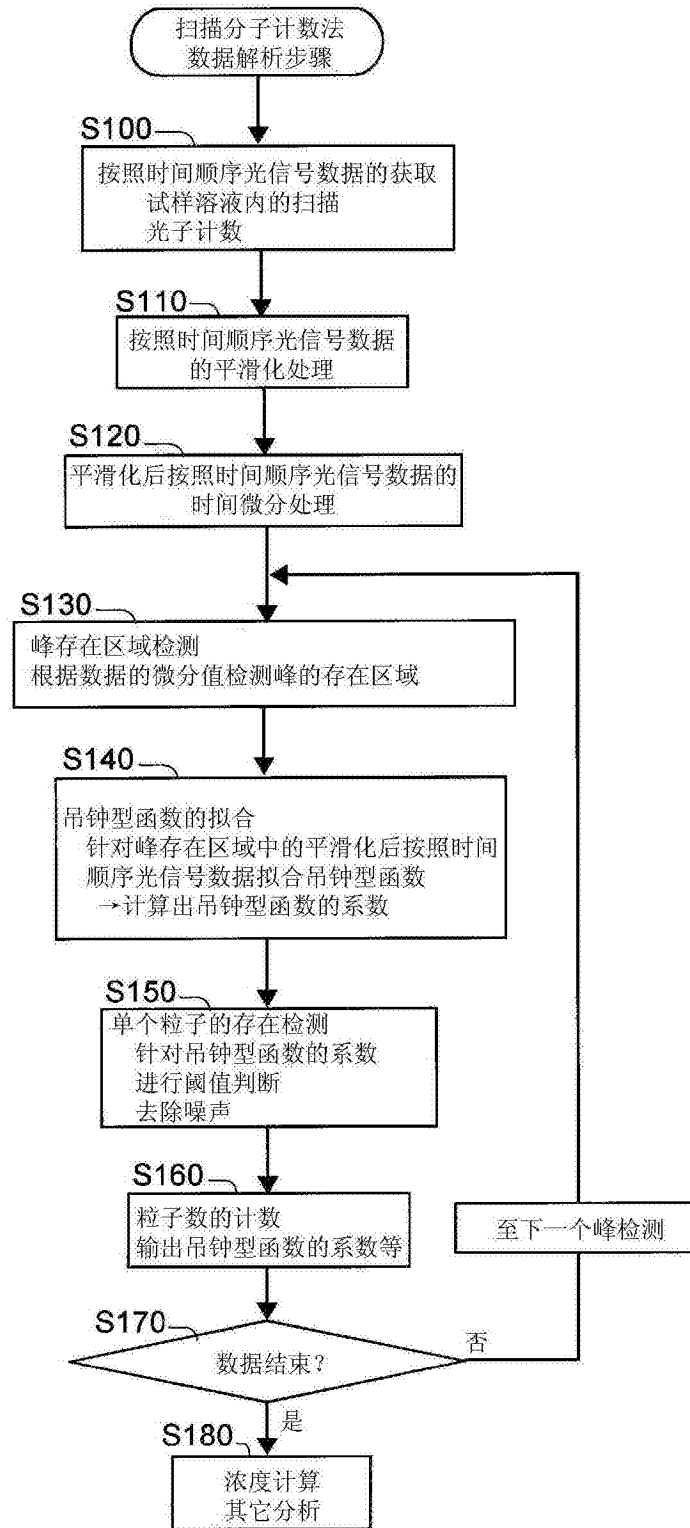


图5

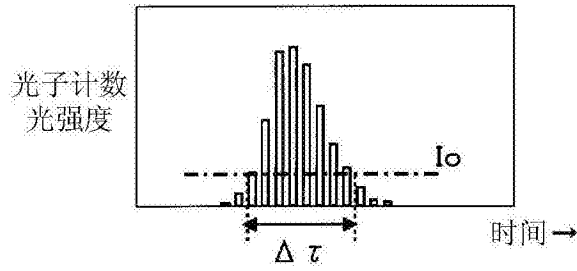


图6A

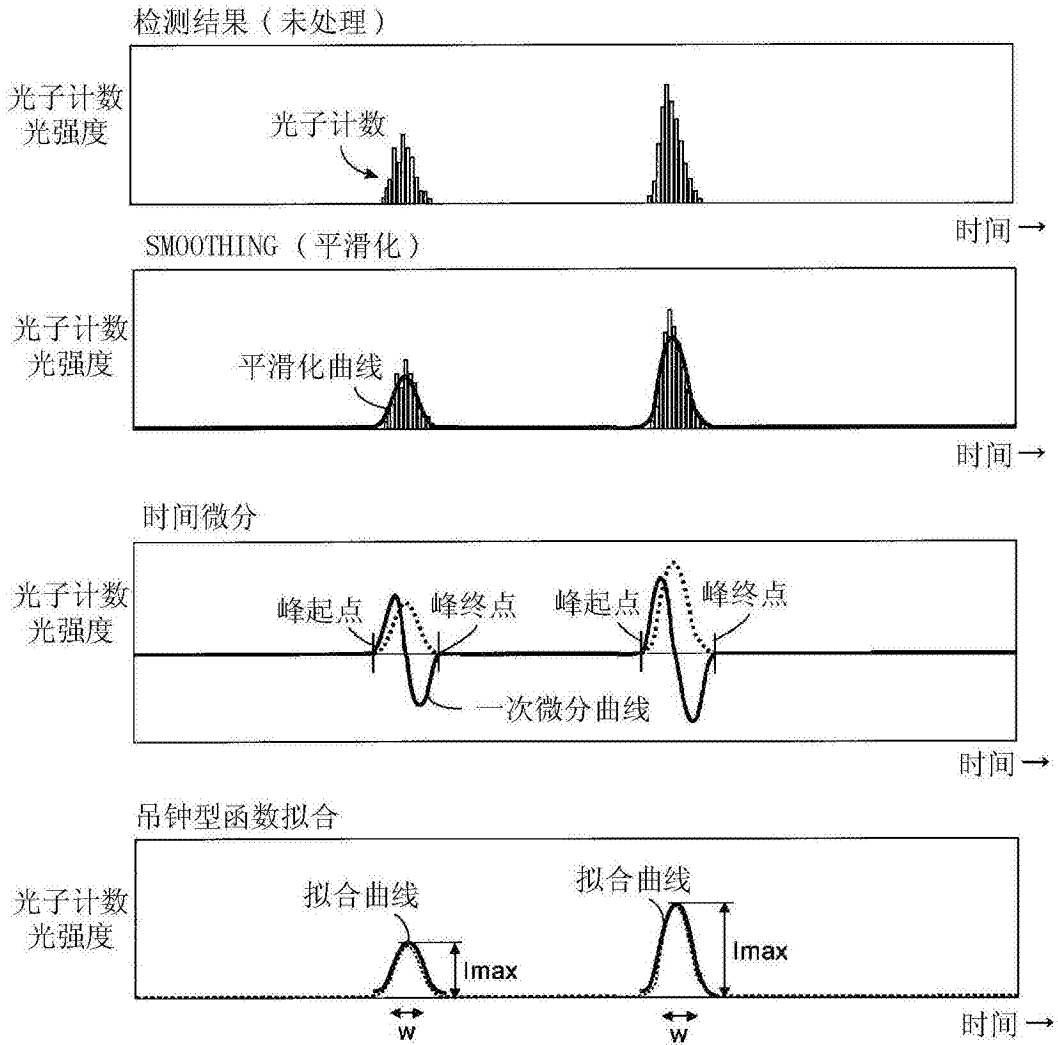


图6B

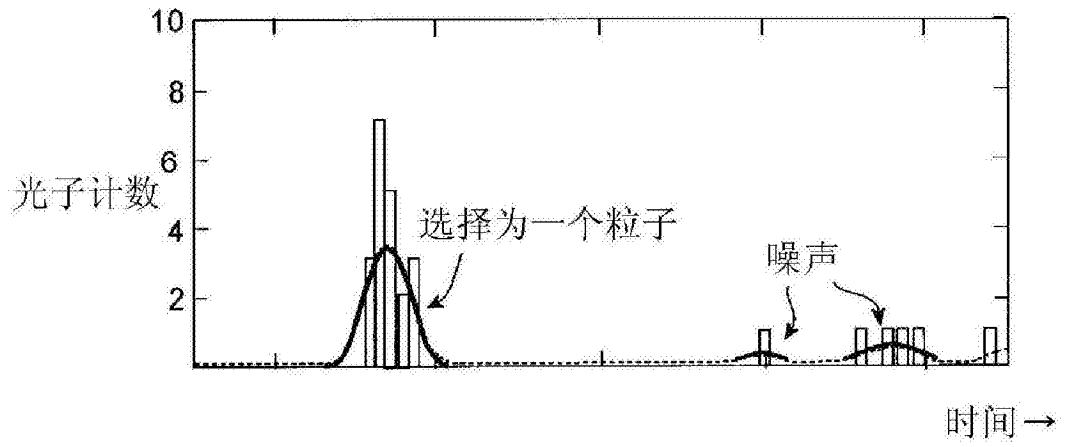


图7

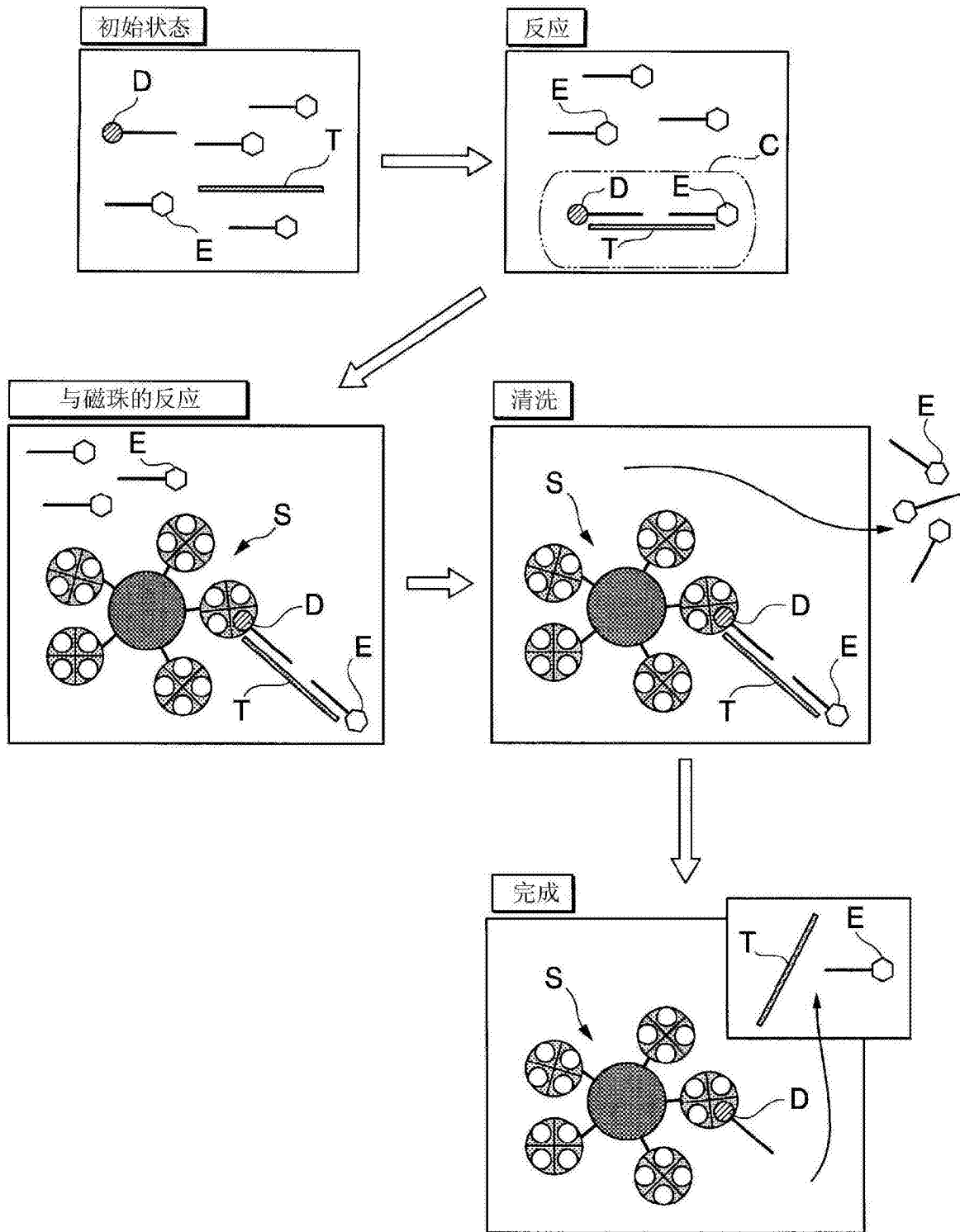


图8

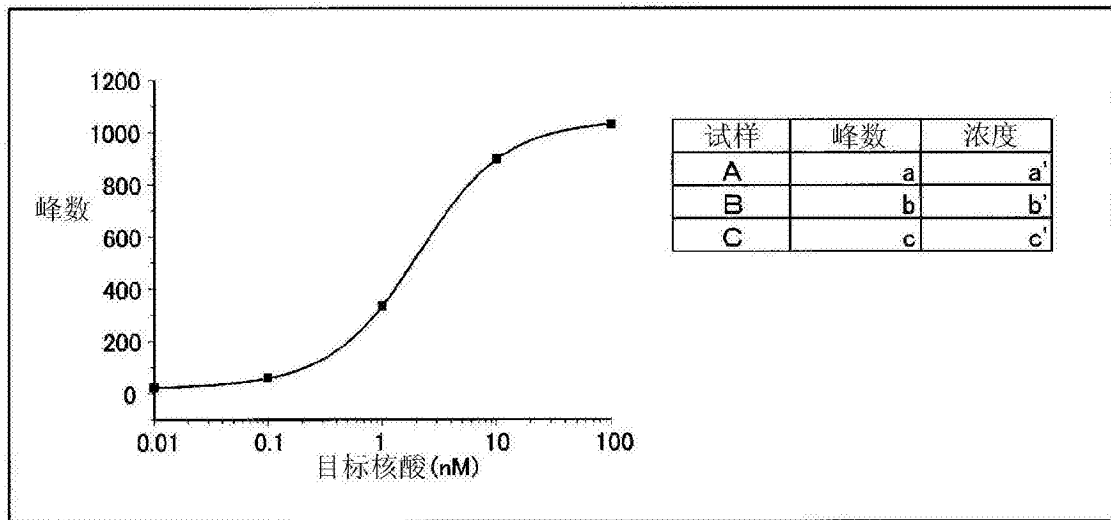


图9

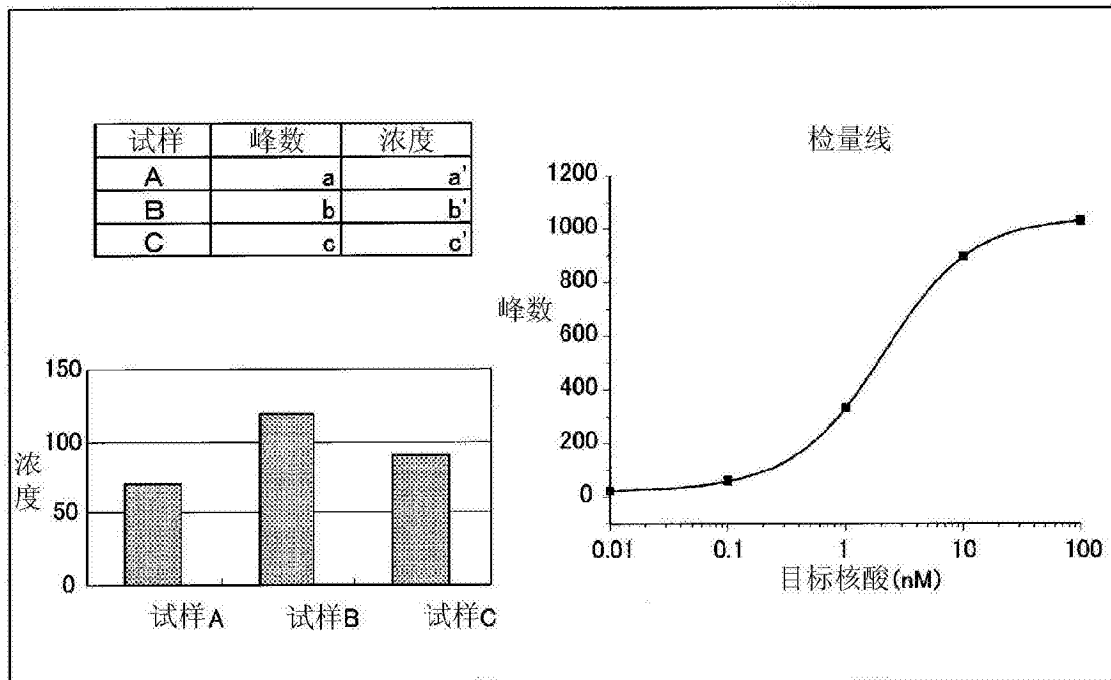


图10

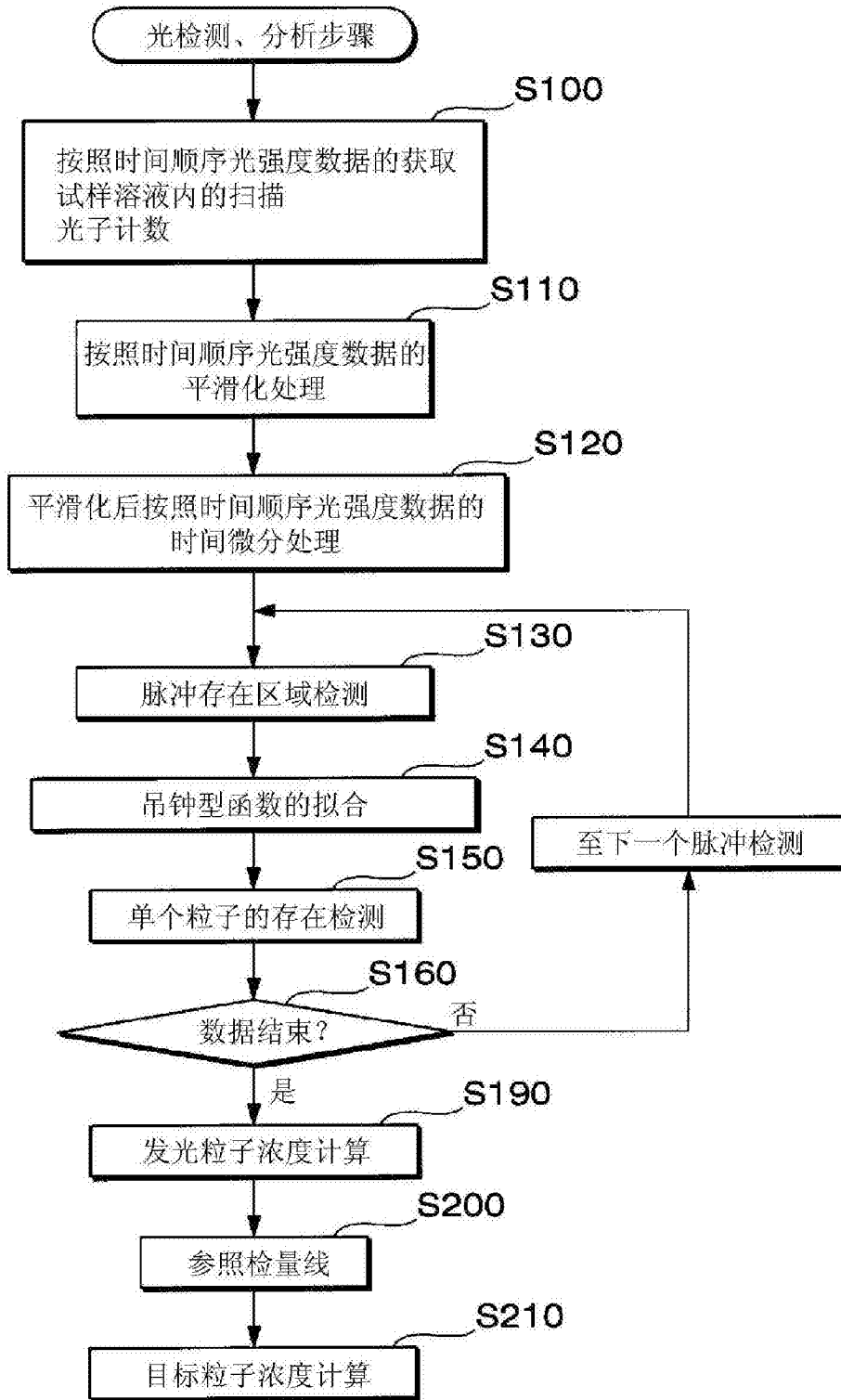


图11

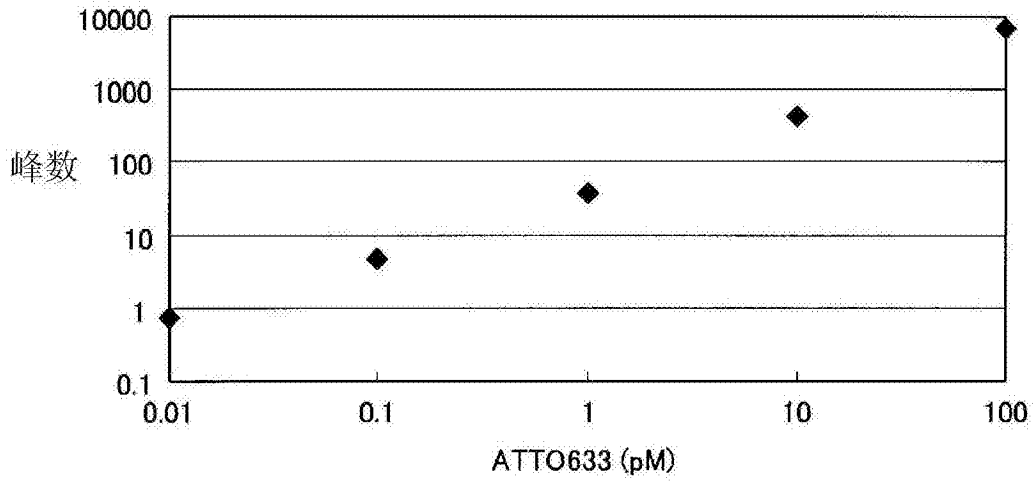


图12

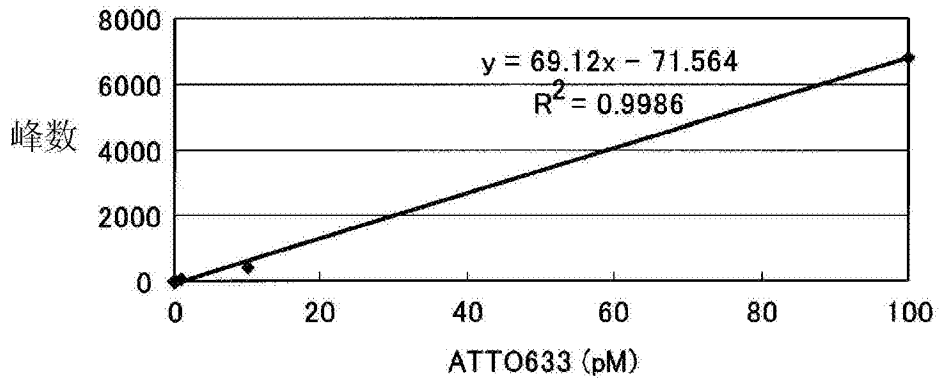


图13

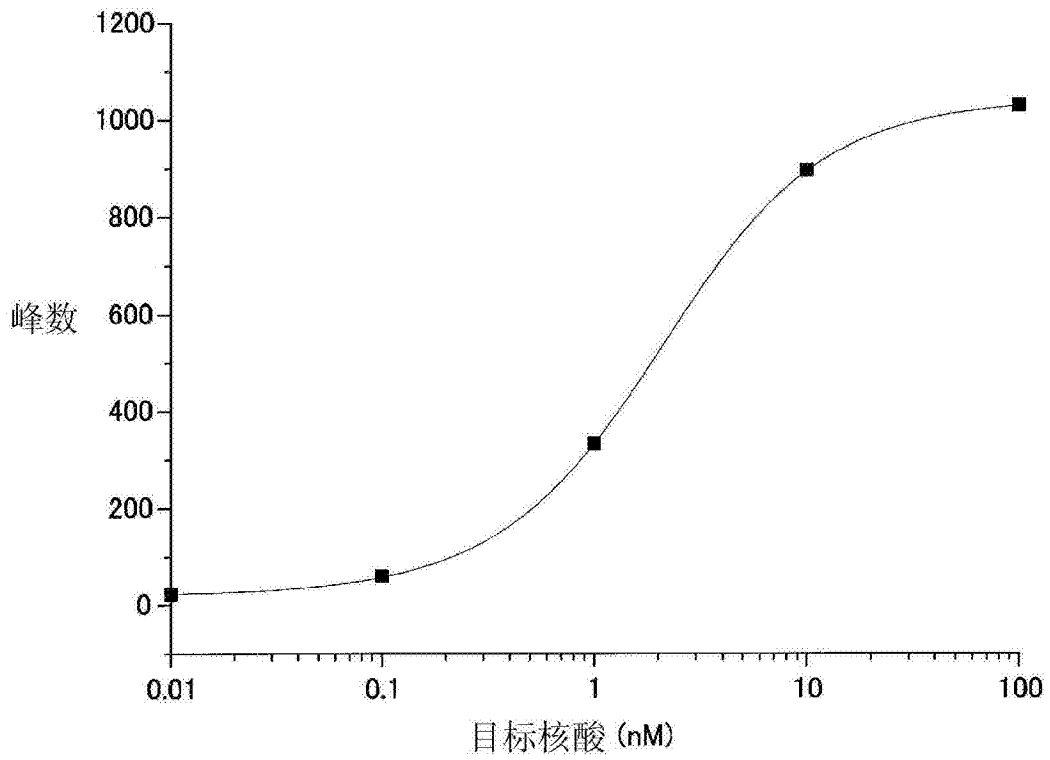


图14

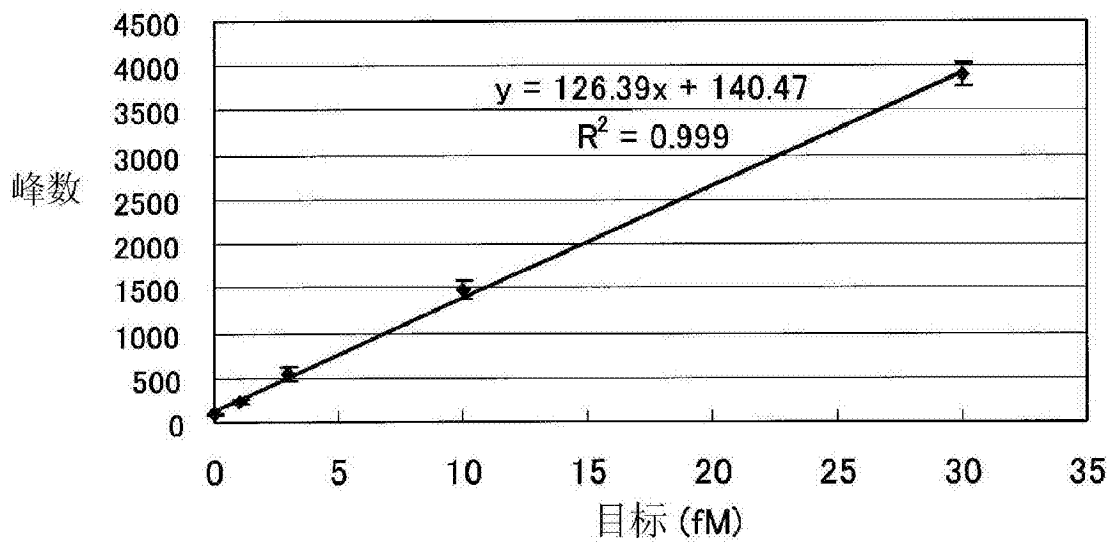


图15