(19)日本国特許庁(JP)　(12)特　許　公　報(B2)　(11)特許番号
特許第4106120号
(P4106120)
(45)発行日　平成20年6月25日(2008.6.25)　(24)登録日　平成20年4月4日(2008.4.4)

| (51)Int.Cl. | | F I | | |
|---|---|---|---|---|
| G01N 21/64 | (2006.01) | G01N 21/64 | | Z |
| G01N 33/50 | (2006.01) | G01N 33/50 | | P |
| G01N 33/68 | (2006.01) | G01N 33/68 | | |

請求項の数 13　(全 13 頁)

(21)出願番号　特願平10-7911
(22)出願日　平成10年1月19日(1998.1.19)
(65)公開番号　特開平10-311796
(43)公開日　平成10年11月24日(1998.11.24)
審査請求日　平成17年1月17日(2005.1.17)
(31)優先権主張番号　790-775
(32)優先日　平成9年1月30日(1997.1.30)
(33)優先権主張国　米国(US)

(73)特許権者　399117121
アジレント・テクノロジーズ・インク
ＡＧＩＬＥＮＴ　ＴＥＣＨＮＯＬＯＧＩＥＳ，　ＩＮＣ．
アメリカ合衆国カリフォルニア州サンタクララ　スティーブンス・クリーク・ブルーバード　５３０１
(74)代理人　100099623
弁理士　奥山　尚一
(74)代理人　100096769
弁理士　有原　幸一
(74)代理人　100107319
弁理士　松島　鉄男

最終頁に続く

(54)【発明の名称】化学配列走査装置

(57)【特許請求の範囲】
【請求項１】
一部蛍光物質を含んでいると思われる複数の配列の要素を有する配列における化学物質を分析するための装置において、
（ａ）線状に配置されている個々のピクセルの前記要素群に光線を照射するための光源と、
（ｂ）前記配列において少なくとも２つの、但し前記配列におけるピクセルの総数より少ない数のピクセルを含む一番目のピクセル群を前記光源により順次に照準し照射できるよう前記配列に対する前記光源の相対位置を調節し、かつ前記一番目のピクセル群とは異なる二番目のピクセル群を照射する前に前記の順次照射を一回以上繰り返すための制御手段であって、再照射が、前記ピクセルの蛍光物質において前記蛍光物質の準安定状態から実質的に回復した後に行われる、制御手段と、
（ｃ）照射の結果生ずる蛍光を検出する検出器とを具備したことを特徴とする化学配列走査装置。
【請求項２】
前記準安定状態が、三重項励起状態である請求項１に記載の装置。
【請求項３】
前記光源の少なくとも一部分が可動式であり、前記制御手段が前記光源の少なくとも一部分を移動してピクセル毎に前記光線の方向を定めて前記ピクセルを照射することを特徴とする請求項１に記載の化学配列走査装置。

【請求項４】

ライン状のピクセル群を順次照射できるよう前記光源を調節しかつ隣接ライン毎に一時に１つのラインを繰り返すために調節する前記制御手段において、別のラインが照射され終わった後はラインを照射しない請求項１に記載の化学配列走査装置。

【請求項５】

さらに、前記ピクセルの繰り返し照射中に前記検出器によってピクセルから検出される蛍光信号を加算する蛍光信号加算手段を具備する請求項１に記載の化学配列走査装置。

【請求項６】

フルオレセイン、ＴＥＸＡＳ ＲＥＤ、エチジウムブロミド、キレート化ランタニド、ローダミン、インドシアニン、カルボシアニン、オキサジン、有機金属、および金属原子のクラスター化合物から成る群から選択される蛍光物質において、前記光源が蛍光を生ずるのに適した光を放射する請求項１に記載の化学配列走査装置。

【請求項７】

一部蛍光物質を含んでいると思われる複数の配列要素を有する配列における化学物質を分析するための方法において、

（ａ）前記配列において少なくとも２つの、但し前記配列におけるピクセルの総数より少ない数のピクセルを含む前記配列要素の一番目のピクセル群を順次に照射し、前記ピクセルにおける照射から生ずる蛍光を検出し、

（ｂ）前記配列における前記一番目のピクセル群とは異なる二番目のピクセル群を照射する前に、前記一番目のピクセル群に対して一回以上照射を繰り返して検出する、化学配列走査方法であって、

再照射が、前記ピクセルの蛍光物質において前記蛍光物質の準安定状態から実質的に回復した後に行われる化学配列走査方法。

【請求項８】

前記準安定状態が、三重項励起状態である請求項７に記載の方法。

【請求項９】

さらに、ピクセルのラインにおいてピクセル毎に照射光線を移動させかつピクセルの別のラインへの移動の前に同一ラインの照射を少なくとも一回繰り返す請求項７に記載の化学配列走査方法。

【請求項１０】

前記一番目のピクセル群は一番目のラインにあるピクセル群であり、前記二番目のピクセル群は前記一番目のラインに隣接するラインにあるピクセル群であって、各ラインとも少なくとも１００を越すピクセルを有する請求項７に記載の化学配列走査方法。

【請求項１１】

さらに、別のラインを照射する前にラインにあるピクセル群を順次に照射しかつ繰り返し、別のラインがその後照射され終わったらラインを再照射せずに、一時に１つのラインを照射し、１つの隣接ラインから次々と全てのラインを照射するようにした請求項７に記載の化学配列走査方法。

【請求項１２】

さらに、ピクセルを再照射する前に$１０^{－５}$秒～$１０^{－１}$秒が経過するようにラインの相当数のピクセル群を照射する請求項７に記載の化学配列走査方法。

【請求項１３】

一部蛍光物質を含んでいると思われる複数の配列要素を有する配列における化学物質を、ピクセルのラインにおいて要素を走査することにより分析するための方法において、

（ａ）前記配列におけるピクセルのラインを順次にレーザ光線で照射し、前記ピクセルの照射によって生ずる蛍光を検出するステップにおいて、前記ピクセルのラインは少なくとも１００のかつ前記配列におけるピクセルの総数より少ない数のピクセルを有するステップと、

（ｂ）ピクセルを再照射する前に$１０^{－５}$秒～$１０^{－１}$秒が経過するように、ピクセルの二番目のラインのピクセル群を照射する前にピクセルの一番目のラインについて少なくと

も一回の照射検出を繰り返すステップと、
（ｃ）ピクセルの任意のラインの照射に続いて別のラインが照射され終わった後は、前記任意のラインを再照射せずに全ての前記配列要素を照射し終わるまで前記配列要素の全てについてステップ（ａ）とステップ（ｂ）とを実行するステップとを設けた化学配列走査方法。

【発明の詳細な説明】

【０００１】

【発明の属する技術分野】

本発明は、化学配列（chemical array）における化学物質の検出技術に係り、とりわけ、配列のピクセルの繰り返し走査による信号対雑音比（Ｓ／Ｎ比）の改良技術に関する。

【０００２】

【従来の技術】

近年、化学配列、とりわけ、生体分子配列が成功裏に作り出されている。例えば、Fodor氏等の「Light-directed, Spatially Addressable Parallel Chemical Synthesis」Science、２５１巻、７６７～７７３ページ（１９９１年）では、光指向性合成(light-directed synthesis)によって形成された高密度配列が開示されている。当該配列は抗体認識に用いられたものである。生体分子配列はまた、ポリヌクレオチド配列の分析用としてE.Southern氏のＰＣＴによるＷＯ８９／１０９７７によっても記述されている。前述の生体分子配列は、ＤＮＡとタンパク質の配列決定からＤＮＡのフィンガープリント法および病気の診断に至るまで、多くの用途に役立っている。

【０００３】

光学基板上にポリマー配列を合成するための１つの典型的アプローチは、上記Fodor氏等のＷＯ９１／０７０８７、ＷＯ９２／１０５８７、ＷＯ９２／１０５８８、および米国特許第５，１４３，８５４よって記述されている。前述の配列において、フォトリソグラフィ技術を用いて種々の受容体（レセプタ）を基板上に合成する。配列全面にわたって配位子（リガンド）を流す。そのリガンドを蛍光で標識付けするか、または追加の蛍光標識レセプタも配列全面にわたって流す。この結果は、リガンドとレセプタ（群）間で結合が既に生じているこれらのピクセル上に発蛍光団（fluorophores）が固定化されることになる。一般的には、化学配列を、発蛍光団を励起する放射光で照射する。明暗のピクセルのパターンを記録する。リガンドに関する情報は、この明暗パターンを表面結合レセプタの既知パターンと比較することによって得られる。

【０００４】

【発明が解決しようとする課題】

多くの用途において、例えば、ヒトのゲノムの分析では、しばしば多数の配列要素を走査することが必要となる。それ故、多数の要素を有する化学配列を短時間内で読取る機能が大いに望まれるのである。化学配列の要素群に高輝度をもった小スポットサイズの光線を当てるのにレーザが利用されている。よって、本発明は、配列の一組のピクセルから生ずる蛍光を検出し、別の組のピクセルへ移る前に照射を繰り返すことによって化学配列を分析するための改良技術を提供するものである。

【０００５】

【発明を解決するための手段】

本発明は、走査される、即ち、ピクセル群のライン毎に照射して蛍光のような、結果的に生ずる任意の光作用を検出することにより読取られる、化学配列の化学物質を分析するための技術を提供する。ピクセルのあるものは、蛍光物質を含有する標的化学物質を含んでいると思われる。本発明の装置は、光源、コントローラ、および検出器を含む。光源は、光線をピクセルに個別に照射するのに用いる。光源は、レーザのような光発生器と、スキャナのような光発生器からの光線の方向を決める機構とを包含していてもよい。コントローラは、光源が光線の方向を定めて配列にある一組のピクセルを順次に照射できるように、光源の相対位置をピクセルに対して制御するものである。第一組のピクセルとしてその組のピクセルに対して順次照射を一回以上繰り返し、その後、第一組のピクセルとは異な

ったピクセル群を含んでいる第二組のピクセルを照射する。第一組のピクセルは、少なくとも２つの、但し該配列におけるピクセルの全数より少ない数のピクセルを含む。検出器は、配列上への照射によって生ずる蛍光を検出するのに用いる。

【０００６】

本発明の技術は、数千もしくは数百万の小ピクセルを含む特に大きい化学配列を走査し、分析するのに有益に利用することができる。ピクセル中の染料分子が蛍光を発することができない準安定状態から回復できるだけの十分な時間の余裕を見込むことで、より多くの信号を得て、励起光線の輝度を高めなくてもＳ／Ｎ比を改善することが可能となる。しかし、ピクセルの照射を繰り返す前の時間と、再照射、即ち、繰り返し照射の間に光線が通過する距離とを縮めることにより、さらに正確な重ね合わせが達成され、より信頼性の高いデータとなる。

【０００７】

【発明の実施の形態】

本発明は、別の組のピクセルへ移る前に照射を繰り返し、この配列の一組のピクセルから生ずる蛍光を検出することによって化学配列を分析するための改良技術を提供するものである。ピクセルの各組では、全てのピクセルを繰り返しに先だって順次照射する。これにより、染料が再度照射される前にそれが準安定状態から回復できるだけの十分な時間の余裕を見込むことで、Ｓ／Ｎ比が改善される。

【０００８】

本明細書に用いられている「配列」は、各対象物が分離され、あらかじめ定められた位置を占めた空間における対象物の配置構成である。本発明の装置における配列の、光パルスによる走査時に多くのピクセルを含んでいるかも知れない対象物または配列要素の各々は、検体の種の各々の物理的位置を知るかまたは確認できるよう、特定の検体を結合する結合用化学物質（binder chemical）の一部または半分（moiety）の１つ以上の種を含む。「ピクセル」は、配列のスポット群であり、配列の分析時、スポットを照射して、スポットから生ずる光を別々の要素群として検出し、画像パターンを形成する。「検体」は、試料中においてその検出が望まれる分子であり、かつ分子プローブのような結合用化学物質の一部または半分に選択的かつ特異的に結合する分子である。検体は、それが結合する分子プローブと同一または異なった種類の分子でよい。

【０００９】

図１は、本発明による化学配列を分析するための装置の略式表示を示す。装置１００は、ある波長、および選択された蛍光物質において蛍光を起こさせるのに十分な輝度をもった光を放出する光源１０２、例えば、レーザを包含する。しばしば、励起光線の輝度は、化学配列１０４に用いられた染料が準安定状態の飽和に近づく、即ち、染料分子のあるものが準安定状態に交差するよう十分に高い。コントローラ１０８は、配列の要素群の上で一時に１つのピクセルに当たるように光源１０２からの光の方向を定める。例えばこれは、コントローラを用いて、光源にある光発生器（例えば、レーザ）を動かすか、化学配列を動かすかして化学配列１０４に対する光源１０２の相対位置を変えることによって、またはスキャナを用い、光線をある方向に向けることによって達成することができる。その結果、異なった時間に異なったピクセル群を照射することができる。典型的には、光線の照準は、対象物のテーブル（図１には非表示）上で配列を移動させるか、またはビームスキャナを用いて光線を走査させることによって実行する。染料は、光源１０２からの励起光線で励起されると、蛍光を発し、これが検出器１１０で検出されるのである。蛍光の輝度も測定することができる。

【００１０】

図２は、図１の装置の実施例をさらに詳細に示すものである。装置２００は、レーザ光線を放射するレーザ２０４を包含している。スキャナ２０８は、光学系２１２を通してレーザ光線を化学配列２１６に向けて蛍光を発生させる。光学系２１２は、化学配列のピクセル群の上にレーザ光線の焦点を合わすできるよう、例えば、レンズおよびプリズムのような光線を平行にする光学部品を包含している。

【００１１】
レーザ光線によって照射されている配列から生ずる蛍光光線は、この蛍光光線を検出器２２４の方へ向けるべく、例えば、レンズとプリズムを包含する光学系２２０によって集められる。光学系２２０は、励起光線のような不必要な光をフィルタで排除できるようフィルタ類と絞り類を包含してもよい。コントローラ２２８は、蛍光光線が検出器に衝突することで検出器にて生成される電気信号を捕集する検出器２２４と電気接続されている。コントローラ２２８をスキャナ２０８に接続して、検出器２２４で受信される各蛍光光線の信号が、この蛍光光線の信号を発生するピクセルまで追跡できるようにしてもよい。コントローラ２２８は、さらにレーザ２０４に接続され、特定の存続時間を有する光パルスを放射できるようレーザを制御するのに用いてもよい。スキャナ２０８は、光パルス間で１つのピクセルから他のピクセルへレーザ光線を移動させるのに用いられる。しかし好適には、レーザは、スキャナがレーザ光線をピクセル毎に照準する時に連続光線を放射する。あるいは、励起光線を走査、即ち、動かす代わりに、化学配列２１６を制御して、異なったピクセルが異なった時間に励起光線の焦点に入るように移動させる。別の代替法は、レーザ光線を異なったピクセルに向けられるよう、レーザを物理的に移動させて制御するものである。

【００１２】
コントローラ２２８によって受信される信号のデータを処理して、ピクセルにおける検体の存在または量を定めることができる。これを行うために、コントローラ２２８は、ピクセル位置と蛍光に関する情報を処理するマイクロプロセッサまたはコンピュータを包含することができる。検出器２２４からの信号またはコントローラ２２８からの情報は、さらに詳しくデータ処理ができるよう別のプロセッサ２３２へ伝送してよい。また、ディスク、テープ、コンパクトディスク、またはそれに類した記憶装置へさらに伝送してよい。コントローラ２２８またはプロセッサ２３２からの情報は、陰極線管、作図装置（プロッタ）、またはプリンタ等の表示装置２４０に表示してもよい。好適には、別のコンピュータとマイクロプロセッサを用いて、光線およびピクセルの相対位置を制御し、ピクセル位置と蛍光パターンについてのデータをリンクできるようにしてもよい。

【００１３】
（配列の読取り方法）
図３は、本発明による化学配列におけるピクセルの分析、即ち、読取りまたは走査のための方法を示す。典型的には、該化学配列は照射および蛍光の検出によって読取る時、それぞれが線と考えてよい行と列に配置されるピクセルに帰着する配列要素群を含む。本明細書では、行を線と呼ぶ。一組のピクセルを配列から選択する（ステップ３０４）。その組の一番目のピクセルをレーザ光線を用いて特定の存続時間、例えば数マイクロ秒間照射し、生ずる蛍光を検出または測定する（ステップ３０６）。その組の他のピクセルも同様に処理、即ち照射し、照射して生ずる蛍光を一時に順次１ピクセルを検出する（ステップ３１０）。その組の最後のピクセルが照射と検出によって一回読取られた後、ピクセル群を、再度、最初の読取りと同様の方法で、一回以上読取る（ステップ３１４およびステップ３１８）。その配列のピクセルの他の組を選択して最初の組に対して行ったように読取りを続け、全てのピクセルの読取り完了させる（ステップ３２２）。一般的には、これで全ての配列要素が読取り終わったことになる。

【００１４】
好ましくは、各組は、照射と再照射でピクセルからピクセルへの移動時に、光線の相対位置を動かすための作動機構、例えば、スキャナの移動が広範囲にならないよう物理的に互いに密接しているピクセルを含む。例えば、その組は、一線にある多数のピクセル、例えば、ピクセルのサブセットであってよい。より好ましくは、その組は組のピクセルを順次に走査できるよう走査機構の平滑な移動を助長する線（例えば、行または列）である。そして、その組は１つの線または少なくとも２つの線の一部分を含むことができる。上述のように、組におけるピクセルの数は、準安定状態からのピクセルの回復に十分な時間を見込めるように選択する。

【００１５】
（ピクセル照射を繰り返す前の時間選択）
例えば、約３μｍのＦＷＨＭガウスビームのような小スポットサイズを有するレーザ誘起蛍光スキャナでは、レーザ光線は、発蛍光団、即ち、染料の分子を励起して蛍光を生じさせる。この蛍光を検出して、発蛍光団分子の存在、従って、発蛍光団分に付着されている検体の存在を表示する。図４は、染料が励起される時のエネルギー準位の遷移を示す略図である。染料分子がレーザ光線を吸収すると（矢印Ｅ）、基底状態のエネルギー準位Ｇからエネルギー準位Ｈまで励起される。エネルギー準位Ｈから染料分子は基底状態までまた落ちて（矢印Ｆ）、蛍光のような光を放出する。
【００１６】
より十分な信号を生成するには、ある程度高い輝度の励起光、即ち、レーザからの光からより多くの蛍光光子が作られるので、相当高輝度のレーザを用いる。染料に衝突するレーザ光線が強いため、染料分子は、特定染料の性質により三重項状態のような準安定状態（群）（または長寿命準安定状態（群））に交差する。ここに用いられているように、染料分子の「準安定状態」または「長寿命準安定状態」は、染料分子が基底状態より高いエネルギー準位をもっているが、そのエネルギを失って、一重項状態の蛍光の大きさまたは一重項状態の蛍光の大きさよりもさらに小さい染料の基底状態に転換するところのエネルギ状態を指す。特定の染料によっては、多くの異なった準安定状態が可能である。準安定状態の１つの重要な例は、三重項状態である。その他の準安定状態には、ビラジカル状態とイオン対状態とがある。多くの準安定状態が可能であるかも知れないが、分かり易くするため図４では準安定状態をＭとして示し、そこへのエネルギー準位Ｈからの遷移を矢印Ｌで表す。これらの準安定状態では、染料分子は一重項状態の蛍光におけるよりはるかにゆっくりと元の基底状態に転換する。これを矢印Ｎで示す。準安定状態からは、蛍光物質、即ち、染料分子は矢印Ｆの蛍光のそれと同じ波長の光を放出しない。よって、準安定状態に交差する染料分子はどれも蛍光に影響しない。準安定状態にある染料分子は蛍光を発することができないので、この現象は蛍光信号の飽和に見える。この情況では、レーザの力、即ち、配列要素への照射強度を高めても、検出される蛍光光子の数が比例して増加しないであろう。
【００１７】
それらの性能が光子散弾雑音（photon shot noise）によって制限されるシステムに関して、飽和が生じた時には、比較的ゆっくりと走査するか、またより高い照射力を用いることで、もしできるとしてもまれであるがＳ／Ｎ比を限界に近く大きくすることだけは可能である。本発明では、化学配列にある多くのピクセルを含んだ一組のピクセルを二回以上走査してＳ／Ｎ比を上げている。さらに、ピクセルの染料分子が準安定状態から十分に、好ましくは実質的に、回復できる時間を待った後、ピクセルの再照射を行う。このために一組の、即ち、多くのピクセルをそれぞれ短い持続時間の間、順次に照射して、その組の最後のピクセルが照射されるまでには最初のピクセルが準安定状態から回復し終わっているようにする。
【００１８】
ピクセルの染料が、再照射に先立って準安定状態から回復できるように選択される時間周期（本明細書では「静止周期」と呼ぶ）は、染料の性質によって左右される。通常用いられる多くの染料は、約$10^{-5}$秒～$10^{-1}$秒の範囲の準安定状態の回復時間定数をもっている。よって、約$10^{-5}$秒～$10^{-1}$秒という静止周期は、ピクセル中の染料がその準安定状態から実質的に回復するのに十分であろう。対照的に、蛍光時間定数は、ナノ秒の範囲にある。一般に、通常使われる染料の中の幾つかの静止周期は、当分野で周知である。一組に含まれるべきピクセル数は、ピクセルに対する照射時間とその染料の回復時間、即ち、静止周期に依存する。一般に、１００以上のピクセル、好ましくは、約１０００を越えるピクセルが、再照射に先立って順次読取られる一組のピクセル群に含まれる。
【００１９】
染料の静止周期を決めるために、次の技術を用いることができる。対象となる染料は、蛍

光輝度の一時的放散（即ち、蛍光輝度の時間依存性）を監視している間に、染料の静止周期に比例して急速にターンオンされる照射源からの光に露呈させる。蛍光の輝度は最初は最高だが、時間が経つにつれより低いレベルまで低下する。より低い輝度レベルに到達する時間は、染料の静止周期と密接に関連している。蛍光輝度の減少は、飽和レベルを反映する。得られたデータを数学的モデルに適合させて輝度変化の時定数を得ることができる。時定数を得るためのモデル化の方法は、当分野で周知である。一般に、染料は約１の時定数の後、準安定状態から十分回復されると考えられる。約２の時定数の後は、準安定状態から実質的に回復されると考えられる。

【００２０】

本発明で使用可能な適当な染料（蛍光物質）の例には、フルオレセイン、ＴＥＸＡＳ　ＲＥＤ、エチジウムブロミド、キレート化ランタニド、ローダミン、インドシアニン、カルボシアニン、オキサジン、有機金属、および金属原子のクラスター化合物が含まれる。静止周期、即ち、これらの染料の準安定状態からの回復に要する時間は上述の技術を用いて決定することができる。

【００２１】

各種の適当な発光デバイスを光源の光発生器として用いることができる。上述の発光デバイスは、当分野で周知である。例えば、発光ダイオード（ＬＥＤ）やレーザがあり、レーザでは、例えば、ダイオードレーザやガスレーザ、例えば、ＨＥ－ＮＥレーザ、アルゴンイオンレーザ、周波数二倍ネオジミウムガラスレーザ、ネジウム（nedium）ＹＡＧレーザ、ファイバレーザ、またはその他の固体レーザがある。配列中のピクセルを平坦なパターンに配置することができる。代替に、ピクセルを円筒表面上のような円形パターンに配置する方法がある。一般に、ピクセルは、行と列から成るパターンに保持される。各ピクセルの起源が分かるので、そのピクセルにおける結合体（binder）の化学物質の一部または半分も分かる。そのピクセルについて蛍光が検出される場合、ピクセルに結合した検体の本質（正体）が分かる。

【００２２】

（配列の光検出）

検出器は、配列の蛍光によって生ずる光を検出するために用いられる。例えば、単一要素の光学検出器、例えば、ＰＮＴ光電子増倍管を用いてよい。任意の特定ピクセルで検出される光線の時間は既知であり、かつ異なったピクセルの照射は一時的に間隔がとられているので、対応する検出される蛍光はそのピクセルにおける蛍光物質の存在を表すことになる。代替の検出器は、１つ以上の検出器要素を用いて標的の化学物質を過剰に試料採取して、不均一性に対する弁別を可能にするアレイ検出器である。アレイ検出器の一例としては、電荷結合デバイス（ＣＣＤ）アレイのような固体半導体デバイスがある。

【００２３】

光源からの励起光は、配列の検体に結合された蛍光物質に当たり、蛍光光線のような光を放出させる。蛍光物質を有するピクセルだけが蛍光の信号を放出する。検出された蛍光信号は、光源に対する電子励起によって識別され、そして好ましくはマイクロプロセッサまたはコンピュータのような電子式処理装置によって処理される。

【００２４】

上述のように、配列における蛍光光線のパターンを解析することにより、試料中の検体の正体を決定することができる。適当な検出器を用いて蛍光を検出することにより、パターンのある位置では蛍光を示し、またある位置ではそうでない形態の蛍光のパターンが得られる。配列における特定のピクセル上の検体の本質は、パターンにおける蛍光の位置を検出し、この位置を結合用化学物質の一部または半分の同定と、配列のピクセル位置に関するデータとをリンクすることによって決定することができる。前述のデータを化学配列とリンクする方法は種々ある。例えば、配列のハウジング上にデータを物理的に符号化するか、またはコンピュータに別々に記憶することができる。

【００２５】

この照射検出技術は、各ピクセルを読取り後に再照射する、または全配列を読取った後に

だけ再照射する必要のある諸技術よりはるかに有益性がある。ピクセルの再照射を、ピクセル照射の直後に行う場合、ピクセルの染料分子は、準安定状態から十分に回復するだけの十分な時間をとれないことがあり、かつ蛍光は蛍光を発しない準安定状態によって最適とはならない。しかしながら、全配列または配列の半分程の大きい区画が照射された後にだけ再照射を行う場合、作動機構またはビームステアリング機構は相当な距離を動かなければならず、かつ最初の配列に戻るまでに長い時間待たなければならない。これは、今日の小さくかつ密に隣接したピクセルのディメンションを有する大きい配列（例えば、行または列に１０００個を越えるピクセル、または数千個のピクセルすら有するもの）に関しては特に当てはまることである。例えば、ピクセルのディメンションは、差渡し３μｍ程の大きさであってよい。相当の距離を移動し、かつ長い時間待つ際に、元のピクセル位置は容易に再設定、即ち、重ね合わせされないことがある。例えば、温度が変わることがあり、それによって配列が寸法の変化を生ずる。例えば、配列が、室温での読取りの前は、低い室温の所に保管されている場合に、熱膨張が起こり得る。本発明においては、ピクセルの染料が準安定状態から回復するだけの十分な時間をとるが、それ程長い時間ではないため、レーザ光線を元の位置に重ね合わす際に、実質的に困難さが増す。再走査、即ち、再読取りの結果をオンラインで付加するか、または平均して記憶すべきデータ量を減らすことができる。

【００２６】

上述のように、作動機構またはビームステアリング機構、例えば、レーザ光線を動かすスキャナ、配列を動かす作動システム、またはレーザを動かすアクチュエータの制御をコンピュータで実行してもよい。一般に、コンピュータプログラムまたはソフトウェアは、蛍光の検出と測定、並びに前述の制御を実行するために必要な手段を与え得るものである。アクチュエータやスキャナ等の制御は、当分野で周知である。

【００２７】

データ解析においては、それぞれのピクセルの読みの蛍光輝度をコンピュータ（マイクロプロセッサであってもよい）のメモリに記憶する。各々の再照射および再検出後、各ピクセルについて蛍光の新旧データを加算することにより記憶を更新する。染料が漂白されていない時は、信号は相応じて繰り返し読まれた数ｎまで増え、Ｓ／Ｎ比はｎの平方根として換算される。

【００２８】

説明の目的で、次の例を示す。しかし、熟練した当業者は、開示した例を他の用途に応用することができよう。出力電力が１０ｍＷ、波長が４８８ｎｍ、そして３μｍの半値全幅（ＦＷＨＭ）の焦点スポットで動作するＵＮＩＰＨＡＳＥ（San Jose, California）、モデル２２１１－２０ＳＬＥレーザを、５０００ピクセルを有する化学配列を走査するのに用いた。照射時間は、各ピクセルにつき少なくとも５μ秒、例えば、６μ秒であった。ナノ秒のオーダの蛍光寿命をもつフルオレセインが、検体を標識付けするための染料であった。フルオレセインの準安定状態からの回復に要する時間は、ミリ秒のオーダであった。再照射に先立ち１つのライン、即ち５０００ピクセルを走査することにより、ライン時間、即ち、繰り返しの前に１つのラインを終了するのに要する時間は少なくとも約３０ｍ秒であり、これはフルオレセインが準安定状態から回復するのには余るほど十分である。

【００２９】

本発明の装置と該装置の製作および使用法について例証となる実施例を詳細に説明したが、上述の実施例は、特に寸法と形状および上述の種々の特徴要素の組合せに関して、熟練した当業者によって発明の範囲から逸脱することなく変更し得るものと理解すべきである。本開示において概説した理論は正確であると思えるが、本発明の用途は、ここに説明した如何なる理論にも依存しないものである。

【００３０】

以下に本発明の実施の形態を要約する。

１．一部蛍光物質を含んでいると思われる複数の配列の要素を有する配列における化学物質を分析するための装置において、

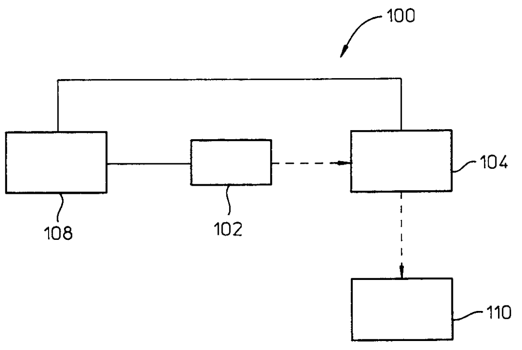
（ａ）線状に配置されている個々のピクセルの前記要素群に光線を照射するための光源と、
（ｂ）前記配列において少なくとも２つの、但し前記配列におけるピクセルの総数より少ない数のピクセルを含む一番目のピクセル群を前記光源により順次に照準し照射できるよう前記配列に対する前記光源の相対位置を調節し、かつ前記一番目のピクセル群とは異なる二番目のピクセル群を照射する前に前記の順次照射を一回以上繰り返すための制御手段と、
（ｃ）照射の結果生ずる蛍光を検出する検出器とを具備したことを特徴とする化学配列走査装置。
【００３１】
２．繰り返しに先立ち前記一番目のピクセル群を照射できるように前記光線の方向を定めるために調節する前記制御手段がピクセルを再度照射する前に、前記ピクセルの蛍光物質において前記蛍光物質の準安定状態から実質的に回復できるだけの十分な時間が経過するようにした上記１記載の化学配列走査装置。
【００３２】
３．繰り返しに先立ち照射されている前記一番目のピクセル群に前記光線の方向を定めるため調節する前記制御手段がピクセルを再度照射する前に、前記ピクセルの前記蛍光物質において前記蛍光物質の三重項励起状態から実質的に回復できるだけの十分な時間が経過するようにした上記２記載の化学配列走査装置。
【００３３】
４．前記光源の少なくとも一部分が可動式であり、前記制御手段が前記光源の少なくとも一部分を移動してピクセル毎に前記光線の方向を定めて前記ピクセルを照射することを特徴とする上記２記載の化学配列走査装置。
【００３４】
５．ライン状のピクセル群を順次照射できるよう前記光源を調節しかつ隣接ライン毎に一時に１つのラインを繰り返すために調節する前記制御手段において、別のラインが照射され終わった後はラインを照射しない上記２記載の化学配列走査装置。
【００３５】
６．さらに、前記ピクセルの繰り返し照射中に前記検出器によってピクセルから検出される蛍光信号を加算する蛍光信号加算手段を具備する上記２記載の化学配列走査装置。
【００３６】
７．フルオレセイン、ＴＥＸＡＳ　ＲＥＤ、エチジウムブロミド、キレート化ランタニド、ローダミン、インドシアニン、カルボシアニン、オキサジン、有機金属、および金属原子のクラスター化合物から成る群から選択される蛍光物質において、前記光源が蛍光を生ずるのに適した光を放射する上記２記載の化学配列走査装置。
【００３７】
８．一部蛍光物質を含んでいると思われる複数の配列要素を有する配列における化学物質を分析するための方法において、
（ａ）前記配列において少なくとも２つの、但し前記配列におけるピクセルの総数より少ない数のピクセルを含む前記配列要素の一番目のピクセル群を順次に照射し、前記ピクセルにおける照射から生ずる蛍光を検出し、
（ｂ）前記配列における前記一番目のピクセル群とは異なる二番目のピクセル群を照射する前に、前記一番目のピクセル群に対して一回以上照射を繰り返して検出する化学配列走査方法。
【００３８】
９．さらに、繰り返しに先立ち照射される前記一番目のピクセル群を選択して、ピクセルを再度照射する前に前記ピクセルにおける前記蛍光物質において、準安定状態から回復できるだけの十分な時間が経過するようにした上記８記載の化学配列走査方法。
【００３９】
１０．さらに、前記蛍光物質が準安定状態から回復するのに要する時間を定める上記８記

載の化学配列走査方法。
【００４０】
１１．さらに、繰り返しに先立ち照射される前記一番目のピクセル群を選択して、ピクセルを再度照射する前に、前記ピクセルの蛍光物質において三重項励起状態から回復できるだけの十分な時間が経過する上記８記載の化学配列走査方法。
【００４１】
１２．さらに、ピクセルのラインにおいてピクセル毎に照射光線を移動させかつピクセルの別のラインへの移動の前に同一ラインの照射を少なくとも一回繰り返す上記８記載の化学配列走査方法。
【００４２】
１３．前記一番目のピクセル群は一番目のラインにあるピクセル群であり、前記二番目のピクセル群は前記一番目のラインに隣接するラインにあるピクセル群であって、各ラインとも少なくとも１００を越すピクセルを有する上記８記載の化学配列走査方法。
【００４３】
１４．さらに、別のラインを照射する前にラインにあるピクセル群を順次に照射しかつ繰り返し、別のラインがその後照射され終わったらラインを再照射せずに、一時に１つのラインを照射し、１つの隣接ラインから次々と全てのラインを照射するようにした上記８記載の化学配列走査方法。
【００４４】
１５．さらに、ピクセルを再照射する前に$１０^{-5}$秒～$１０^{-1}$秒が経過するようにラインの相当数のピクセル群を照射する上記８記載の化学配列走査方法。
【００４５】
１６．一部蛍光物質を含んでいると思われる複数の配列要素を有する配列における化学物質を分析するための方法において、
（ａ）前記配列におけるピクセルのラインを順次にレーザ光線で照射し、前記ピクセルの照射によって生ずる蛍光を検出するステップにおいて、前記ピクセルのラインは少なくとも１００のかつ前記配列におけるピクセルの総数より少ない数のピクセルを有し、ラインのピクセル群は最初に照射されたピクセルにおける蛍光物質が全ラインの照射の終わる前に準安定状態から回復するだけの十分な時間が経過する程十分大きいステップと、
（ｂ）ピクセルを再照射する前に$１０^{-5}$秒～$１０^{-1}$秒が経過するように、ピクセルの二番目のラインのピクセル群を照射する前にピクセルの一番目のラインについて少なくとも一回の照射検出を繰り返すステップと、
（ｃ）ピクセルの任意のラインの照射に続いて別のラインが照射され終わった後は、前記任意のラインを再照射せずに全ての前記配列要素を照射し終わるまで前記配列要素の全てについてステップ（ａ）とステップ（ｂ）とを実行するステップとを設けた化学配列走査方法。
【００４６】
【発明の効果】
上述のように、配列における蛍光光線のパターンを解析することにより、試料中の検体の正体を決定することができる。これは、適当な検出器を用いて蛍光を検出することにより、パターンのある位置では蛍光を示し、またある位置ではそうでない形態の蛍光のパターンが得られことから実現可能となる。また、配列における特定のピクセル上の検体の本質は、パターンにおける蛍光の位置を検出し、この位置を結合用化学物質の一部または半分の同定と、配列のピクセル位置に関するデータとをリンクすることによって決定することができる。
【図面の簡単な説明】
【図１】本発明による装置を示すブロック図である。
【図２】本発明による装置を示すさらに詳細なブロック図である。
【図３】本発明による化学配列の読取りプロセスを示すフローチャートである。
【図４】染料のエネルギー準位の幾つかを図解するための略図である。

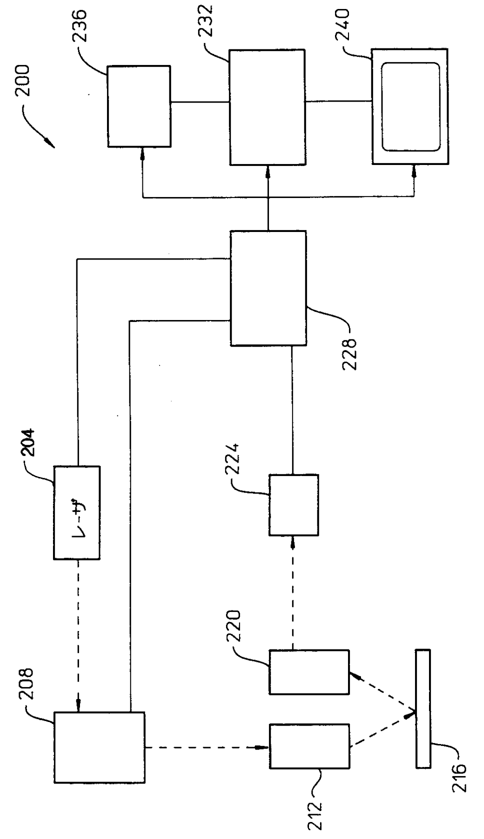
【符号の説明】

１００　装置
１０２　光源
１０４　化学配列
１０８　コントローラ
１１０　検出器
２００　装置
２０４　レーザ
２０８　スキャナ
２１２　光学系
２１６　化学配列
２２０　光学系
２２４　検出器
２２８　コントローラ
２３２　プロセッサ
２４０　表示装置

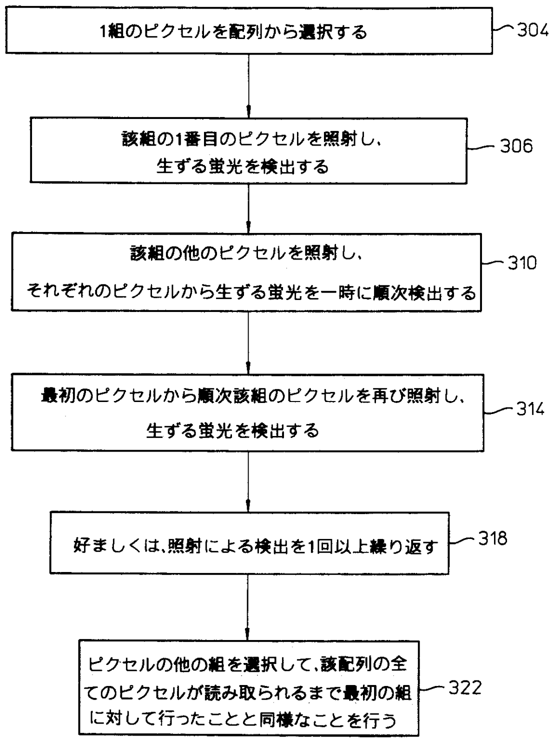
【図１】



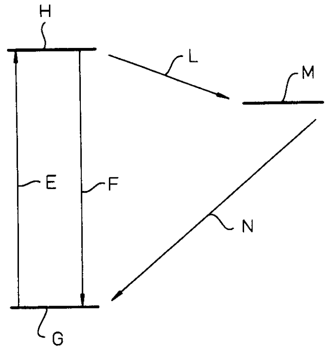

【図２】



【図３】


1組のピクセルを配列から選択する
304
該組の1番目のピクセルを照射し、
生ずる蛍光を検出する
306
該組の他のピクセルを照射し、
それぞれのピクセルから生ずる蛍光を一時に順次検出する
310
最初のピクセルから順次該組のピクセルを再び照射し、
生ずる蛍光を検出する
314
好ましくは、照射による検出を1回以上繰り返す
318
ピクセルの他の組を選択して、該配列の全
てのピクセルが読み取られるまで最初の組
に対して行ったことと同様なことを行う
322

【図４】


H
L
M
E
F
N
G

フロントページの続き

(72)発明者　アンドレアス・ドロセル
アメリカ合衆国　カリフォルニア，メンロ・パーク，サンタ・マルガリータ・アヴェニュー　１４０
(72)発明者　スティーヴン・エム・レルコヴィッツ
アメリカ合衆国　カリフォルニア，ミルブラエ，ヴィスタ・グランデ　１３０８
(72)発明者　ジョン・ダヴリュー・サドラー
アメリカ合衆国　カリフォルニア，デルモント，ホールマーク　２８０８

審査官　横尾　雅一

(56)参考文献　特開平０４－２９４２５７（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－２０１９９９（ＪＰ，Ａ）
特開昭６３－２２９３６５（ＪＰ，Ａ）
特開平０６－３４１９５５（ＪＰ，Ａ）
特表平１０－５１３５５３（ＪＰ，Ａ）

(58)調査した分野(Int.Cl.，ＤＢ名)
G01N21/00-21/83
G01N33/48-33/98