



(19)
Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 601 28 721 T2 2008.01.24**

(12) **Übersetzung der europäischen Patentschrift**

(97) **EP 1 347 285 B1**

(51) Int Cl.⁸: **G01N 21/64** (2006.01)

(21) Deutsches Aktenzeichen: **601 28 721.5**

(86) PCT-Aktenzeichen: **PCT/JP01/10029**

(96) Europäisches Aktenzeichen: **01 982 819.3**

(87) PCT-Veröffentlichungs-Nr.: **WO 2002/057756**

(86) PCT-Anmeldetag: **16.11.2001**

(87) Veröffentlichungstag
der PCT-Anmeldung: **25.07.2002**

(97) Erstveröffentlichung durch das EPA: **24.09.2003**

(97) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung beim EPA: **30.05.2007**

(47) Veröffentlichungstag im Patentblatt: **24.01.2008**

(30) Unionspriorität:

2000395882 26.12.2000 JP

2001342190 07.11.2001 JP

(84) Benannte Vertragsstaaten:

DE, FR, GB, IT

(73) Patentinhaber:

Olympus Corporation, Tokio/Tokyo, JP

(72) Erfinder:

SHIBAZAKI, Takami, Hachioji-shi Tokyo 193-0822, JP; OKAWA, Kaneyasu, Tsukuimachi, Tsukui-gun, Kanagawa 220-02, JP

(74) Vertreter:

WINTER, BRANDL, FÜRNISS, HÜBNER, RÖSS, KAISER, POLTE, Partnerschaft, 85354 Freising

(54) Bezeichnung: **VERFAHREN UND VORRICHTUNG ZUR FLUORESCENZLUMINESZENZMESSUNG**

Anmerkung: Innerhalb von neun Monaten nach der Bekanntmachung des Hinweises auf die Erteilung des europäischen Patents kann jedermann beim Europäischen Patentamt gegen das erteilte europäische Patent Einspruch einlegen. Der Einspruch ist schriftlich einzureichen und zu begründen. Er gilt erst als eingelegt, wenn die Einspruchsgebühr entrichtet worden ist (Art. 99 (1) Europäisches Patentübereinkommen).

Die Übersetzung ist gemäß Artikel II § 3 Abs. 1 IntPatÜG 1991 vom Patentinhaber eingereicht worden. Sie wurde vom Deutschen Patent- und Markenamt inhaltlich nicht geprüft.

Beschreibung

Gebiet der Technik

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft eine Vorrichtung, welche für eine Vielzahl an winzigen Punkten, die auf einer Ebene angeordnet sind, die Intensität eines jeden winzigen Punkts misst, und insbesondere ein Fluoreszenzintensitätsmessverfahren, und eine Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung, die für ein System geeignet sind, das bei einem Biochip, in dem DNA oder Proteine, die durch eine fluoreszierende Substanz markiert sind, auf einer Ebene als winzige Punkte mit einer hohen Dichte angeordnet sind, eine Fluoreszenzanalyse durchführt.

Hintergrund des Stands der Technik

[0002] Es offenbart zum Beispiel die japanische Patentanmeldung KOKAI Nr. 2000-121559 eine Vorrichtung, die eine Fluoreszenzintensität eines jeden winzigen Punkts misst.

[0003] [Fig. 17](#) ist ein schematisches Blockdiagramm, das eine Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung aufzeigt, die in der japanische Patentanmeldung KOKAI Nr. 2000-121559 offenbart ist. Die in dieser Veröffentlichung offenbarte Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung besteht aus einem Chipantriebsabschnitt **503**, der in einer Y-Richtung der Zeichnung einen Biochip **520** scannt, in welchem Proben, die einer Fluoreszenzmarkierung unterzogen wurden, auf einer Substratoberfläche als winzige Punkte ausgebildet sind, einem Laser **506** als eine Anregungslichtquelle, einem dichroitischen Spiegel **508**, der einen Laserstrahl von dem Laser **506** reflektiert und die Fluoreszenz von dem Messobjekt durchlässt, einer Kondensorlinse **509**, einen Kopfantriebsabschnitt **502**, der in einer X-Richtung in der Zeichnung scannt, einem Lesekopf **507**, der die Kondensorlinse **509** und den dichroitischen Spiegel einschließt, einem dichroitischen Spiegel **511**, der die Fluoreszenz der winzigen Punkte entsprechend einer jeden Wellenlänge trennt, Filtern **515** und **519**, welche den Laserstrahl und die Fluoreszenz trennen, Aperturlinsen **514** und **518**, Pin-Hole-Platten **513** und **517** und Photomultiplier **512** und **516**.

[0004] Die Effekte der Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung mit einem derartigen Aufbau sind folgendermaßen. So wird der von dem Laser **506** erzeugte Laserstrahl von dem dichroitischen Spiegel **508** reflektiert und auf die Kondensorlinse **509** gerichtet. Er wird dann auf den Biochip **520** verdichtet, wodurch ein Laserstrahl ausgebildet wird. Wenn zu diesem Zeitpunkt eine fluoreszierende Substanz in einem mit den Laserstrahlpunkt bestrahlten Bereich vorhanden ist, wird die fluoreszierende Substanz durch den Laserstrahl angeregt und die Fluoreszenz erzeugt. Die erzeugte Fluoreszenz wird durch die Kondensorlinse **509** verdichtet, dann durch den dichroitischen Spiegel **508** geleitet, durch den farbtrennenden dichroitischen Spiegel **511** entsprechend einer jeden Wellenlänge aufgetrennt, durch die Aperturlinsen **514** und **518** entsprechend einer jeden Wellenlänge konzentriert, durch die Pin-Hole-Platten **513** und **517** geleitet und trifft auf die Photomultiplier **512** und **516**. Die Photomultiplier **512** und **516** sind Sensoren, welche Photonen erfassen und diese in Impulse auf einem TTL-Niveau umwandelt und somit das in die Photomultiplier **512** und **516** eintretende Licht zu einem Impulssignal wird, und die Fluoreszenzintensität des winzigen Punkts durch Messen der Impulszahl gemessen werden kann. Wenn die oben beschriebene Betriebsweise durchgeführt wird, während mittels eines Chipantriebsabschnitts **503** und eines Kopfantriebsabschnitts **502** mit dem Laserstrahlpunkt mechanisch gescannt wird, wird die Fluoreszenzintensität der winzigen Punkte auf dem gesamten Biochip **520** gemessen.

[0005] Wenn jedoch auf der Oberfläche des Biochips **520** Fremdmaterial vorhanden ist, welches das Anregungslicht reflektiert oder die Fluoreszenz erzeugt, wird ebenso wie die Fluoreszenz von dem Punkt **521** auf dem Biochip **520** das Licht, welches die Störung von dem Fremdmaterial beinhaltet, erfasst und wird es somit unmöglich, das Auftreten eines Fehlers bei der gemessenen Intensität zu bewältigen.

[0006] Das Dokument WO 98/07022 offenbart ein System zur Bilderkennung mittels Fluoreszenz bei welchem die Fluoreszenz aufgrund von Nicht-Probenelementen, wie dem Probensubstrat, entfernt wird. Dieses System verwendet zwei Anregungswellenlängen: eine spezifische für die Probe, während die andere die Nicht-Probenelemente anregt.

[0007] Das Dokument WO 00/05571 offenbart ein Bilderkennungssystem für Agglutinations Assays, bei dem die Pixel, welche Staub und Schmutz auf dem Scanner entsprechen, automatisch durch eine Bildverarbeitung entfernt werden.

[0008] Da die Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung nach dem Stand der Technik nicht entscheiden können

ob Fremdmaterial vorhanden oder abwesend ist, kann im Hinblick auf die Verlässlichkeit eines Intensitätswerts der winzigen Punkte keine quantitative Beurteilung durchgeführt werden.

[0009] Im Hinblick auf die oben beschriebenen Probleme ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Fluoreszenzintensitätsmessverfahren und eine Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung zur Verfügung zu stellen, welche Messfehler verringern können, auch wenn Fremdmaterial in der Nähe der Oberfläche eines Biochips vorkommt, und welche das Vorkommen von Fremdmaterial erkennen und eine quantitative Beurteilung der Verlässlichkeit eines Intensitätsmesswertes durchführen können.

Offenbarung der Erfindung

[0010] Um dieses Ziel zu erreichen wird gemäß der vorliegenden Erfindung ein Fluoreszenzintensitätsmessverfahren gemäß Anspruch 1 zur Verfügung gestellt.

[0011] Darüber hinaus wird gemäß der vorliegenden Erfindung eine Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung gemäß Anspruch 6 zur Verfügung gestellt.

[0012] Das heißt, beim Betrieb des Fluoreszenzintensitätsmessverfahrens und der Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung der vorliegenden Erfindung wird Licht mit einer Wellenlänge, mit welcher die fluoreszierende Substanz angeregt werden kann, emittiert und wird eine Abbildung des winzigen Punktes, der die fluoreszierende Substanz enthält, als eine erste Abbildung erhalten, wird eine Maske erzeugt auf Basis der Abbildung einer Fremdmaterialfläche, welche extrahiert wird, aus einer Abbildung des Fremdmaterials, das an dem zu messenden Objekt anhaftet, die erhalten wird durch Licht mit einer Wellenlänge, welche die fluoreszierenden Substanzen nicht anregt, und wird ein logisches Produkt der Maske und der ersten Abbildung erhalten, wodurch die Fremdmaterialfläche aus der ersten Abbildung eliminiert wird. Daher kann das störende Licht von dem Fremdmaterial, das an dem Biochip anhaftet, entfernt werden.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen

[0013] [Fig. 1](#) ist ein Blockdiagramm, das eine Skizze einer Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung gemäß einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zeigt;

[0014] [Fig. 2A](#) ist eine Ansicht, die ein Beispiel einer spektralen Charakteristik einer relativen Intensität einer Absorptionswellenlänge und einer Fluoreszenzwellenlänge einer fluoreszierenden Substanz für die Verwendung in einem Biochip aufzeigt;

[0015] [Fig. 2B](#) ist eine Ansicht, die eine Charakteristik eines spektralen Transmissionsgrads einer Fluoreszenzmessfiltereinheit aufzeigt;

[0016] [Fig. 2C](#) ist eine Ansicht, die eine Charakteristik eines spektralen Transmissionsgrads einer Filtereinheit zur Aufnahme einer Fremdmaterialabbildung aufzeigt;

[0017] [Fig. 3](#) ist eine schematische Ansicht, die ein Format des Biochips zeigt;

[0018] [Fig. 4](#) ist eine schematische Ansicht, die ein Datenverarbeitungsverfahren beim Messen der Intensität von winzigen Punkten in der ersten Ausführungsform aufzeigt;

[0019] [Fig. 5A](#) ist eine Ansicht, die ein Intensitätssignal S relativ zu einer Pixelposition in einer Richtung x bei einer Position, bei der ein Fremdmaterial vorkommt, in einer Richtung y aufzeigt;

[0020] [Fig. 5B](#) ist eine Ansicht, die ein Binarisierungsergebnis unter der Maßgabe, dass $\frac{1}{2}$ der maximalen Intensität S_{\max} ein Grenzwert ist, aufzeigt;

[0021] [Fig. 6](#) ist eine Ansicht, die eine Intensitätsverteilungscharakteristik einer Referenzabbildung aufzeigt;

[0022] [Fig. 7A](#) ist eine Ansicht, die ein Intensitätssignal S' relativ zu einer Pixelposition in der Richtung x bei einer Position, bei der das Fremdmaterial vorhanden ist, in der Richtung y aufzeigt, unter der Maßgabe, dass ein Wert, der erhalten wird durch Multiplizieren des Intensitätssignals in [Fig. 5A](#) mit einem Verhältnis $S_{R\max}/S_R$ des maximalen Intensitätssignals $S_{R\max}$ relativ zu dem Referenzintensitätssignal S_R , ein Intensitätssignal S' ist;

[0023] [Fig. 7B](#) ist eine Ansicht, die ein Binarisierungsergebnis unter der Maßgabe, dass $\frac{1}{2}$ eines Maximalwerts S'_{\max} ein Grenzwert ist aufzeigt;

[0024] [Fig. 8](#) ist eine Ansicht, die ein Differenzialsignal S'' relativ zu einer Pixelposition in der Richtung x bei einer Position, wo das Fremdmaterial vorkommt, in der Richtung y aufzeigt, wenn ein Differenzialoperation erster Ordnung verwendet wird;

[0025] [Fig. 9](#) ist eine Ansicht, die ein Differenzialsignal S'' relativ zu einer Pixelposition in der Richtung x bei einer Position, wo das Fremdmaterial vorkommt, in der Richtung y aufzeigt, wenn ein Differenzialoperator zweiter Ordnung verwendet wird;

[0026] [Fig. 10](#) ist eine Ansicht, die ein Differenzialsignal S'' relativ zu einer Pixelposition in der Richtung x bei einer Position, wo das Fremdmaterial vorkommt, in der Richtung y in Fällen aufzeigt, in denen der Differenzialoperator erster Ordnung verwendet wird, wenn das Differenzialsignal durch eine andere Technik erhalten wird;

[0027] [Fig. 11](#) ist eine Ansicht, die ein Differenzialsignal S'' relativ zu einer Pixelposition in der Richtung x bei einer Position, wo das Fremdmaterial vorkommt, in der Richtung y in Fällen aufzeigt, in denen der Differenzialoperator zweiter Ordnung verwendet wird, wenn gleichermaßen das Differenzialsignal durch eine andere Technik erhalten wird;

[0028] [Fig. 12](#) ist eine Ansicht einer Frequenzverteilung zur Erläuterung eines Verfahrens zur Festlegung eines geeigneten Grenzwertes, wenn zwei Arten an Fremdmaterialien vorkommen, bei der eine Horizontalachse einen repräsentativen Wert des gleichmäßig verteilten Differenzialsignals S'' darstellt und eine Vertikalachse eine Gesamtsumme an Pixel entsprechend diesem Differenzialsignal S'' darstellt;

[0029] [Fig. 13A](#) ist eine Ansicht, die eine unterteilte Abbildung relativ zu einem winzigen Punkt aufzeigt;

[0030] [Fig. 13B](#) ist eine Ansicht, die ein Ausgangssignal eines CCD auf einem in [Fig. 13A](#) dargestellten Linienabschnitt AB aufzeigt;

[0031] [Fig. 14](#) ist ein Blockdiagramm, das eine Skizze einer Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung gemäß einer zweiten Ausführungsform aufzeigt, die nicht Teil der vorliegenden Erfindung ist;

[0032] [Fig. 15](#) ist eine schematische Ansicht, die einen Referenzchip zeigt;

[0033] [Fig. 16](#) ist ein Flussdiagramm, das ein Messverfahren gemäß der zweiten Ausführungsform aufzeigt; und

[0034] [Fig. 17](#) ist ein schematisches Blockdiagramm, das eine Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung des Stands der Technik aufzeigt.

Beste Weise zur Durchführung der Erfindung

[0035] Es werden nun bevorzugte Ausführungsformen der vorliegenden Erfindung unter Bezugnahme auf die beiliegenden Zeichnungen beschrieben.

Erste Ausführungsform

[0036] Es werden zuerst ein Fluoreszenzintensitätsmessverfahren und eine Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung gemäß einer ersten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung unter Bezug auf die [Fig. 1](#) bis [Fig. 13B](#) beschrieben.

[0037] Wie in [Fig. 1](#) aufgezeigt, besitzt in einer Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung gemäß dieser Ausführungsform eine Beleuchtungseinheit **1**, eine Lichtquelle **2** wie eine Quecksilberlampe, und wird ein von dieser Lichtquelle **2** abgestrahlter Lichtstrom durch eine Sammellinse **3** konzentriert, durch eine Aperturblende **4** und eine Gesichtsfeldblende **5** ausgeblendet und tritt dann durch eine Linse **6** in ein Filterset **7** ein.

[0038] In dieser Ausführungsform wird ferner eine fluoreszierende Substanz als ein markierendes Material verwendet, die eine solche wie in [Fig. 2A](#) aufgezeigte Charakteristik aufweist. Das heißt in dieser Zeichnung,

sie besitzt ein derartiges Absorptionsspektrum wie es durch die Referenzziffer **26** angegeben ist, und ein Lichtemissionsspektrum **27** mit einer längeren Wellenlänge als die des Absorptionsspektrums.

[0039] Das Fluoreszenzmessfilterset **7** besteht, wie in [Fig. 2B](#) gezeigt, aus einem Wellenlängenselektionsfilter **8** (welcher nachfolgend als ein Anregungsfilter bezeichnet wird), der eine spektrale Transmissionscharakteristik aufweist, die selektiv eine Wellenlänge des Lichts durchlässt, mit der die fluoreszierende Substanz, die als die markierende Substanz verwendet wird und die in [Fig. 2A](#) aufgezeigte Charakteristik aufweist, angeregt wird, einem dichroitischen Spiegel **9** mit einer spektralen Charakteristik **29**, welcher das Licht mit der von dem Anregungsfilter **8** durchgelassenen Wellenlänge reflektiert und lediglich eine Wellenlänge der von der fluoreszierenden Markierungssubstanz der winzigen Punkte auf dem Biochip erzeugten Fluoreszenz mit einem festen Wellenlängenband durchlässt, und einem Wellenlängenselektionsfilter **10** (der nachfolgend als ein Absorptionsfilter bezeichnet wird) mit einer spektralen Transmissionscharakteristik **30**, die selektiv lediglich die Wellenlänge der von der fluoreszierenden Markierungssubstanz der winzigen Punkte auf dem Biochip erzeugten Fluoreszenz durchlässt und unnötige Wellenlängenkomponenten absorbiert.

[0040] Darüber hinaus besteht ein wie in [Fig. 2C](#) aufgezeigtes Filterset **11** zur Aufnahme einer Fremdmaterialabbildung aus einem Wellenlängenselektionsfilter **12** mit einer spektralen Transmissionscharakteristik **31**, die nicht die als die Markierungssubstanz verwendete fluoreszierende Substanz anregt und selektiv das Licht mit der Wellenlänge durchlässt, die von einem Fremdmaterial auf dem Biochip reflektiert wird oder bei der das Fremdmaterial die Fluoreszenz erzeugt, einem dichroitischen Spiegel **13** mit einer spektralen Charakteristik **32**, der das von dem Wellenlängenselektionsfilter **12** durchgelassene Licht reflektiert und die von dem Fremdmaterial auf dem Biochip erzeugte Fluoreszenz oder das von dem Material reflektierte Licht durchlässt, und einem Filter **14** mit einer spektralen Charakteristik **33**, der selektiv lediglich die von dem Fremdmaterial erzeugte Fluoreszenz oder die Wellenlänge des von dem Fremdmaterial reflektierten Lichts durchlässt.

[0041] Die Filtersets **7** und **11** sind an einem Filtersetbefestigungsbauteil **15** befestigt. Eines der Filtersets ist auf eine solche Weise angeordnet, dass ein Schnittpunkt einer optischen Beleuchtungsachse und einer optischen Beobachtungsachse mit den dichroitischen Spiegeln **9** und **13** zusammenfällt, und diese Filtersets sind so konfiguriert, dass sie mittels eines Filtersetumschaltmechanismus **16** basierend auf einem Umschaltsignal von einer später beschriebenen Filtersetsteuereinrichtung **20** umgeschaltet werden können.

[0042] Wie in [Fig. 3](#) aufgezeigt, wird der Biochip **24** aus beispielsweise einer Glasplatte mit einer rechteckigen Form mit 10 mm × 20 mm und aus Objekten, wie einer DNA oder einem Protein, die durch eine fluoreszierende Substanz, z. B. FITC (Fluoresceinisothiocyanat) oder Rhodamin, markiert sind, die in der Gitterform mit Intervallen von beispielsweise 100 µm als winzige Punkte **25** mit einem Durchmesser von beispielsweise 50 µm und einer geringen im wesentlichen kreisförmigen Form angeordnet sind, gebildet. Darüber hinaus sind zum Zweck des Erkennens einer Fläche, in der die winzigen Punkte ausgebildet sind, vier Sets der zur Markierung verwendeten fluoreszierenden Substanz an Eckabschnitten als winzige Punkte **35** zur Positionserfassung ausgebildet. Zusätzlich ist dieser Biochip **24** auf einer nicht dargestellten Bühne mit zwei Achsen (XY) bereitgestellt, kann in einer horizontalen Ebene bewegt werden und kann innerhalb eines Gesichtsfelds einer Objektlinse **34** positioniert werden.

[0043] Die Objektlinse **34** ist oberhalb des Biochips **24** in einem Arbeitsabstand angeordnet, und es ist ein Beobachtungslichtweg derart ausgebildet, dass die durch Anregung und Beleuchtung des Biochips **24** erzeugte Fluoreszenz durch die Objektlinse **34** verdichtet wird und durch eine Bilderzeugungslinse **17** eine Abbildung des Biochips **24** auf einem CCD-Element **18** als einem photoelektrischen Umwandlungselement ausgebildet wird. Als ein Beispiel einer derartigen Vorrichtung kann ein allgemeines Auflichtfluoreszenzmikroskop verwendet werden. Es wird darauf hingewiesen, dass in dieser Ausführungsform eine koaxiale Auflichtbeleuchtung als ein Beleuchtungsverfahren angewendet wird, jedoch durch Verwenden des Beleuchtungslichts außerhalb des Beobachtungslichtwegs eine Schrägwinkelauflichtbeleuchtung und eine Dunkelfeldauflichtbeleuchtung ebenfalls als einer nahezu kreisförmigen Zone verwendet werden können.

[0044] Das CCD-Element **18** scannt elektrisch eine Fluoreszenzabbildung des Biochips **24** und gibt ein analoges Bildsignal aus. Die Steuereinrichtung **23** besitzt einen A/D-Wandler **19**, der dieses analoge Signal in digitale Daten umwandelt, und einen Bildspeicher **21** und besteht aus einer Bildverarbeitungseinrichtung **22** mit einer Binarisierungsfunktion für Abbildungen, einer Funktion zur Durchführung logischer Multiplikationen zwischen einer Vielzahl an Abbildungen, einer Funktion zur Messung einer Fläche einer willkürlichen Fläche und einer Funktion zur Integration eines Intensitätswertes in einer willkürlichen Fläche, einer Berechnungseinrichtung **42** zur Durchführung von vier arithmetischen Operationen und einer Filtersetsteuereinrichtung **20**.

[0045] Die Effekte dieser Ausführungsform werden nun unter Bezug auf die [Fig. 1](#) bis [Fig. 13B](#) beschrieben.

[0046] Zuerst wird der Biochip **24** mittels einer nicht dargestellten zweiachsigen Bühne auf eine solche Weise positioniert, dass ein Messbereich, der durch vier winzige Positionierungspunkte **35** auf dem Biochip **24** spezifiziert ist, mit einem Sichtfeldbereich übereinstimmt, der bestimmt wird durch eine Abbildungsvergrößerung eines optischen Beobachtungssystems und einer Größe einer Lichtaufnahmefläche auf dem CCD-Element **18**. Dann wird das Fluoreszenzmessfilterset **7** mittels des Filtersetumschaltmechanismus **16** so auf einer Aufnahme-position positioniert, dass eine Fluoreszenzabbildung der winzigen Punkte **25** auf dem Biochip **24** aufgenommen werden kann.

[0047] Andererseits wird der von der Lichtquelle **2** ausgestrahlte Lichtstrom durch die Sammellinse **3** verdichtet, durch die Aperturblende **4** und die Gesichtsfeldblende **5** ausgeblendet und dann durch die Linse **6** dem Fluoreszenzmessfilterset **7** zugeführt. Das dem Fluoreszenzmessfilterset **7** zugeführte Licht wird durch den Anregungsfilter **8** mit der spektralen Transmissionscharakteristik **28**, welche mit dem Absorptionswellenlängenband **26** der fluoreszierenden Markierungssubstanz übereinstimmt, zu dem Lichtstrom mit einer Wellenlänge mit einer spezifischen Halbbandbreite (welcher nachfolgend als das Anregungslicht bezeichnet wird). Da der dichroitische Spiegel **9** eine Spektralcharakteristik **29** aufweist, wird dieser Lichtstrom durch den dichroitischen Spiegel **9** reflektiert und durch die Objektivlinse **34** auf den Biochip **24** eingestrahlt. Zu diesem Zeitpunkt erzeugt die auf dem Biochip **24** als die winzigen Punkte **25** angeordnete fluoreszierende Substanz eine Fluoreszenz mit einer Wellenlänge, die länger ist als die des Anregungslichts, welche bestimmt wird durch ihre physikalischen Eigenschaften und die Umgebung. Da die von jedem winzigen Punkt **25** erzeugte Fluoreszenz durch die Objektivlinse **34** verdichtet wird und die hier erzeugte Fluoreszenz ein Transmissionswellenlängenband des dichroitischen Spiegels **9** besitzt, durchläuft sie den dichroitischen Spiegel **9** des Fluoreszenzmessfiltersets **7** und durchläuft ferner den Absorptionsfilter **10**, wodurch eine Abbildung der winzigen Punkte **25** auf dem CCD-Element **18** ausgebildet wird.

[0048] Danach wird die Abbildung der winzigen Punkte **25** auf dem CCD-Element **18** durch das CCD-Element **18** elektrisch gescannt und zu einem analogen elektrischen Signal umgewandelt. Dieses analoge Signal wird durch den A/D-Wandler **19** in ein digitales Signal umgewandelt und in einem Bildspeicher **21** als eine Fluoreszenzabbildung **101** der in [Fig. 4](#) gezeigten winzigen Punkts gespeichert.

[0049] Das Fluoreszenzmessfilterset **7** wird dann mittels des Filtersetumschaltmechanismus **16** auf das Filterset zur Aufnahme einer Fremdmaterialabbildung umgeschaltet, das Beleuchtungslicht mit einer Lichtwellenlänge, bei der die fluoreszierende Substanz nicht angereicht wird, wird dem Biochip **24** zugeführt und durch den oben beschriebenen Schritt entsprechenden Arbeitsschritt wird eine in [Fig. 4](#) gezeigte Fremdmaterialabbildung **102** in dem Bildspeicher **21** gespeichert. Da die fluoreszierende Markierungssubstanz des winzigen Punkts **25** nicht angeregt wird, ist zu diesem Zeit-Punkt die Abbildung des winzigen Punkts **25** nicht in der Fremdmaterialabbildung **102** enthalten.

[0050] Anschließend wird zur Extraktion der Fremdmaterialfläche aus der Fremdmaterialabbildung **102** die Binarisierungsverarbeitung in Bezug auf die Fremdmaterialabbildung **102** durch eine Bildverarbeitungseinrichtung **22** durchgeführt. Wenn eine Abbildung eines Objekts mit einer gleichförmigen Intensität auf dem Lichtaufnahmeelement mit einem y-Wert "1" durch eine aplanatische Linse abgebildet wird, kann im Allgemeinen zu diesem Zeitpunkt eine Grenze der Abbildung, die erhalten wird durch Binarisierung unter Festlegen von $\frac{1}{2}$ der maximalen Intensität der Abbildung als einen Grenzwert, als ein Schnittpunkt eines Hauptlichtstrahls und einer optimalen Bildoberfläche angesehen werden, und kann die erhaltene binarisierte Fläche als eine äußere Gestalt des Fremdmaterials verwendet werden.

[0051] Wenn jedoch räumliche Unregelmäßigkeiten in dem Anregungslicht auftreten, mit dem der Biochip **24** bestrahlt wird, existieren ebenfalls räumliche Unregelmäßigkeiten in der Intensität der durch das Fremdmaterial erzeugten Fluoreszenz. Unter der Maßgabe, dass $\frac{1}{2}$ der maximalen Intensität ein Grenzwert ohne Variation ist, kann ferner, sogar wenn eine Vielzahl desselben Fremdmaterials vorhanden ist, das Fremdmaterial aufgrund der räumlichen Unregelmäßigkeiten im Anregungslicht nicht als das Fremdmaterial erkannt werden.

[0052] Dieses Phänomen wird nun unter Bezug auf die [Fig. 5A](#) und [Fig. 5B](#) ausführlich beschrieben. [Fig. 5A](#) ist eine Ansicht, die ein Intensitätssignal S relativ zu einer Pixelposition in einer Richtung x bei einer Position, bei der das Fremdmaterial in einer Richtung y vorhanden ist, zeigt. Wie in der Zeichnung aufgezeigt, kann in Fällen, in denen räumliche Unregelmäßigkeiten in dem Anregungslicht auftreten, wenn eine Vielzahl an Fremdmaterialien (in der Zeichnung kommen drei Fremdmaterialien A, B und C vor) mit derselben Charakteristik vorkommen, nicht dasselbe Intensitätssignal erhalten werden. Unter der Annahme, dass S_{\max} ein Intensitätssignal

des Fremdmaterials A ist, welches das größte ist, S_1 und S_2 jeweils Intensitätssignale des Fremdmaterials B und des Fremdmaterials C sind und $S_{\max}/2 < S_1 < S_{\max}$ und $S_2 < S_{\max}/2$ erhalten werden, wenn festgelegt wird, dass $1/2$ der maximalen Intensität ein Grenzwert ohne Variation ist, stimmt lediglich die Grenze des Fremdmaterials A, die durch Einarisierung erhalten wird, mit einem Schnittpunkt des Hauptlichtstrahls und der optimalen Bildoberfläche überein, wie in [Fig. 5B](#) gezeigt, und wird eine exakte Fläche gezeigt. Im Fall des Fremdmaterials B ist die aufgezeigte Fläche jedoch geringer als die exakte Fläche. Darüber hinaus wird im Fall des Fremdmaterials C die Fläche überhaupt nicht erkannt.

[0053] Es wird nun ein Verfahren zur Beseitigung dieses Nachteils beschrieben.

[0054] Ein erstes Verfahren, das nicht Teil der vorliegenden Erfindung ist, misst Unregelmäßigkeiten im Anregungslicht und führt basierend auf dieser Messung Korrekturen durch. Zur Durchführung dieses Verfahrens wird eine Abbildung (Referenzabbildung) einer Platte mit flacher Oberfläche mit einem gleichförmigen Reflexionsvermögen oder Lichtemissionsverhältnis abgebildet als eine Intensitätsverteilungsscharakteristik, wie sie zum Beispiel in [Fig. 6](#) aufgezeigt wird (tatsächlich ist es eine zweidimensionale Intensitätsverteilung, jedoch wird sie in diesem Beispiel der Einfachheit halber als eine eindimensionale Verteilung dargestellt). Es sei angemerkt, dass die vertikale Achse ein Referenzintensitätssignal S_R darstellt und deren Maximalwert ein maximales Intensitätssignal $S_{R\max}$ in [Fig. 6](#) ist. Wenn dann ein Wert, der durch Multiplizieren des wie in [Fig. 5A](#) erhaltenen Intensitätssignals S mit $S_{R\max}/S_R$ als ein Intensitätssignal S' bestimmt wird, werden die Intensitätssignale S' der drei Fremdmaterialien wie in [Fig. 7A](#) gezeigt, gleich zueinander. Unter der Maßgabe, dass $1/2$ des Maximalwerts S'_{\max} des Intensitätssignals S' ein Grenzwert ist, anstelle der Verwendung des Intensitätssignals S , stimmen daher die durch Einarisierung erhaltenen Grenzen von jedem der drei Fremdmaterialien mit dem Schnittpunkt des Hauptlichtstrahls und der optimalen Bildoberfläche überein, wie in [Fig. 7](#) aufgezeigt, und wird die Korrekturfläche aufgezeigt. Obwohl die Beschreibung gemacht wurde unter Bestimmung der Intensität von anderen Teilen als den Fremdmaterialien als 0, kann aufgrund von Streulicht oder dem Dunkelstrom des Lichtempfangselements in einigen Fällen ein Rauschen zugemischt sein, und ist es somit wünschenswerter, den Grenzwert als $(S'_{\min} + S'_{\max})/2$ festzulegen. Hier ist S'_{\min} ein Minimalwert des Intensitätssignals S' .

[0055] Es wird nun ein zweites Verfahren zum Beseitigen dieses Nachteils beschrieben, welches Teil der vorliegenden Erfindung ist. Dieses Verfahren unterscheidet sich von dem oben beschriebenen ersten Verfahren und benötigt keine Referenzabbildung.

[0056] Das heißt, es wird angenommen, dass das Intensitätssignal S ausgedrückt wird als $f(i, j)$ und ein Differentiationssignal S'' berechnet wird unter Verwendung des folgenden Ausdrucks.

$$S'' = \frac{g(i, j)}{\sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} c_{0,m,n} f(i+m, j+n)}$$

[0057] Hier kann die Nähe von (i, j) in einer Richtung i und einer Richtung j (welche nicht auf benachbarte Pixel beschränkt ist) dargestellt werden durch $[-m_1, m_2]$ beziehungsweise $[-n_1, n_2]$. Darüber hinaus ist $c_{0,m,n}$ ein Mittelungsoperator. Üblicherweise kann der folgende Ausdruck angegeben werden.

$$c_{0,m,n} = \begin{bmatrix} 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix} \frac{1}{9} \quad \text{or} \quad \begin{bmatrix} 1 & 2 & 1 \\ 2 & 4 & 2 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix} \frac{1}{16}$$

[0058] Darüber hinaus, stellt $g(i, j)$ eine Differentiationsabbildung dar und kann durch den folgenden Ausdruck dargestellt werden.

$$g(i, j) = \sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} C_{1,m,n} f(i+m, j+n)$$

oder

$$g(i, j) = \left| \sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} C_{1,m,n} f(i+m, j+n) \right| + \left| \sum_{m=-m_1}^{m_2} \sum_{n=-n_1}^{n_2} C_{2,m,n} f(i+m, j+n) \right|$$

[0059] Hier sind $C_{1,m,n}$ und $C_{2,m,n}$ Differenzialoperatoren. Als ein Differenzialoperator erste Ordnung kann zum Beispiel oft der folgende Ausdruck verwendet werden.

$$C_{1,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad C_{2,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & -1 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 1 \end{bmatrix}$$

oder

$$C_{1,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & 0 & 1 \\ -2 & 0 & 2 \\ -1 & 0 & 1 \end{bmatrix}, \quad C_{2,m,n} = \begin{bmatrix} -1 & -2 & -1 \\ 0 & 0 & 0 \\ 1 & 2 & 1 \end{bmatrix}$$

[0060] Als ein Differenzialoperator zweiter Ordnung wird oft ein Laplace-Filter verwendet.

[0061] Das auf diese Weise erhaltene Differentiationssignal S'' ist ein Differentiationssignal, welches in Bezug auf die drei Fremdmaterialien das selbe ist, wie in [Fig. 8](#) aufgezeigt, wenn der Differenzialoperator erste Ordnung verwendet wird, und eine Umfanglinie eines jeden Fremdmaterials ist eine Linie mit einer festen Breite mit dem maximalen Differentiationssignal S''_{\max} . Die Linie, welche das Zentrum dieser Breite verbindet wird zu einer tatsächlichen Fremdmaterialumfanglinie. Im Fall der Verwendung des Differenzialoperators zweiter Ordnung, wie in [Fig. 9](#) aufgezeigt, besitzen die drei Fremdmaterialien darüber hinaus das selbe Differenzialsignal und wird die Linie, welche Punkte verbindet, bei denen das positive und negative des Differenzialsignals S'' invertiert sind, zu der Fremdmaterialumfanglinie.

[0062] Es sei angemerkt, dass die Beschreibung der Einfachheit halber für die jeweiligen Fälle gegeben wurde, bei denen die Neigung der Nachbarschaft der Grenze des Intensitätssignals S konstant ist, tatsächlich ist diese Neigung jedoch nicht konstant. Daher ist das Muster des Differenzialsignals S'' in den [Fig. 8](#) und [Fig. 9](#) nicht eine rechteckige Verteilung sondern kommt einer Normalverteilung nahe und es ist somit wünschenswert, die Fremdmaterialfläche unter Verwendung eines Signals zu bestimmen, das mit dem Grenzwert verarbeitet wurde, oder die Fremdmaterialfläche unter Verwendung eines Peakpunkts des Differenzialsignals S'' zu bestimmen. In ersterem Fall muss jedoch der Grenzwert prinzipiell nicht % des maximalen Differenzialsignals S''_{\max} sein. In letzterem Fall kann ferner anstelle der Verwendung des oben beschriebenen Ausdrucks, der das Differenzialsignal S'' erhält, der folgende Ausdruck ausreichend sein.

$$S'' = g(i, j)$$

[0063] Das heißt, es ist wie in den [Fig. 10](#) und [Fig. 11](#) aufgezeigt. In [Fig. 10](#) wird als die Fremdmaterialfläche eine Fläche bestimmt, die gebildet wird durch Punkte entsprechend dem Maximalwert von S'' . In [Fig. 11](#) wird als die Fremdmaterialfläche eine Fläche bestimmt, die gebildet wird durch jeden Zentralpunkt zwischen einem Punkt, der dem Maximalwert von S'' entspricht, und einem Punkt, der dem Minimalwert davon entspricht.

[0064] Es wird nun ein Verfahren zum Festlegen eines weiteren geeigneten Grenzwertes in ersterem Fall beschrieben.

[0065] Mit Obigen wurde der gleiche eine Typ an Fremdmaterial beschrieben, wobei tatsächlich jedoch eine Vielzahl an Arten von Fremdmaterialien vorkommen. Es wird nun ein Verfahren beschrieben zum Festlegen eines geeigneten Grenzwerts, wenn ein Fremdmaterial **1** und ein Fremdmaterial **2** vorkommen. **Fig. 12** ist eine Frequenztafel, in der eine horizontale Achse einen repräsentativen Wert des gleichmäßig verteilten Differenzialsignals S'' darstellt und eine vertikale Achse eine Gesamtsumme an Pixel entsprechend dem Differenzialsignal S'' (welche nachfolgend als Frequenz bezeichnet wird) darstellt. Wie in der Zeichnung dargestellt, tritt ein Rauschen intensiv in einer Zone auf, in der das Differenzialsignal S'' klein ist, und das Fremdmaterial **1** und das Fremdmaterial **2** treten sporadisch in einer entsprechend ihrer Eigenschaften inhärenten Zone auf. Der Grenzwert kann daher unter Verwendung dieser Frequenztafel festgelegt werden. Das heißt wenn der in der Zeichnung aufgezeigte Grenzwert **1** angewendet wird, können die Umfangslinien des Fremdmaterials **1** und des Fremdmaterials **2** erhalten werden. Wenn der Grenzwert **2** angewendet wird, kann die Umfangslinie des Fremdmaterials **2** erhalten werden. Wenn darüber hinaus der Grenzwert **1** und der Grenzwert **2** angewendet werden, kann die Umfangslinie von lediglich dem Fremdmaterial **1** erhalten werden.

[0066] Schließlich wird die Umfangslinie des Fremdmaterials und dessen Inneres festgelegt als z. B. 0 oder -1 und jeglicher anderer Bereich wird festgelegt als 1, und werden durch die Bildverarbeitungseinrichtung **22** als eine Abbildung **103** der Fremdmaterialfläche in dem Bildspeicher gespeichert.

[0067] Darüber hinaus wird für die Fluoreszenzabbildung **101** des winzigen Punkts **25** die Abbildung **103** der Fremdmaterialfläche als eine Maske verwendet, wird durch die Bildverarbeitungseinrichtung **22** ein Produkt der beiden Abbildungen gebildet und wird eine Fluoreszenzabbildung **104** von dem winzigen Punkt **25** erhalten, von welcher die Fremdmaterialfläche entfernt wurde. Das heißt, es ist möglich, die Fluoreszenzabbildung **104** so zu erhalten, dass die Fläche mit dem Wert von 0 oder -1 als die Fremdmaterialfläche erkannt werden kann.

[0068] Darüber hinaus wird in diesem Beispiel die durch die Binarisierungsverarbeitung erhaltene Fläche direkt als die Fremdmaterialfläche verwendet und wird von der Fluoreszenzabbildung **101** des winzigen Punkts **25** entfernt. In Bezug auf die durch Einarisierung erhaltene Fremdmaterialfläche kann jedoch durch den folgenden Ausdruck (1)) als eine Summe eines Abstands von dem Zentrum einer Diffraktionsabbildung und einem Tal des Diffraktionspeaks zweiter Ordnung und dem Diffraktionspeak dritter Ordnung (eine aufgrund der Diffraktion erzeugte Unschärfemenge, der erste Term auf der rechten Seite des folgenden Ausdrucks (1)) und einer maximalen Unschärfemenge, die erhalten wird, wenn ein Fokussierfehler berücksichtigt wird (der zweite Term auf der rechten Seite des Ausdrucks (1)) eine optische Unschärfemenge angegeben werden und kann die Fremdmaterialfläche durch diese Menge erweitert und aus der Fluoreszenzabbildung des winzigen Punkts entfernt werden. β ist eine Bildvergrößerung des optischen Systems, λ ist eine Wellenlänge des eine Abbildung des Fremdmaterials bildenden Lichts, α ist die numerische Apertur der Objektlinse **34** auf der Seite des Biochips und Δ ist ein Defokussierbetrag.

$$\delta = \beta \cdot (1.619 \frac{\lambda}{2} + \alpha |\Delta|) \quad (1)$$

[0069] Dann werden die auf den Biochip **24** ausgebildeten winzigen Punkte **35** zur Positionserfassung erfasst, die Positionen der Gravitationszentren der vier winzigen Punkte **35** zur Positionserfassung oder die Schwerpunkte der binarisierten Abbildungen der winzigen Punkte **35** zur Positionserfassung erhalten und basierend auf diesen Koordinaten- und Anordnungsinformationen auf dem Biochip **24** die Fluoreszenzabbildung **104** der winzigen Punkte zu jeder Einheit eines winzigen Punkts, wie durch die Bezugsziffer **105** angezeigt, unterteilt.

[0070] Es wird dann ein Messbereich relativ zu jedem winzigen Punkt **25** mittels des folgenden Arbeitsschritts festgelegt.

[0071] Das heißt, es wird unter Bezug auf die unterteilten Abbildung **106** und **107** für jeden winzigen Punkt, von dem die Fremdmaterialfläche entfernt wurde $\frac{1}{2}$ der maximalen Intensität in der unterteilten Abbildung oder ein Mittelwert der maximalen Intensität und der minimalen Intensität als ein Grenzwert bestimmt und eine Binarisierungsverarbeitung ausgeführt. Dann werden eine maximale X-Koordinate, eine minimale X-Koordinate, eine maximale Y-Koordinate und eine minimale Y-Koordinate der binarisierten Fläche erhalten und werden diese bestimmt als x_{\max} , x_{\min} , y_{\max} und y_{\min} . Basierend auf diesen Koordinaten werden durch die folgenden Ausdrücke zwei Koordinaten, welche rechteckige Flächen angeben, die zur Bestimmung einer Messfläche und einer

Fläche zum Abtasten des Rauschens verwendet werden, wie in [Fig. 13A](#) aufgezeigt als (x'_{\min}, y'_{\min}) und (x'_{\max}, y'_{\max}) angegeben.

$$x'_{\min} = x_{\min} - \delta \quad (2)$$

$$y'_{\min} = y_{\min} - \delta \quad (3)$$

$$x'_{\max} = x_{\max} + \delta \quad (4)$$

$$y'_{\max} = y_{\max} + \delta \quad (5)$$

[0072] Es sei angemerkt, dass obwohl in diesem Beispiel lediglich eine rechteckige Fläche als die Messfläche angedacht ist, es auch möglich ist, eine Fläche anzuwenden, die um einen Betrag ausgedehnt ist, der bestimmt wird durch den obigen Ausdruck (1) in Bezug auf die binarisierte Fläche, während die Gestalt der Fläche beibehalten wird.

[0073] Dann wird eine tatsächliche Fläche des winzigen Punkts als ein physikalisches Objekt, das der binarisierten Fläche entspricht, aus der Anzahl an Pixeln und der Vergrößerung des optischen Systems berechnet und diese als D bestimmt. Es wird hier basierend auf einer Standardfläche D_0 des winzigen Punkts, die festgelegt wird, bei Erzeugung des Biochips **24**, und der gemessenen Fläche D des winzigen Punkts der folgende Ausdruck (6) berechnet.

$$\sigma = D_0/D(6)$$

[0074] Wenn der winzige Punkt **25** nicht mit dem Fremdmaterial abgedeckt ist, wie bei dem Teilbild **106** angezeigt, wird zu diesem Zeitpunkt $\sigma \approx 1$ erhalten. Wenn jedoch der winzige Punkt mit dem Fremdmaterial abgedeckt ist, wie bei dem Teilbild **107** angezeigt, wird $\sigma \gg 1$ erhalten. Die Intensitätsmessung wird unter Verwendung dieses σ lediglich dann ausgeführt, wenn z. B. $\sigma < 10$. Im Falle keiner Übereinstimmung wird bestimmt, dass es das Fremdmaterial oder ein Fehler des winzigen Punktes selbst ist und die dem winzigen Punkt entsprechenden Daten keine Verlässlichkeit aufweisen.

[0075] Unter Bezug auf die unterteilte Abbildung **106** wird die folgende Verarbeitung ausgeführt.

[0076] Das heißt, wie in [Fig. 13B](#) gezeigt, enthält das von dem CCD-Element **18** erhaltene Bildsignal üblicherweise das Rauschen. Obwohl diese Rauschkomponente abhängig ist von dem Aufbau der Vorrichtung oder einer Messumgebung ist das Anregungslichtrauschen (Rauschen, das durch das Anregungslicht erzeugt wird) basierend auf dem reflektierten Licht des Anregungslichts an dem Substrat (Biochip **24**) oder einer Selbstlichtemission des Substrats unter Verwendung des Anwendungslichts dominant und kann in einigen Fällen das Streulichtrauschen (Rauschen, das aufgrund einer Lichtquelle verursacht wird, die von dem Anregungslicht verschieden ist) nicht ignoriert werden. Es sei angemerkt, dass die [Fig. 13A](#) und [Fig. 13B](#) zum besseren Verständnis modellhafte Elemente aufzeigen, das zu erfassende Signal und das Rauschsignal tatsächlich jedoch nicht flach sind und in Abhängigkeit von der jeweiligen Position Unregelmäßigkeiten auftreten. Im Speziellen spiegelt das oben beschriebene Anregungsrauschen die Beleuchtungsunregelmäßigkeiten wieder und kann somit dieses Rauschen der größte Faktor der unregelmäßigkeiten in der Rauschkomponente sein.

[0077] Daher wird in dieser Ausführungsform eine Fläche, die innerhalb der unterteilten Bildfläche liegt und außerhalb des Messbereichs liegt als ein Bereich zur Rauschabtastung bestimmt und wird von den Signalen relativ zu Pixel in den Messbereich ein gemitteltetes Rauschsignal subtrahiert, das erhalten werden kann durch Teilen einer Gesamtsumme der Signale in der Rauschabtastungsfläche durch eine Fläche der Rauschabtastungsfläche.

[0078] Es wird dann eine Gesamtsumme der Erfassungssignale, die erhalten wird durch Subtraktion in der Messfläche, als eine Signalintensität P_0 des winzigen Punkts bestimmt. Die Signalintensität P_0 des winzigen Punkts wird ferner durch eine tatsächliche Fläche des winzigen Punkts (Normalisationsverarbeitung) korrigiert und wird das Ergebnis als ein Intensitätsmesswert P des winzigen Punkts bestimmt und wird dieser P durch den folgenden Ausdruck (7) berechnet. Es sei angemerkt, dass D_0 eine Standardfläche des winzigen Punkts ist und D eine tatsächliche Fläche ist, die erhalten wird aus der binarisierten Abbildung eines jeglichen winzigen Punkts, die vorher in diesem Beispiel errechnet wurde.

$$P = (D_0/D) P_0 \quad (7)$$

[0079] Diese Korrektur, d.h. die Normalisationsverarbeitung, kann das Rauschen eliminieren, das verursacht wird aufgrund eines Bildungsfehlers des winzigen Punktes oder eines Fehlers, wenn ein Teil des winzigen Punktes **25** durch das Fremdmaterial verdeckt wird.

[0080] Es sei angemerkt, dass die Abbildung des Biochips **24** gemeinschaftlich durch elektrisches Scannen unter Verwendung des CCD-Elements **18**, wie einem in dieser Ausführung verwendeten, aufgenommen wird und in dem Bildspeicher gespeichert wird, die vorliegende Erfindung jedoch nicht darauf beschränkt ist und die Abbildung des Biochips **24** natürlich unterteilt sein kann und durch Durchführen eines wie im Stand der Technik bekannten mechanischen Scannens natürlich unterteilt und aufgenommen werden kann, wodurch eine Gesamtabbildung des Biochips **24** im Bildspeicher erhalten wird. Eine Kombination der beiden Verfahren ermöglicht darüber hinaus die Verwendung eines großen Biochips, der nicht auf einmal vollständig von dem CCD-Element **18** abgebildet werden kann.

[0081] Darüber hinaus besitzt diese Ausführungsform die folgenden ihr eigenen Vorteile dieser Erfindung.

[0082] Das heißt, da das CCD-Element **18** verwendet wird, kann die Abbildung des Biochips **24** gemeinschaftlich verarbeitet werden, wodurch die Messzeit verkürzt wird. Da andererseits darüber hinaus eine Belichtungszeit verlängert werden kann, ist diese Ausführungsform vorteilhaft im Hinblick auf die Messempfindlichkeit der Intensität. Es sei angemerkt, dass jeder Aufbau in dieser Ausführungsform natürlich auf viele Arten und Weisen modifiziert und verändert werden kann. Zum Beispiel kann als die Bildverarbeitungsvorrichtung ein Personalcomputer verwendet werden. Auch ist es möglich als das CCD-Element **18** eine gekühlte CCD zu verwenden, die von einem Typ ist, der mittels eines Peltier-Elements oder dergleichen gekühlt wird.

[0083] Darüber hinaus kann durch Ausdehnen der Fremdmaterialfläche und deren Eliminieren aus der Fluoreszenzabbildung des winzigen Punktes ein Fehler betreffend das Fokussieren des optischen Systems absorbiert werden, wodurch der Einfluss des Rauschlichts des Fremdmaterials der Fluoreszenzabbildung des winzigen Punktes weiter verringert wird. Darüber hinaus kann in dieser Ausführungsform, sogar wenn der binarisierte Bereich keine kreisförmige Gestalt aufweist, wie in der Zeichnung aufgezeigt, aufgrund von Unregelmäßigkeiten in dem zu erfassenden Signal, oder sogar wenn eine Vielzahl der binarisierten Flächen in einer unterteilten Abbildung auftritt, eine Bestimmung einer rechteckigen Fläche, die definiert wird durch (x'_{\min}, y'_{\min}) und (x'_{\max}, y'_{\max}) als dem Messbereich garantieren, dass alle zu erfassenden Signale in diesem Messbereich enthalten sind.

[0084] Da die Rauschabtabstufungsfläche in der Nähe des winzigen Punktes gesetzt wird und die Signalintensität des winzigen Punktes korrigiert wird, kann die Erfassungsgenauigkeit des zu erfassenden Signals verbessert werden. Da darüber hinaus die Messfläche wie oben beschrieben unter Berücksichtigung einer Defokussierung festgelegt wird, ist es offensichtlich, dass kein Fokussierungsrauschen erzeugt wird.

Zweite Ausführungsform

[0085] Es wird nun unter Bezug auf die [Fig. 14](#) und [Fig. 16](#) ein Fluoreszenzintensitätsmessverfahren und eine Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung gemäß einer zweiten Ausführungsform beschrieben, die nicht Teil der vorliegenden Erfindung ist.

[0086] Es sei angemerkt, dass [Fig. 14](#) ein Blockdiagramm ist, das einen Abriss der Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung gemäß der zweiten Ausführungsform aufzeigt, und [Fig. 15](#) eine schematische Ansicht ist, die einen Referenzchip zeigt. Ferner ist [Fig. 16](#) ein Flussdiagramm, das ein Messverfahren gemäß dieser Ausführungsform zeigt.

[0087] In dieser Ausführungsform, wie in [Fig. 14](#) aufgezeigt, werden zum Zweck des Einstellens einer Lichtmenge, die auf das CCD-Element **18** trifft, eine Vielzahl an ND-Filtern **39**, von denen jeder einen bekannten Transmissionsgrad besitzt, selektiv in den Lichtpfad zwischen der Bilderzeugungslinse **17** und dem CCD-Element **18** eingefügt. Das heißt, es ist eine Vielzahl der ND-Filter **39** an der Filterhalteeinrichtung **40** befestigt, und der ND-Filter mit einem verschiedenen Transmissionsgrad wird zum Einsatz in den Lichtpfad basierend auf einem Kommando von der ND-Filtersteuereinrichtung **38** durch die ND-Filterumschalteneinrichtung **41** umgeschaltet.

[0088] Darüber hinaus wird in dieser Ausführungsform zusätzlich zu dem in [Fig. 3](#) dargestellten Biochip **24** auch ein Referenzchip **36** verwendet, wie er in [Fig. 15](#) aufgezeigt ist. Hier wird an den selben Positionen der winzigen Punkte **25** des Biochips **24** auf dem Referenzchip **36** die als eine Fluoreszenzmarkierung auf einem

Substrat wie einem Flachglas verwendete fluoreszierende Substanz als winzige Referenzpunkte **37**, welche eine bekannte Anzahl an fluoreszierenden Molekülen aufweisen, übertragen und fixiert, und es werden die selben fluoreszierenden Moleküle wie die Markierung an vier Ecken der Gruppe von winzigen Punkten, wie dem Biochip **24**, übertragen und als winzige Punkte **35** zur Positionserfassung fixiert.

[0089] Es sei angemerkt, dass das Verfahren zum Übertragen und Fixieren die Anzahl an zu verwendenden fluoreszierenden Molekülen anhand des Gewichts der zu verwendenden fluoreszierenden Moleküle und der Menge der Moleküle spezifiziert, eine Lösung der fluoreszierenden Moleküle mit dieser Anzahl an fluoreszierenden Molekülen erzeugt, um so eine spezifische Menge zu erhalten, und lediglich eine fest gelegte Menge dieser Lösung durch ein Tintenstrahlverfahren auf dem Substrat abgeschieden. Es ist darüber hinaus möglich, ein Verfahren zum In-Kontakt-Bringen der fluoreszierenden Substanz mit dem Substrat anzuwenden, bei dem bewirkt wird, dass die Lösung an einer Nadel anhaftet. Es sei angemerkt, dass die Anzahl an fluoreszierenden Molekülen pro winzigem Referenzpunkt aus verschiedenen Mengen (einer Menge der Lösung und der Anzahl an fluoreszierenden Molekülen in der Lösung) und einer eine Abscheidungsmenge der Lösung berechnet wird. Darüber hinaus ermöglicht die Verwendung eines Festphasenreagens als ein Verfahren zum Halten der fluoreszierenden Moleküle ein sicheres Halten der fluoreszierenden Moleküle, wobei dies jedoch nicht notwendigerweise erforderlich ist.

[0090] Dieser Referenzchip **36** wird auf einer nicht erläuterten zweiachsigen Bühne, wie sie in [Fig. 14](#) aufgezeigt wird, auf die selbe flache Ebene wie der Biochip **24** gegeben und kann mittels der zweiachsigen Bühne in einem Gesichtsfeld des optischen Systems positioniert werden.

[0091] Da der sonstige Aufbau der selbe wie der in der oberen beschriebenen ersten Ausführungsform ist, wird auf deren Erläuterungen verzichtet.

[0092] Unter Bezug auf das Flussdiagramm aus [Fig. 16](#) wird nun das Messverfahren beschrieben, welches die Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung mit einem derartigen Aufbau verwendet.

[0093] Als erstes wird der Referenzchip **36** so positioniert, dass er mit dem Gesichtsfeld der Objektivlinse **34** übereinstimmt (Schritt S1)

[0094] Das heißt, der Referenzchip **36** wird durch die nicht näher beschriebene zweiachsige Bühne auf eine solche Weise positioniert, dass ein durch die vier winzigen Positionierungspunkte **35** auf dem Referenzchip **36** definierter Bereich in einem Gesichtsfeldbereich enthalten ist, der bestimmt wird durch die Abbildungsvergrößerung eines optischen Beobachtungssystems und die Größe der Lichtempfangsfläche des CCD-Elements **18**.

[0095] Dann wird ein Fluoreszenzmessfilterset **7** an einer Aufnahmeposition positioniert (Schritt S2).

[0096] Das heißt, es wird ein Filtersetumschaltmechanismus **16** verwendet, um das Fluoreszenzmessfilterset **7** an der Aufnahmeposition so zu positionieren, dass die Fluoreszenzabbildung der winzigen Referenzpunkte **37** auf dem Referenzchip **36** aufgenommen werden kann.

[0097] Dann wird die Fluoreszenzabbildung des Referenzchips **36** von dem CCD-Element **18** aufgenommen, während die ND-Filter **39** umgeschaltet werden (Schritt S3).

[0098] Das heißt, der Referenzchip **36** wird einer Anregungsbeleuchtung unterzogen und wird während eines Umschaltens einer Vielzahl der ND-Filter **39** eine Abbildung der von den fluoreszierenden Molekülen in den winzigen Referenzpunkten **37** erzeugten Fluoreszenz aufgenommen. Es sei angemerkt, dass in dieser Ausführungsform das CCD-Element **18** als das Lichtaufnahmeelement verwendet wird, jedoch die vorliegende Erfindung nicht auf das CCD-Element beschränkt ist und ein beliebiger anderer Flächensensor angewendet werden kann. Daher kann das unten beschriebene "CCD-Element" durch einen Flächensensor ausgeführt sein.

[0099] Anschließend wird eine Hintergrundabbildung des Referenzchips **36** von dem CCD-Element **18** aufgenommen, während die ND-Filter **39** umgeschaltet werden (Schritt S4).

[0100] Das heißt, die Anregungsbeleuchtung wird unmittelbar nach der Aufnahme der Fluoreszenzabbildung des Referenzchips **36** unterbrochen und die Hintergrundabbildung aufgenommen. Diese Hintergrundabbildung besteht aus einem Dunkelstrom und einem Streulichtstrahl, welche nicht für die Erfassungintensität erforderlich sind.

- [0101] Der Referenzchip **36** wird dann aus dem Gesichtsfeld bewegt und der Biochip **24** in dem Gesichtsfeld positioniert (Schritt S5).
- [0102] Das heißt, der Biochip **24** wird durch die nicht veranschaulichte zweiachsige Bühne auf eine solche Weise positioniert dass die vier winzigen Positionierungspunkte **35** auf dem Biochip **24** im Wesentlichen mit den Positionen der winzigen Positionierungspunkte **35** auf dem Referenzchip **36** übereinstimmen.
- [0103] Es wird dann die Fluoreszenzabbildung des Biochips **24** von dem CCD-Element **18** aufgenommen, während die ND-Filter **39** umgeschaltet werden (Schritt S6).
- [0104] Das heißt, der Biochip **24** wird einer Anregungsbeleuchtung ausgesetzt und eine Abbildung der durch die Fluoreszenzmoleküle in jedem winzigen Punkt erzeugten Fluoreszenz durch das CCD-Element **18** aufgenommen. Zu diesem Zeitpunkt wird die Fluoreszenzabbildung aufgenommen, während eine Vielzahl der ND-Filter **39** umgeschaltet werden.
- [0105] Durch das CCD-Element **18** wird dann eine Hintergrundabbildung des Biochips **24** aufgenommen, während die ND-Filter **39** umgeschaltet werden (Schritt S7).
- [0106] Das heißt, unmittelbar nach der Aufnahme der Fluoreszenzabbildung des Biochips **24** wird die Anregungsbeleuchtung unterbrochen und die Hintergrundbeleuchtung aufgenommen. Diese Hintergrundabbildung besteht aus einem Dunkelstrom und einem Streulichtstrahl, welche wie bei der Hintergrundabbildung des Referenzchips **36** nicht für die Erfassungintensität erforderlich sind.
- [0107] Anschließend wird der Filter auf das Filterset **11** zur Aufnahme der Fremdmaterialabbildung umgeschaltet (Schritt S8).
- [0108] Das heißt, es wird der Filtersetumschaltmechanismus **16** verwendet, um das Filterset **11** zur Aufnahme der Fremdmaterialabbildung an einer Aufnahmeposition zu positionieren, um so eine Abbildung des Fremdmaterials auf dem Biochip **24** aufzunehmen.
- [0109] Danach wird eine Abbildung des Fremdmaterials auf dem Biochip aufgenommen (Schritt S9).
- [0110] Das heißt, das Fremdmaterial auf dem Biochip **24** wird durch das Licht mit einer Wellenlänge, bei der die fluoreszierende Markierungssubstanz nicht angeregt wird, beleuchtet und es wird eine Abbildung von dem Fremdmaterial durch das CCD-Element **18** unter Verwendung der von dem Fremdmaterial erzeugten Fluoreszenz (Selbstlichtemission) oder dem reflektierten Licht aufgenommen.
- [0111] Die Fremdmaterialabbildung wird dann binarisiert (Schritt S10).
- [0112] Das heißt, die aufgenommene Fremdmaterialabbildung oder deren Differenzialabbildung wird unter Verwendung eines spezifischen Grenzwertes binarisiert, die Fremdmaterialfläche spezifiziert und diese Abbildung als eine binarisierte Fremdmaterialabbildung bestimmt.
- [0113] Anschließend werden die entsprechenden Hintergrundabbildungen von den Fluoreszenzabbildungen des Referenzchips **26** und des Biochips **24** abgezogen, wodurch korrigierte Abbildungen erhalten werden (Schritt S11).
- [0114] Das heißt, eine Ausgabe des Lichtempfangselements umfasst im Allgemeinen ein Direktstromrauschen wie ein Dunkelstromrauschen oder ein Streulichtrauschen. Um dieses Direktstromrauschen zu eliminieren, werden die Hintergrundabbildungen von den entsprechenden Fluoreszenzabbildungen des Referenzchips **36** und des Biochips **24** abgezogen und werden die resultierenden Abbildungen als korrigierte Abbildungen bezeichnet, welche die Ziele der nachfolgenden Verarbeitung sein werden. Dies wird gemäß jedem großen ND-Filter durchgeführt.
- [0115] Danach wird in jeder korrigierten Abbildung eine Position des Gravitationszentrums der Abbildung entsprechend den winzigen Punkten zur Positionserfassung erfasst (Schritt S12).
- [0116] Das heißt, die winzigen Punkte **25** und die winzigen Referenzpunkte **37**, die auf dem Referenzchip **36** und dem Biochip **24** angeordnet sind, sind wie in den [Fig. 3](#) und [Fig. 15](#) zweidimensional angeordnet, und es werden alle vier winzigen Punkte, die an den vier Ecken angeordnet sind, als die winzigen Punkte **35** zur Po-

sitionserfassung verwendet. Da die winzigen Punkte **35** zur Positionserfassung zur Ausgabe von Positionssignalen verwendet werden, ist jegliche Substanz in diesem Element ausreichend, solange sie eine lumineszierende Substanz oder eine reflektierende Substanz ist. Es ist jedoch bevorzugt, eine fluoreszierende Substanz mit einer Fluoreszenzwellenlänge zu verwenden, die von der Fluoreszenzwellenlänge der als eine Markierung verwendeten fluoreszierenden Substanz verschieden ist. Der Grund hierfür ist, dass damit die Möglichkeit ausgeräumt wird, dass die von den winzigen Punkten **35** zur Positionserfassung erzeugte Fluoreszenz als ein Rauschen wirkt. In diesem Fall wird die Beleuchtung durch die Anregungswellenlänge ausgeführt, die den winzigen Punkten **35** zur Positionserfassung eigen ist, und eine Positionserfassung bewirkt. Zur Positionserfassung wird ein Verfahren zur Bestimmung einer Gravitationszentrumskoordinate als eine Positionskoordinate von jedem der vier winzigen Punkte **35** zur Positionserfassung angewendet, oder es werden ein Verfahren zur Einarisierung der korrigierten Abbildung durch Verwenden eines Niveaus von $\frac{1}{2}$ der maximalen Intensität und Bestimmen der vier Schwerpunkte als Positionskoordinaten oder ein ähnliches Verfahren angewendet.

[0117] Zusätzlich wird jede korrigierte Abbildung gedreht und bewegt, wodurch für jeden ND-Filter eine Rotationsabbildung erhalten wird (Schritt S13).

[0118] Das heißt, die Positionskoordinaten werden derart korrigiert, dass ein Viereck, das durch die Positionskoordinaten der vier winzigen Punkte **35** zur Positionserfassung gebildet wird, bzw. relativ zu dem Referenzchip **36** und dem Biochip **24** erhalten wird, zu einem Rechteck mit einer minimalen Ablenkung wird und die korrigierten Abbildungen gedreht und bewegt werden, wobei der Mittelpunkt einer jeden Abbildung auf dem Mittelpunkt der Rotation liegt, so dass jede Seite dieses Rechtecks parallel mit der Koordinatenachse einer jeden Abbildung wird. Eine nach einer Bewegung erhaltene Abbildung wird als eine Rotationsabbildung bezeichnet. Zu diesem Zeitpunkt wird die binarisierte Fremdmaterialabbildung ebenfalls um denselben Betrag wie der Biochip **24** gedreht und bewegt.

[0119] Dann wird unter Verwendung der binarisierten Fremdmaterialabbildung als einer Maske in Bezug auf die Fluoreszenzabbildung des Biochips **24** die Intensitätsinformation der Fluoreszenzabbildung, die mit der Fremdmaterialfläche übereinstimmt, deaktiviert (Schritt S14).

[0120] Das heißt, es wird mittels der Bildverarbeitungseinrichtung **22** eine logische Multiplikation der als die binarisierte Fremdmaterialabbildung erhaltenen Abbildung mit einer Fluoreszenzabbildung des Biochips **24** durchgeführt und es werden die Intensitätsdaten der Pixel der Fluoreszenzabbildung des Biochips **24**, die mit der binarisierten Fremdmaterialfläche übereinstimmen, auf "0" gesetzt.

[0121] Danach wird jede Rotationsabbildung in Abbildungen für jeden winzigen Referenzpunkt **37** und jeden winzigen Punkt **25** unterteilt und werden die resultierenden Abbildungen als die unterteilte Abbildung für jeden ND-Filter und jeden winzigen Punkt bestimmt (Schritt S15).

[0122] Das heißt, die Divisionsbedingungen werden basierend auf den Positionskoordinaten der vier winzigen Positionspunkte in Bezug auf jede Rotationsabbildung des Referenzchips **36** und des Biochips **24** und der Anordnungsbedingungen der winzigen Referenzpunkte **37** und der Referenzpunkte **25** bestimmt und es werden unter den Divisionsbedingungen alle Rotationsabbildungen zu Abbildungen für jeden winzigen Referenzpunkt **37** oder jeden winzigen Punkt **25** unterteilt, wodurch die unterteilten Abbildungen erhalten werden.

[0123] Dann wird jede unterteilte Abbildung entsprechend einem optimalen ND-Filter **39** als eine Messabbildung für jedes Element extrahiert (Schritt S16).

[0124] Das heißt, eine unterteilte Referenzabbildung, deren maximale Signalintensität innerhalb eines dynamischen Bereichs des CCD-Elements **18** fällt, und deren Intensitätssignal maximal ist, wird aus der unterteilten Referenzabbildung, deren Zahl der Zahl der ND-Filter in Bezug auf die winzigen Referenzpunkte **37** bei den selben Positionen auf dem Referenzchip **36** entspricht, extrahiert und diese als eine Messreferenzabbildung bezeichnet. Gleichermaßen wird eine unterteilte Abbildung, deren maximale Signalintensität innerhalb eines dynamischen Bereichs des CCD-Elements **18** fällt und deren Signalintensität maximal ist, aus den unterteilten Abbildungen, deren Zahl der Zahl der ND-Filter relativ zu den winzigen Punkten **25** an denselben Positionen auf dem Biochip **24** entspricht, extrahiert und diese als eine Messprobenabbildung bezeichnet. Für die Messreferenzabbildung und die Messprobenabbildung wird die korrigierte Intensität R_k (= die maximale Intensität in der unterteilten Abbildung \times Transmissionsgrad des ND-Filters **39**, der zur Aufnahme verwendet wird) in der absteigenden Ordnung des Transmissionsgrads T_k eines jeden ND-Filters **39**, der für die Aufnahme verwendet wird, erhalten. In diesem Beispiel ist k eine Zahl, die jedem ND-Filter in absteigender Ordnung des Transmissionsgrads gegeben wird ($k = 1$ bis n). Wenn ein Änderungsverhältnis von R_k ($= (P_{k+1}/T_{k+1}) - (P_k/T_k)$) der nega-

tiven Bedingung genügt, wird eine Abbildung entsprechend der ND-Filterzahl k extrahiert.

[0125] Dann wird jede extrahierte Messabbildung binarisiert, wodurch eine binarisierte Abbildung für jedes Element erhalten wird (Schritt S17).

[0126] Das heißt, alle Messreferenzabbildungen und die Messprobenabbildungen werden mit einem Mittelwert aus dem Maximalsignal und dem Minimalsignal in jeder Abbildung, der als ein Grenzwert bestimmt wird, binarisiert und die resultierenden Abbildungen als binarisierte Referenzabbildungen und binarisierte Probenabbildungen bestimmt. Hier wird für die binarisierte Probenabbildung eine Fläche D der binarisierten Fläche berechnet.

[0127] Danach werden die Messflächen und die Rauschabtafäche unter Verwendung einer jeden binarisierten Abbildung festgelegt (Schritt S18).

[0128] Das heißt, es werden in Bezug auf alle binarisierten Referenzabbildungen eine maximale X-Koordinate x_{Rmax} , eine minimale X-Koordinate x_{Rmin} , eine maximale Y-Koordinate y_{Rmax} und eine minimale Y-Koordinate y_{Rmin} einer jeden Abbildung erhalten. Gleichmaßen werden in Bezug auf alle binarisierten Probenabbildungen eine maximale X-Koordinate x_{Smax} , eine minimale X-Koordinate x_{Smin} , eine maximale Y-Koordinate y_{Smax} und eine minimale Y-Koordinate y_{Smin} einer jeden Abbildung erhalten und es werden dann x'_{Rmax} , x'_{Rmin} , y'_{Rmax} , y'_{Rmin} , x'_{Smax} , x'_{Smin} , y'_{Smax} und y'_{Smin} , die zur Festlegung der Abtafäche des Rauschens verwendet werden, unter Verwendung der folgenden Gleichungen berechnet.

$$x'_{min} = x_{min} - \delta \quad (8)$$

$$y'_{min} = y_{min} - \delta \quad (9)$$

$$x'_{max} = x_{max} + \delta \quad (10)$$

$$y'_{max} = y_{max} + \delta \quad (11)$$

[0129] In dem obigen Ausdruck ist δ eine Menge, die eine Unschärfemenge des optischen Systems angibt und wird angegeben durch den folgenden Ausdruck.

$$\delta = \beta \cdot (1.619 \frac{\lambda}{2} + \alpha |\Delta|) \quad (12)$$

[0130] Es sei angemerkt, dass β eine Abbildungsvergrößerung des optischen Systems ist, λ eine zur Ausbildung der Abbildungen der winzigen Punkte **25** und der winzigen Referenzpunkte **37** verwendete Wellenlänge ist, α eine numerische Apertur der Objektivlinse **34** auf der Seite des Biochips ist und Δ eine Defokussierungsmenge ist.

[0131] Das Innere eines Rechtecks, das durch die hierin berechneten Punkte (x'_{Rmin}, y'_{Rmin}) und die Punkte (x'_{Rmax}, y'_{Rmax}) definiert ist, wird als die Messfläche der Messreferenzabbildung bestimmt, und der Bereich außerhalb des Rechtecks wird als die Rauschabtafäche der Messreferenzabbildung bestimmt. Gleichmaßen wird das Innere des Rechtecks, das durch den Punkt (x'_{Smin}, y'_{Smin}) und den Punkt (x'_{Smax}, y'_{Smax}) definiert ist, als die Messfläche der Messprobenabbildung bestimmt, und der Bereich außerhalb des Rechtecks wird als die Rauschabtafäche der Messprobe bestimmt.

[0132] Anschließend wird ein mittleres Rauschsignal von dem Signal der Messfläche auf der Messabbildung subtrahiert (Schritt S19).

[0133] Das heißt, das Rauschen pro Einheitsfläche wird erhalten aus dem Signal in der Rauschabtafäche, das in der Messreferenzabbildung festgelegt ist, wobei dieses Signal von dem Signal der Messfläche in der Messreferenzabbildung subtrahiert wird, und es wird ein Ergebnis als ein Erfassungssignal der Messreferenzabbildung bestimmt. Gleichmaßen wird das Rauschen pro Einheitsfläche aus dem Signal der Rauschabtafäche erhalten, die in der Messprobenabbildung festgelegt ist, wobei dieses Signal von dem Signal der Messfläche in der Messprobenabbildung subtrahiert wird, und es wird ein Ergebnis als ein Erfassungssignal der Messprobenabbildung bestimmt.

[0134] Dann wird eine Signalintensität pro Standardfläche des winzigen Punkts **25** berechnet (Schritt S20).

[0135] Das heißt, es wird eine Gesamtsumme der Erfassungssignale in den Messflächen der Messreferenzabbildung entsprechend eines jeden winzigen Referenzpunkts **36** berechnet und dies als P_R bestimmt. Darüber hinaus wird ein Maximalwert der Gesamtsumme P_{Rmax} der Erfassungssignale entsprechend einer Vielzahl der winzigen Punkte **25** als P_{Rmax} bestimmt. Des Weiteren wird eine Gesamtsumme der Erfassungssignale in der Messfläche der Messprobenabbildung entsprechend eines jeden winzigen Punkts **25** berechnet und dies als P_{D0} bestimmt. Es wird dann die Signalintensität P_D pro Standardfläche des winzigen Punkts **25** unter Verwendung des folgenden Ausdrucks (13) berechnet. Diese Signalintensitäten werden als Intensitäten mit einem Intensitätsfehler erhalten, der erzeugt wird aufgrund von Unregelmäßigkeiten des Anregungslichts, Rauschen des Anregungslichts und Bildungsfehlern der winzigen Punkte, die davon entfernt werden.

$$P_D = \frac{D_0}{D} \cdot \frac{P_R}{P_{Rmax}} P_{D0} \quad (13)$$

[0136] Da die Anregungslichtmenge unter Verwendung des Referenzchips **36** korrigiert wird, wenn die Intensität des Biochips **24** gemessen wird, können gemäß dieser oben beschriebenen Ausführungsform räumliche und zeitliche Fluktuationen des Anregungslichts ausgeräumt werden.

[0137] Obwohl die vorliegende Erfindung basierend auf den Ausführungsformen beschrieben wurde, ist die vorliegende Erfindung nicht auf die vorherige Ausführungsform beschränkt und sind natürlich zahlreiche Modifikationen oder Anwendungen innerhalb des Umfangs der anhängenden Ansprüche möglich.

Industrielle Anwendbarkeit

[0138] Wie oben beschrieben ist die vorliegende Erfindung auf dem technischen Gebiet der chemischen und physikalischen Eigenschaftsanalyse eines biologischen Materials wie einer DNA oder eines Proteins wirksam.

Patentansprüche

1. Fluoreszenzintensitätsmessverfahren, das die Intensität winziger Punkte misst, die auf einem Substrat mit einer im Wesentlichen flachen Oberfläche angeordnet sind und eine fluoreszierende Substanz enthalten, umfassend:

einen ersten Bilderzeugungsschritt, bei dem Licht mit einer Wellenlänge, mit der die fluoreszierende Substanz angeregt werden kann, emittiert wird und eine Abbildung eines jeden winzigen Punktes, der die fluoreszierende Substanz enthält, als eine erste Abbildung erhalten wird;

einen zweiten Bilderzeugungsschritt, bei dem durch Licht mit einer Wellenlänge, die die fluoreszierende Substanz nicht anregt, eine Abbildung von an dem Substrat anhaftendem Fremdmaterial als eine zweite Abbildung erhalten wird;

einen Extraktionsschritt, bei dem eine binarisierte Abbildung durch Extrahieren einer Fremdmaterialfläche aus der zweiten Abbildung erhalten wird; und

einen Fremdmaterialeliminierungsschritt, bei dem man an einem Abschnitt, der mit der Fremdmaterialfläche überlappt, in der ersten Abbildung keine Abbildung zustande kommen lässt, wobei die binarisierte Abbildung als eine Maske verwendet wird;

dadurch gekennzeichnet, dass

der Extraktionsschritt die binarisierte Abbildung erhält durch Anwenden eines Differentialoperators auf die zweite Abbildung und Bestimmen eines Binarisierungsniveaus der binarisierten Abbildung durch Verwenden einer Frequenzverteilung des jedem Pixel entsprechenden Differenzsignals.

2. Fluoreszenzintensitätsmessverfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass es ferner einen Ausdehnungsschritt umfasst, bei dem die Fremdmaterialfläche der binarisierten Abbildung um einen festgelegten Betrag ausgedehnt wird.

3. Fluoreszenzintensitätsmessverfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass es ferner einen Normalisierungsschritt umfasst, bei dem die gemessene Intensität des winzigen Punktes durch Verwenden einer Referenzfläche für den winzigen Punkt normalisiert wird.

4. Fluoreszenzintensitätsmessverfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass es ferner einen Zuverlässigkeitsbeurteilungsschritt umfasst, bei dem nach dem Fremdmaterialeliminierungsschritt für jeden winzigen Punkt eine Fläche erhalten wird und die Zuverlässigkeit des Messwertes beurteilt wird unter Verwendung eines Verhältnisses der erhaltenen Fläche und der Referenzfläche für den winzigen Punkt.

5. Fluoreszenzintensitätsmessverfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass das Differenzsignal mit einer Intensität in einer winzigen Fläche, die dem Differenzsignal entspricht, standardisiert wird.

6. Fluoreszenzintensitätsmessvorrichtung, welche die Intensität einer Fluoreszenzabbildung misst, die erhalten wird durch Bestrahlen von winzigen Punkten, die auf einem Substrat mit einer im Wesentlichen flachen Oberfläche angeordnet sind und eine fluoreszierende Substanz enthalten, mit einem Anregungslicht, umfassend:

eine Lichtquelle (**2**);

ein erstes Wellenlängenauswahlmittel (**8, 9, 12, 13**) zur Wahl einer Wellenlänge des Anregungslichtes;

Abbildungserzeugungsmittel (**17**) zum Erzeugen einer Abbildung der fluoreszierende Substanz;

zweites Wellenlängenauswahlmittel (**10, 14**) zur Wahl lediglich einer Wellenlänge einer erzeugten Fluoreszenz;

photoelektrisches Umwandlungsmittel (**18**) zum Erhalt einer Abbildung durch Abtasten einer Fluoreszenzabbildung;

Speichermittel (**21**) zur Speicherung der Abbildung; und

Bildverarbeitungsmittel (**22**), das ausgelegt ist für:

eine Verarbeitung zum Emittieren von Licht mit einer Wellenlänge, die die fluoreszierende Substanz anregen kann, in dem Licht von der Lichtquelle durch Steuern des ersten Wellenlängenauswahlmittels, um mittels des photoelektrischen Umwandlungsmittels eine Abbildung des winzigen Punktes, der die fluoreszierende Substanz enthält, als eine erste Abbildung zu erhalten durch Steuern des zweiten Wellenlängenauswahlmittels, und zum Speichern der ersten Abbildung in dem Speichermittel;

eine Verarbeitung zum Emittieren von Licht mit einer Wellenlänge, die die fluoreszierende Substanz nicht anregt, in dem Licht von der Lichtquelle durch Steuern des ersten Wellenlängenauswahlmittels, um mittels des photoelektrischen Umwandlungsmittels eine Abbildung des an dem Substrat anhaftenden Fremdmaterials zu erhalten durch Steuern des zweiten Wellenlängenauswahlmittels, und zum Speichern der zweiten Abbildung in dem Speichermittel;

eine Verarbeitung zum Erhalt einer binarisierten Abbildung durch Extrahieren einer Fremdmaterialfläche aus der in dem Speichermittel gespeicherten zweiten Abbildung; und

eine Verarbeitung bei der man an einem Abschnitt, der mit der Fremdmaterialfläche überlappt, in der in dem Speichermittel gespeicherten ersten Abbildung keine Abbildung zustande kommen lässt, wobei die binarisierte Abbildung als eine Maske verwendet wird;

dadurch gekennzeichnet, dass

das Bildverarbeitungsmittel eine binarisierte Abbildung erhält durch Anwenden einer Differentialoperators auf die zweite Abbildung und Bestimmen eines Binarisierungsniveaus der binarisierten Abbildung durch Verwenden einer Frequenzverteilung des jedem Pixel entsprechenden Differenzsignals.

Es folgen 12 Blatt Zeichnungen

Anhängende Zeichnungen

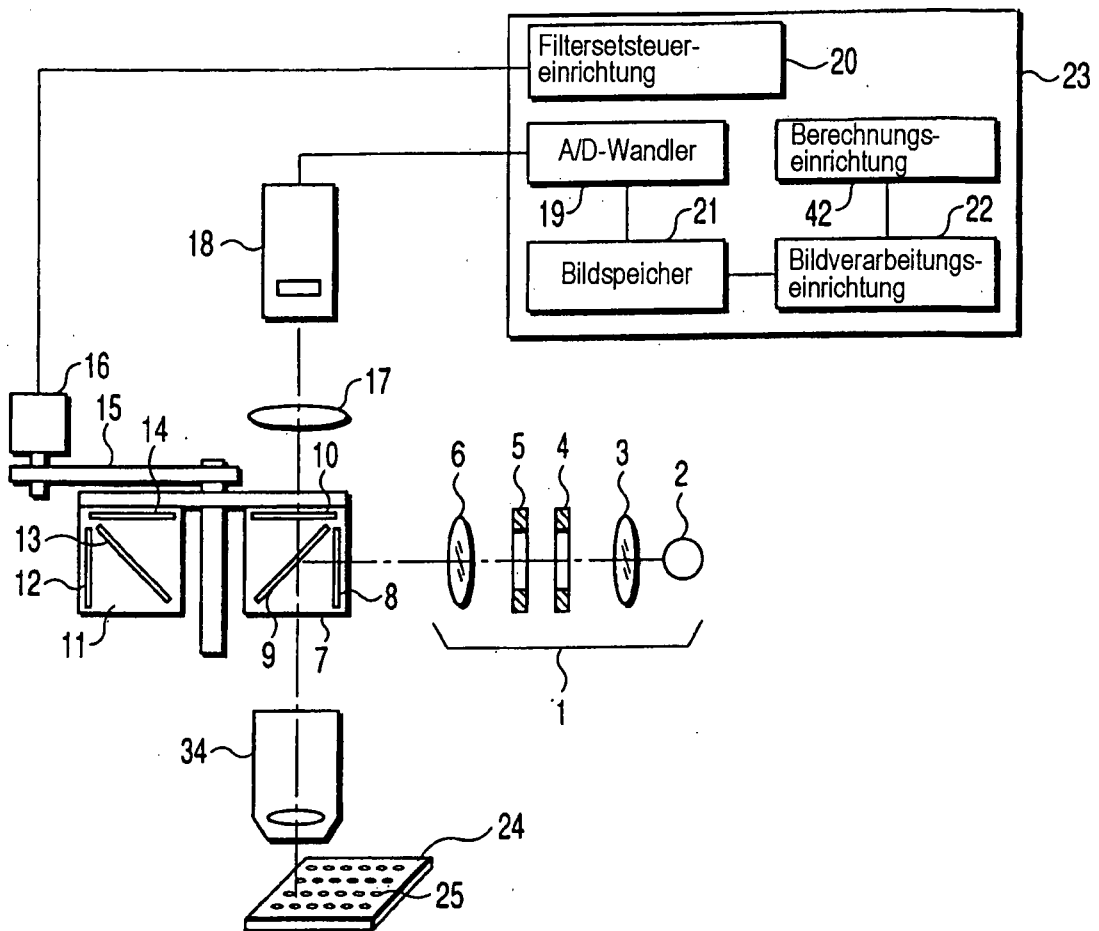


FIG. 1

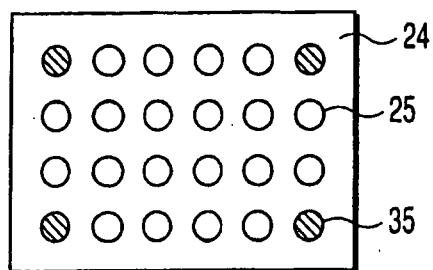
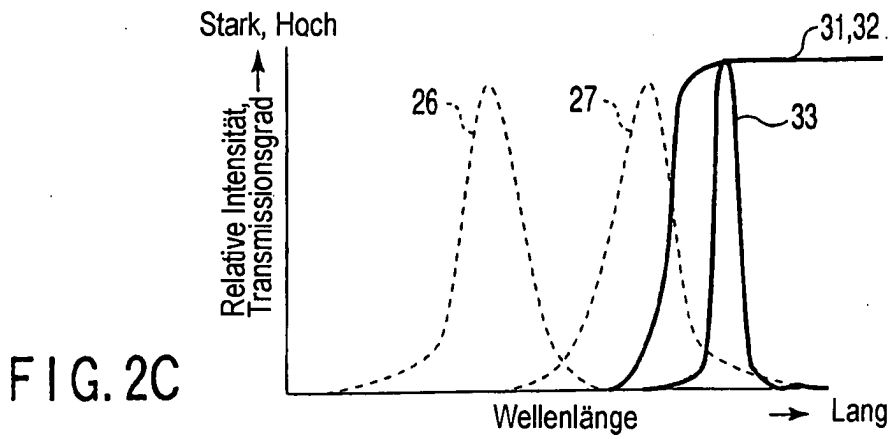
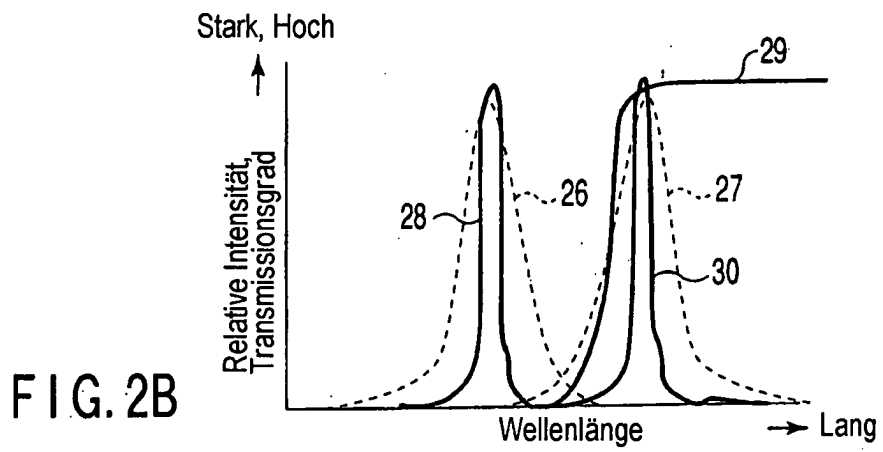
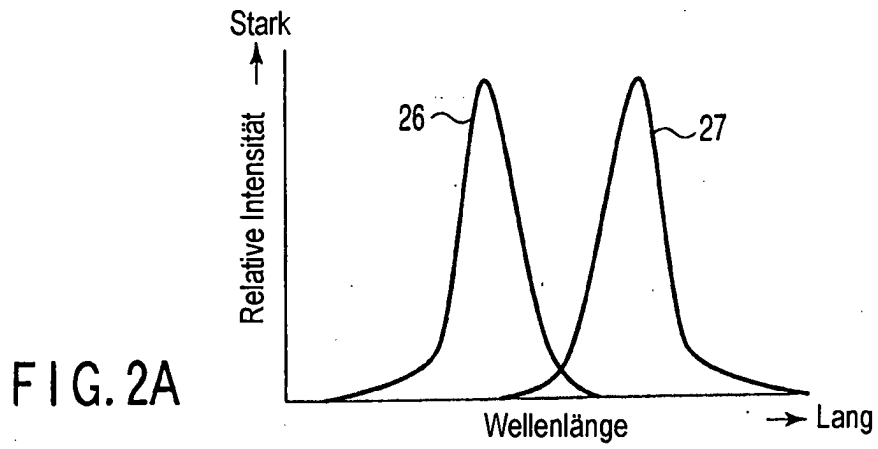


FIG. 3



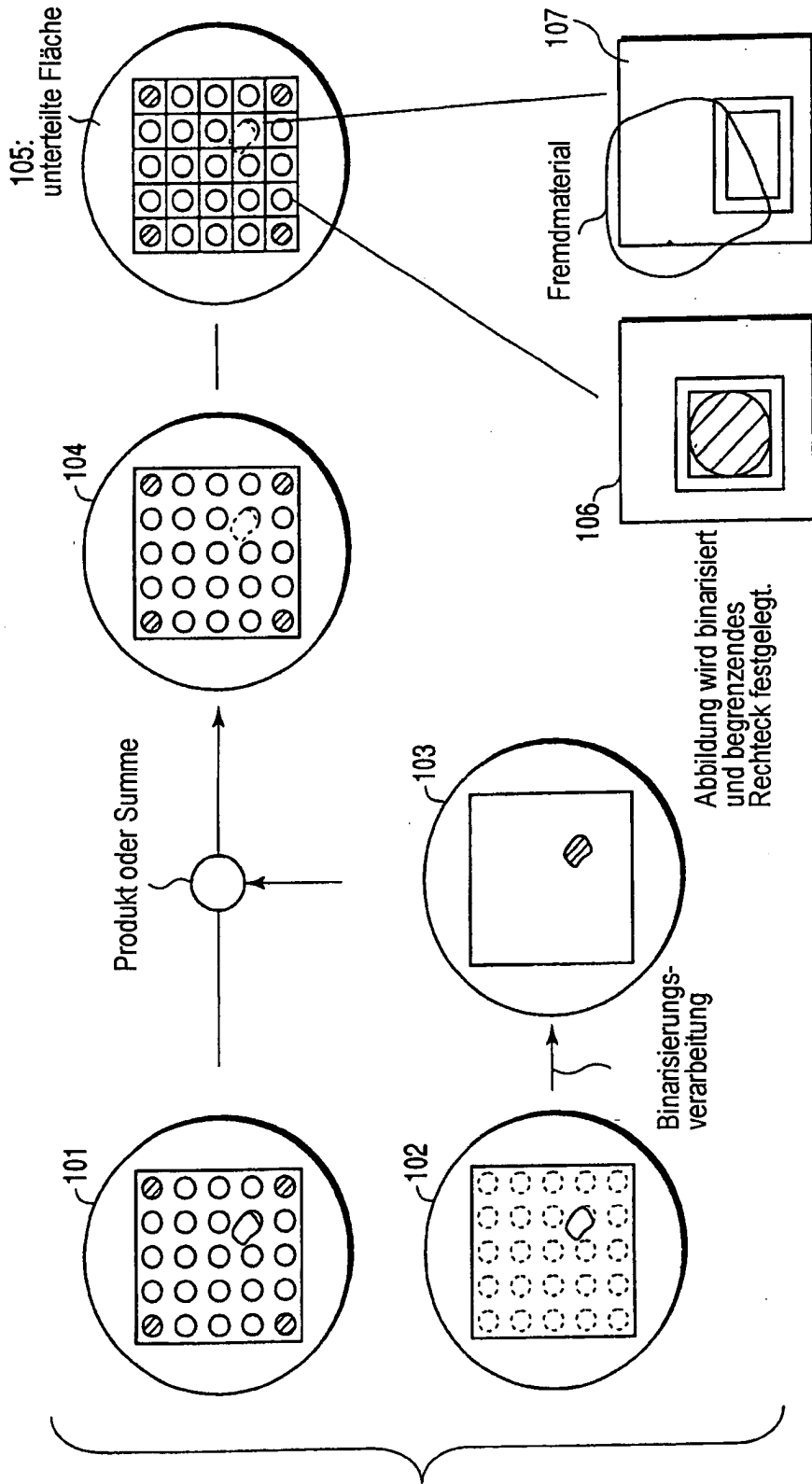


FIG. 4

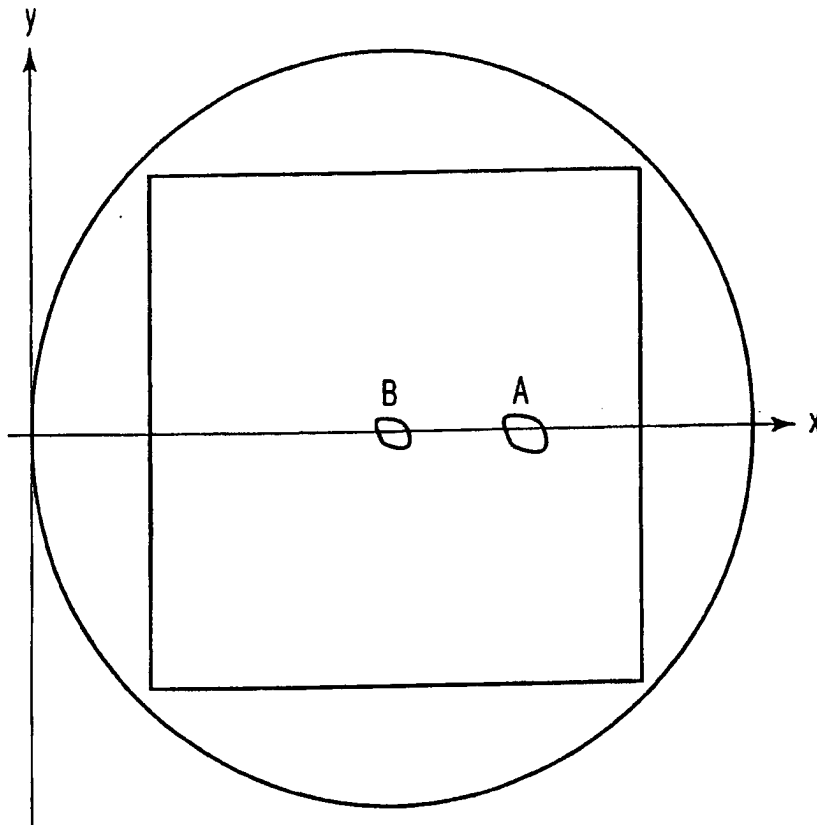


FIG. 5B

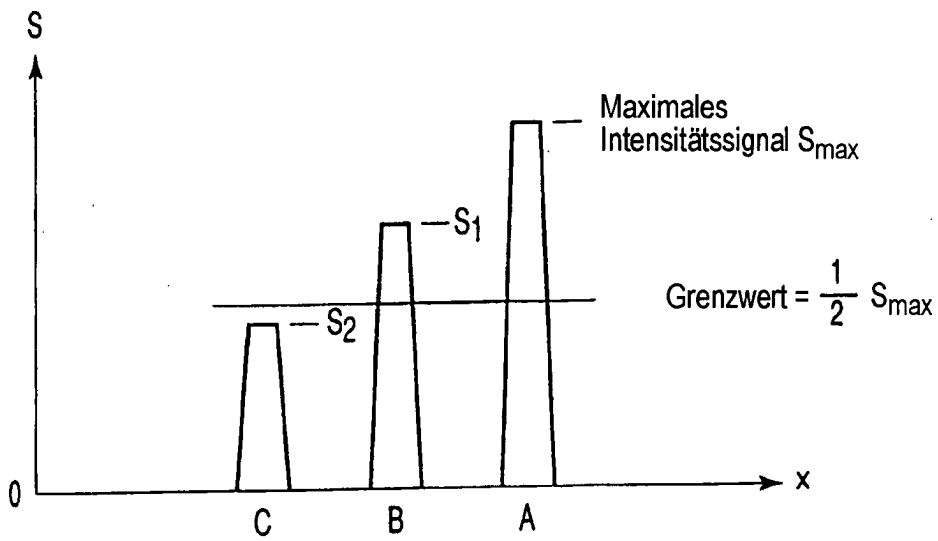


FIG. 5A

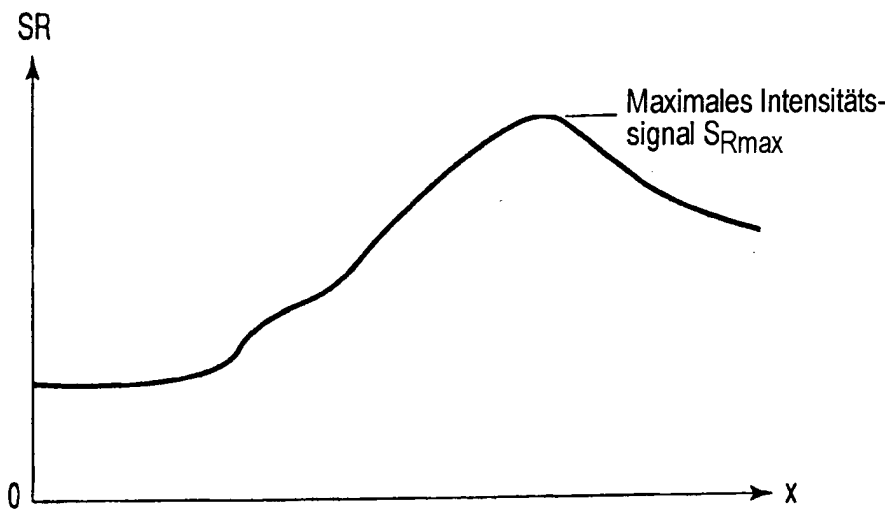


FIG. 6

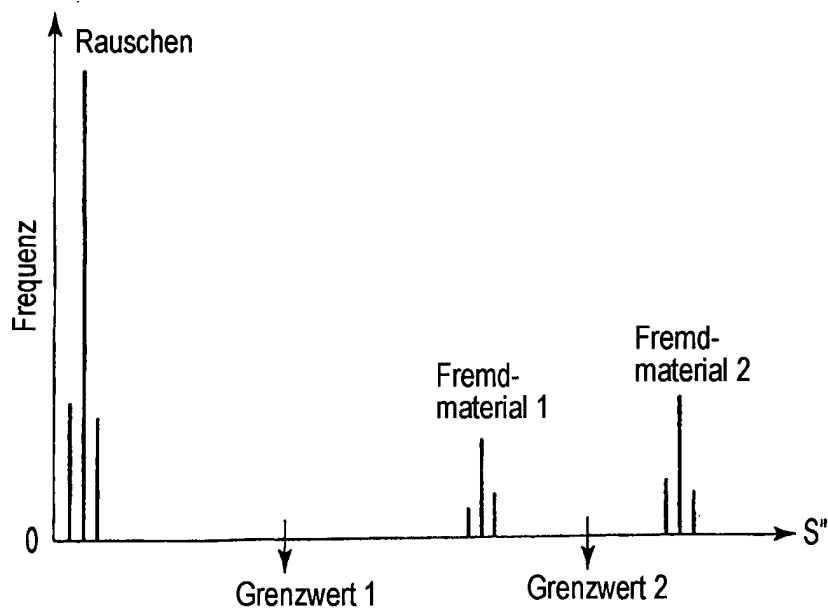


FIG. 12

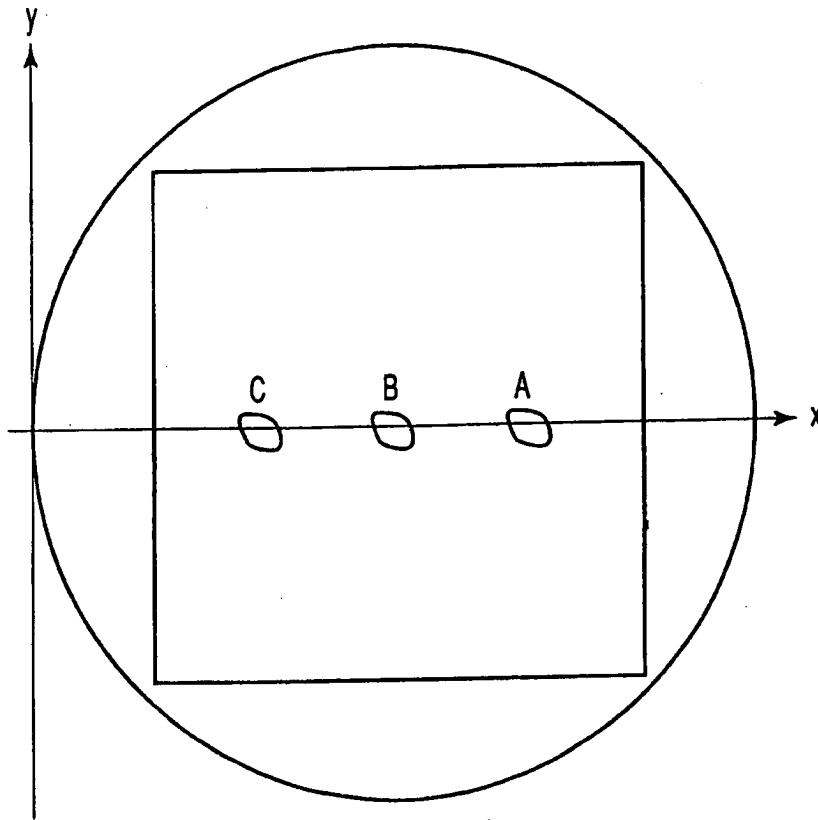


FIG. 7B

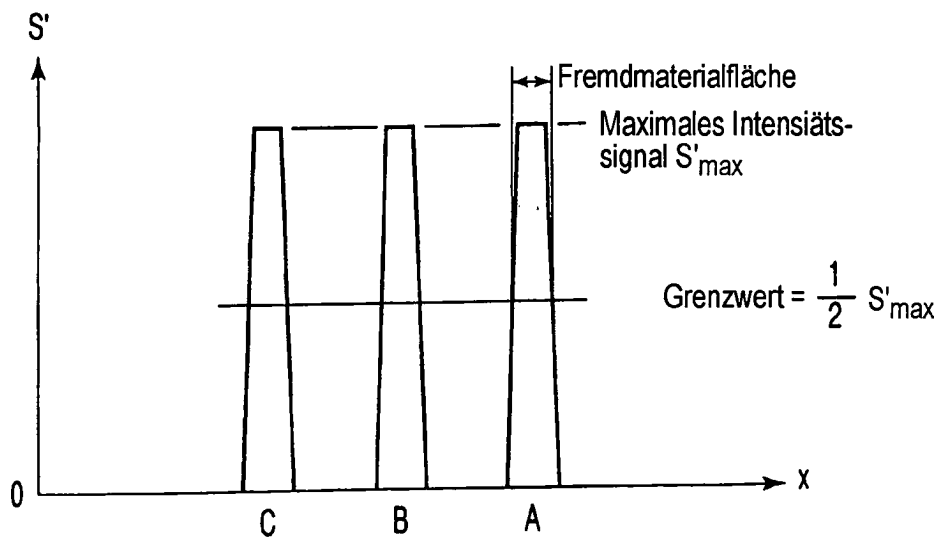


FIG. 7A

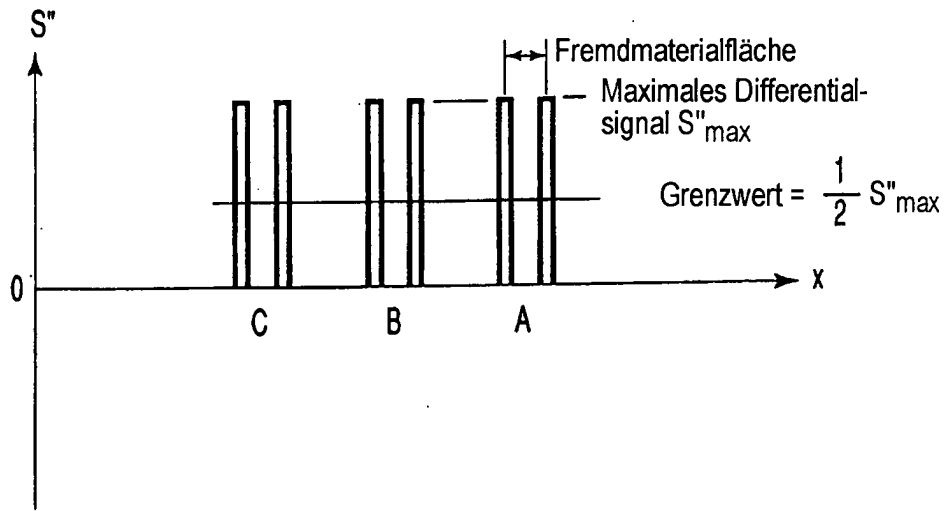


FIG. 8

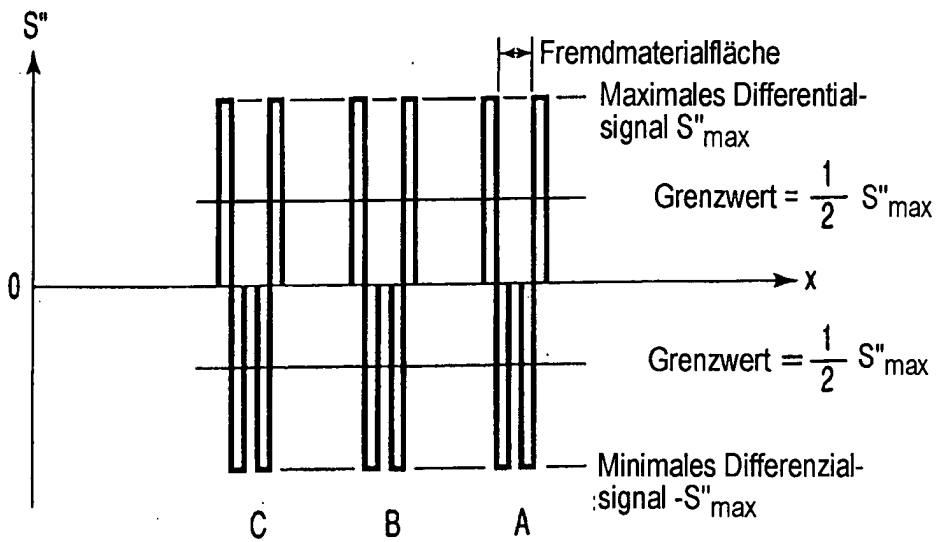


FIG. 9

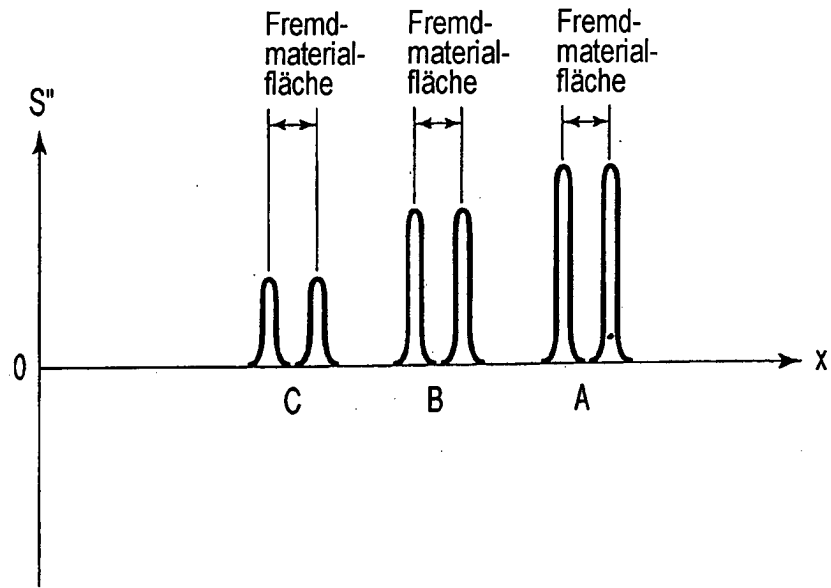


FIG. 10

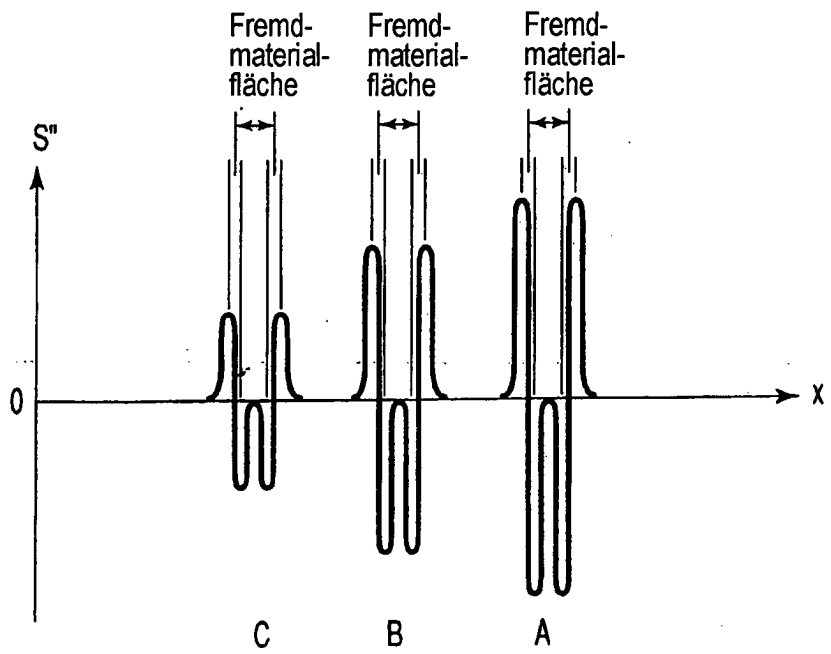


FIG. 11

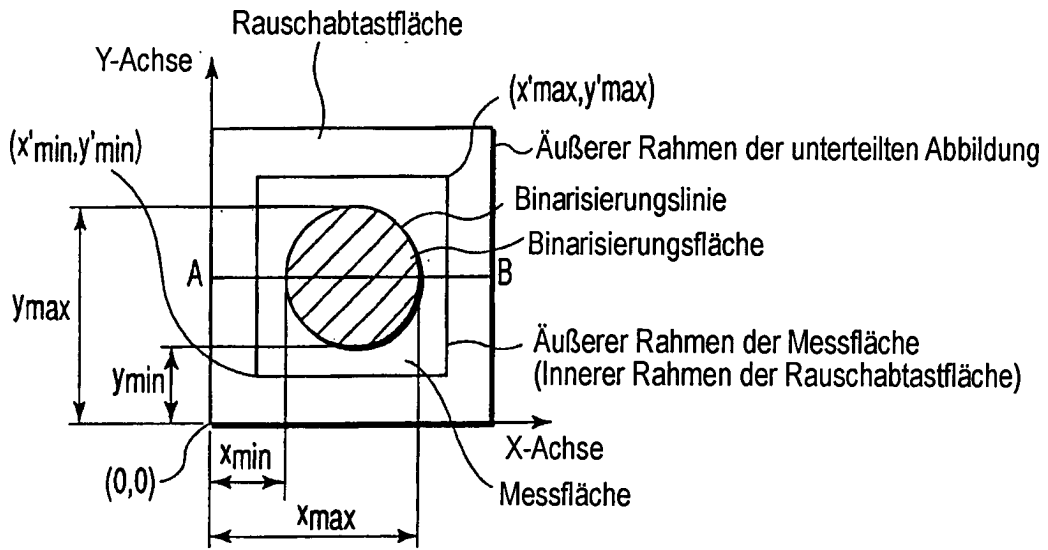


FIG. 13A

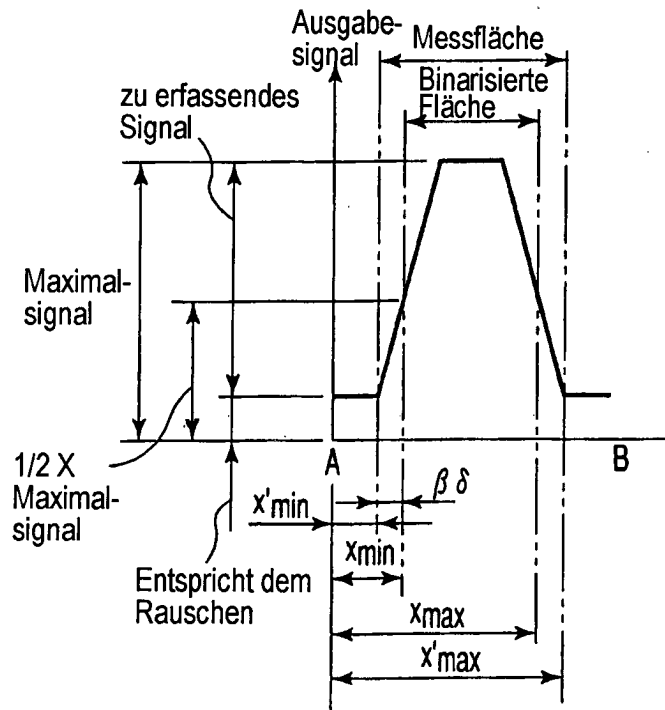
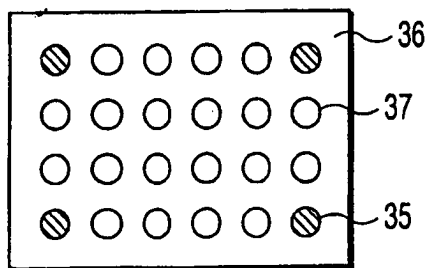
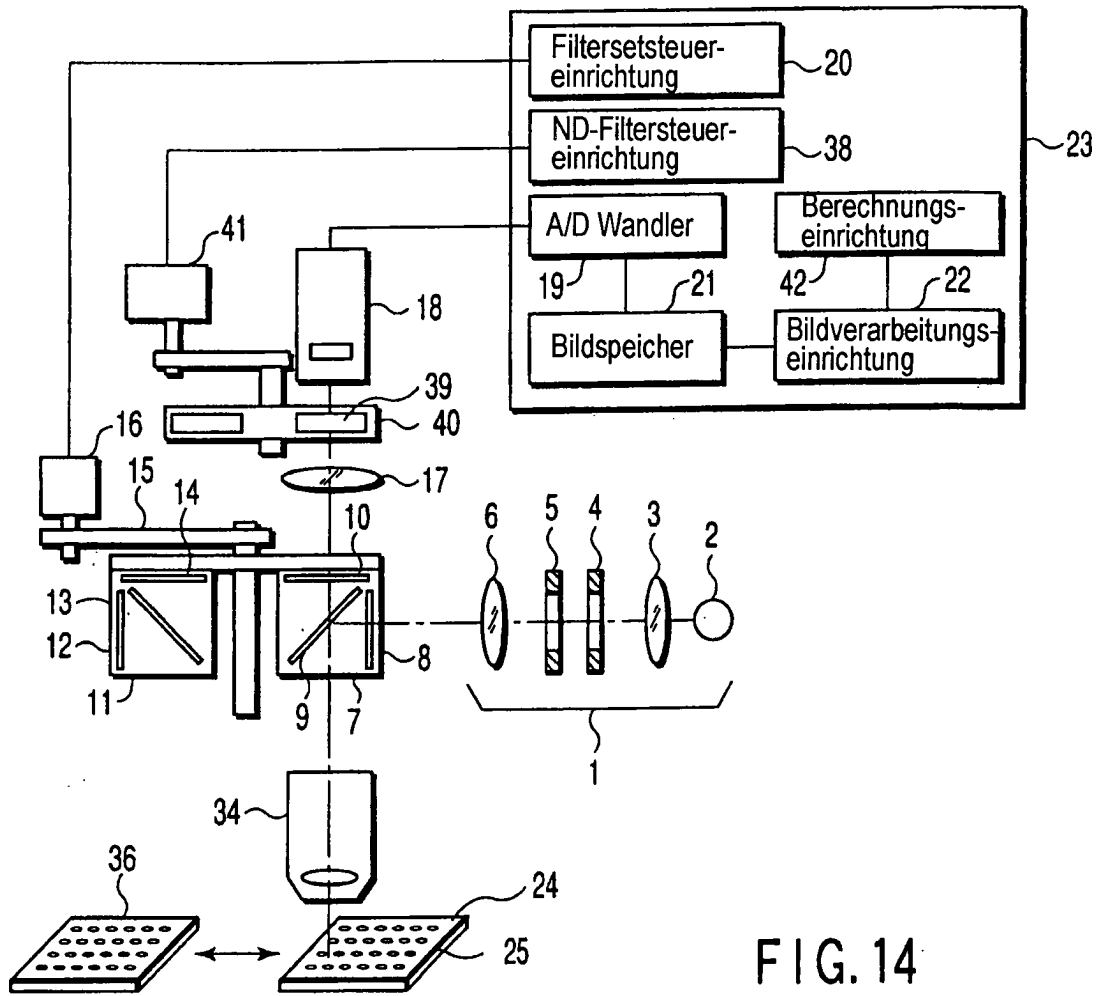


FIG. 13B



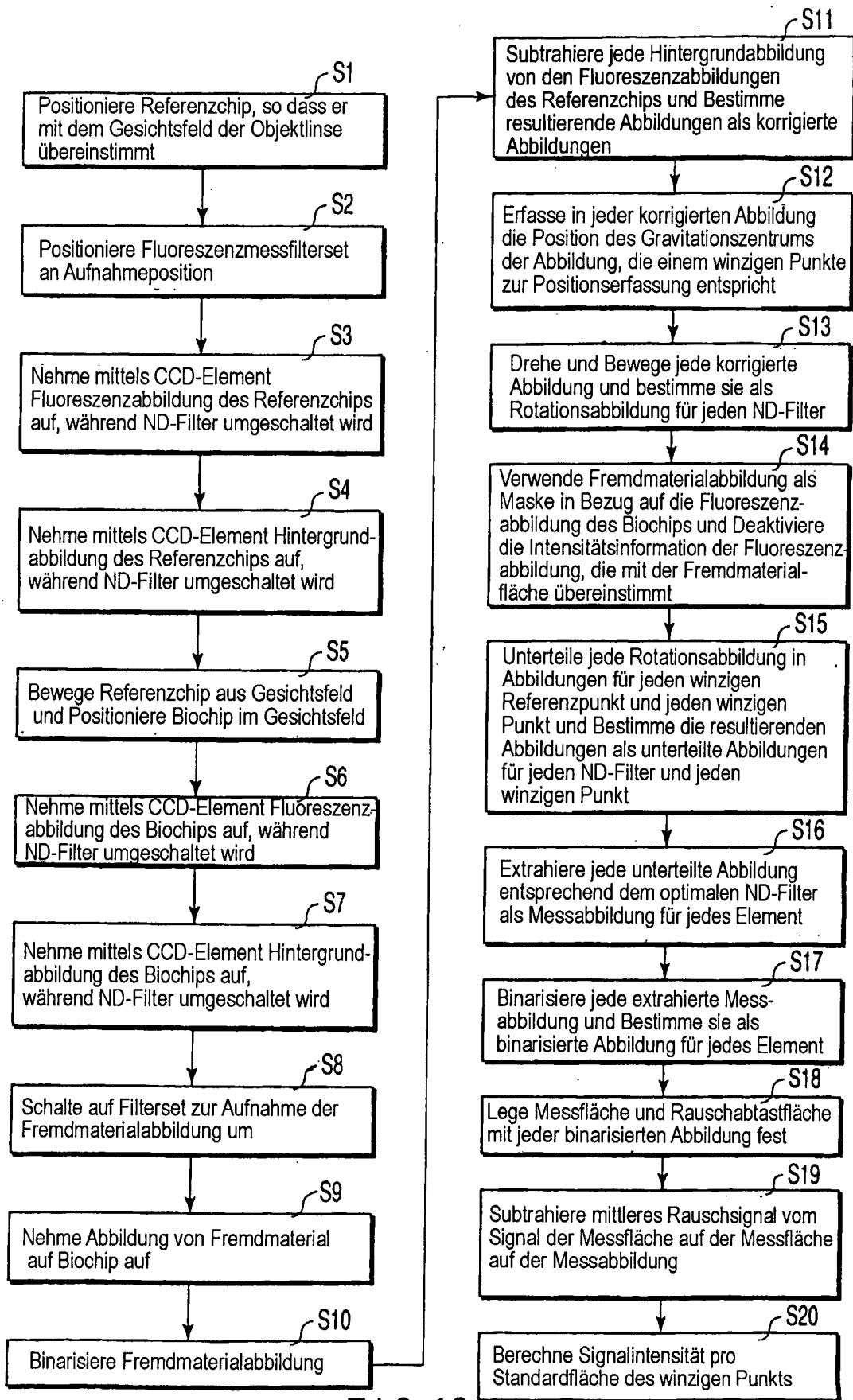


FIG. 16

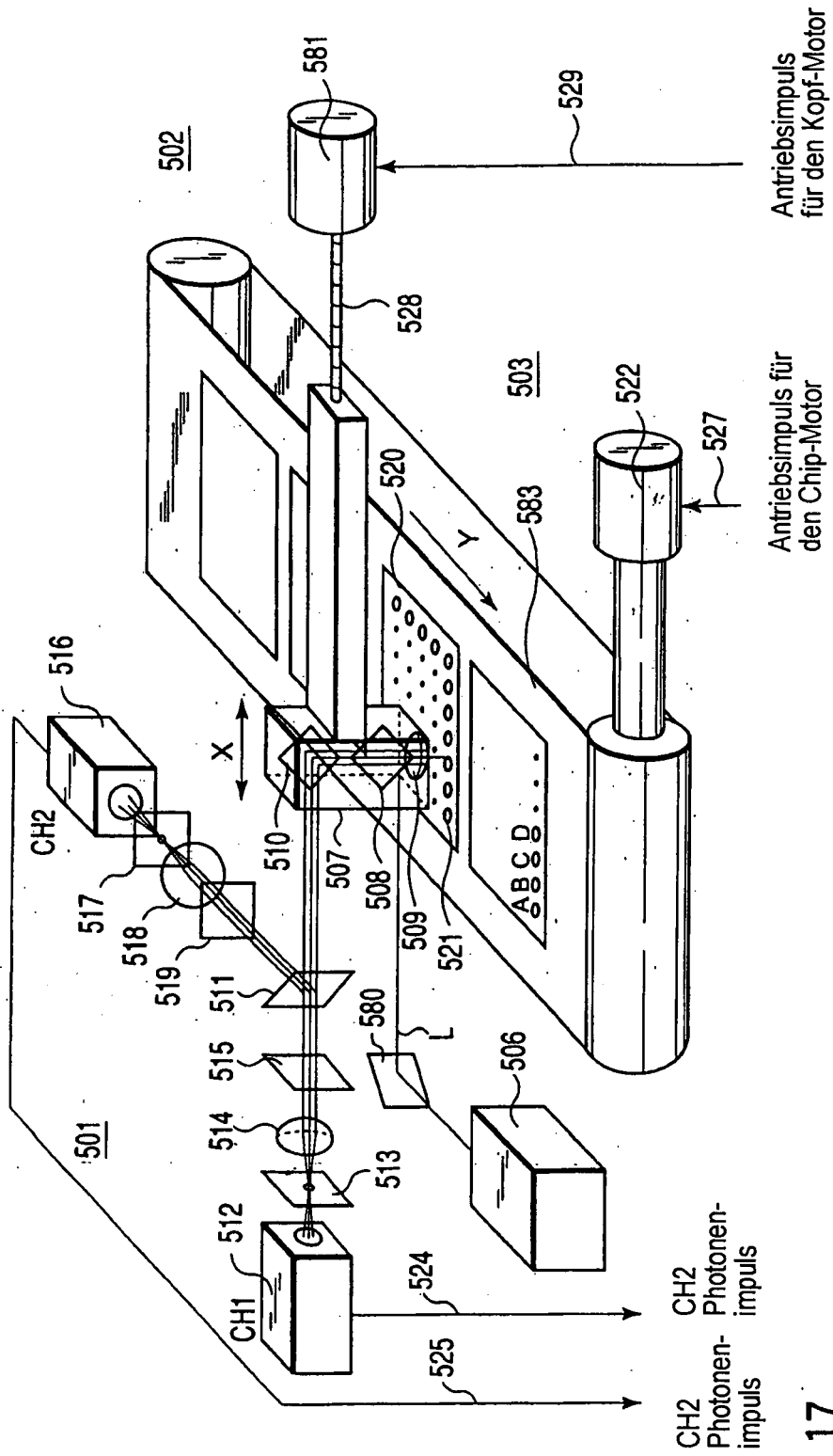


FIG. 17