

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 特 許 公 報 (B2)

(11) 特許番号

特許第6812341号

(P6812341)

(45) 発行日 令和3年1月13日 (2021.1.13)

(24) 登録日 令和2年12月18日 (2020.12.18)

(51) Int. Cl.

F I

G O 1 N 21/64 (2006.01)

G O 1 N 21/64 B

C 1 2 M 1/00 (2006.01)

C 1 2 M 1/00 A

C 1 2 Q 1/6874 (2018.01)

C 1 2 Q 1/6874

G O 1 N 21/03 (2006.01)

G O 1 N 21/64 F

B 8 2 Y 20/00 (2011.01)

G O 1 N 21/03 Z

請求項の数 25 (全 152 頁) 最終頁に続く

(21) 出願番号 特願2017-506982 (P2017-506982)
 (86) (22) 出願日 平成27年8月7日 (2015.8.7)
 (65) 公表番号 特表2017-531168 (P2017-531168A)
 (43) 公表日 平成29年10月19日 (2017.10.19)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2015/044378
 (87) 国際公開番号 W02016/023010
 (87) 国際公開日 平成28年2月11日 (2016.2.11)
 審査請求日 平成30年8月7日 (2018.8.7)
 (31) 優先権主張番号 62/035,242
 (32) 優先日 平成26年8月8日 (2014.8.8)
 (33) 優先権主張国・地域又は機関
 米国 (US)

(73) 特許権者 516144164
 クアンタム・エスアイ インコーポレイテッド
 QUANTUM-S I INCORPORATED
 アメリカ合衆国 06437 コネチカット州
 ギルフォード オールド ウィットフィールド
 ストリート 530
 (74) 代理人 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 (74) 代理人 100142907
 弁理士 本田 淳

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 分子の探索、検出及び解析のための光学システム及びアッセイチップ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

複数の検体ウェルの各検体ウェルは、前記複数の検体ウェルを備えたアッセイチップであって検体を受けるためのアッセイチップとインタフェースするように形成されている、機器において、

前記検体を励起させる励起エネルギーの複数のパルスを放出するための少なくとも1つのパルス式励起光源と、

複数のセンサであって、前記複数のセンサの各センサが前記複数の検体ウェルのうちの検体ウェルに対応するとともに、それぞれの検体ウェル内の前記検体からの放出エネルギーを受け取り、前記検体を励起エネルギーの複数のパルスで照明することに応じて前記検体から放出される発光の光子を前記複数のセンサの各センサが受け取ることによって生じた電荷キャリアを少なくとも2つのビンに集積することによって少なくとも1つの信号を生成する、センサであって、前記少なくとも2つのビンは前記励起エネルギーの複数のパルスのそれぞれに続く少なくとも第1の時間間隔と第2の時間間隔との間に生成される電荷キャリアを格納し、前記少なくとも1つの信号には前記第1の時間間隔の間に生成された電荷キャリアに対応する第1の信号と、前記第2の時間間隔の間に生成された電荷キャリアに対応する第2の信号とが含まれ、前記第1及び第2の信号は前記検体によって放出される発光の発光寿命を示すものである、センサと、

前記複数の検体ウェルの各検体ウェルからの前記放出エネルギーを前記複数のセンサのそれぞれのセンサに向かって誘導するための少なくとも1つの光学要素と

10

20

を含んでなる、機器。

【請求項 2】

開口部を有した光学筐体と、

前記アッセイチップを前記光学筐体の外面に機械的に位置決めし、及び前記アッセイチップが前記機器とインタフェースする時には前記開口部と重なるように形成されている少なくとも 1 つの部品とをさらに備える、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 3】

前記少なくとも 1 つのパルス式励起光源は前記光学筐体の前記開口部を通して励起エネルギーを放出するように形成されている、請求項 2 に記載の機器。

【請求項 4】

前記少なくとも 1 つの部品は前記光学筐体の外面に配備される、請求項 2 に記載の機器。

【請求項 5】

前記少なくとも 1 つの部品は、前記開口部の周囲に設置された複数の要素を有する、請求項 2 に記載の機器。

【請求項 6】

前記少なくとも 1 つの部品は、少なくとも 1 つの磁気要素、少なくとも 1 つのばね式要素、及び少なくとも 1 つの空気圧式要素のうちの少なくとも 1 つを有する、請求項 2 に記載の機器。

【請求項 7】

前記少なくとも 1 つのパルス励起光源からの励起光を前記アッセイチップに向かって反射し、かつ前記複数の検体ウェルからの前記放出エネルギーを前記複数のセンサに向かって透過させるためのポリクロイックミラーをさらに含んでなる、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 8】

前記少なくとも 1 つの光学要素がリレーレンズを含んでなる、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 9】

前記少なくとも 1 つのパルス励起光源は複数の光源を含んでなり、前記複数の光源の各光源は、複数の波長の 1 つ又は複数で励起光を放出する、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 10】

前記複数の光源の各々から放出される前記光を空間的に重複させるための波長コンバイナをさらに含んでなる、請求項 9 に記載の機器。

【請求項 11】

前記放出エネルギーを透過させ、かつ前記少なくとも 1 つのパルス励起光源からの励起光の、吸収及び反射のうちの少なくとも一方を行うための少なくとも 1 つのスペクトルフィルタをさらに含んでなる、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 12】

第一の波長の放出エネルギーを第二の波長の放出エネルギーから空間的に分離するための少なくとも 1 つのスペクトル選別要素をさらに含んでなる、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 13】

前記少なくとも 1 つのスペクトル選別要素は回折光学要素を含んでなる、請求項 12 に記載の機器。

【請求項 14】

前記回折光学要素は、前記放出エネルギーを彩色的に分散させることと、前記放出エネルギーを集光することとの両方を行う、請求項 13 に記載の機器。

【請求項 15】

前記回折光学要素はオフセットフレネルレンズを含んでなる、請求項 13 に記載の機器。

【請求項 16】

前記少なくとも 1 つのスペクトル選別要素は光フィルタ要素である、請求項 12 に記載の機器。

【請求項 17】

(i) 励起エネルギーを前記複数の検体ウェルに誘導し、 (i i) 前記複数の検体ウェル

10

20

30

40

50

に対応する前記複数のセンサからの信号を検出し、かつ（ i i i ）前記信号の時間分布を使用して前記検体又はそのサブユニットを識別するようにプログラムされる制御システムをさらに含んでなる、請求項 1 に記載の機器。

【請求項 18】

請求項 1 ～ 17 のいずれか一項に記載の機器と、前記アッセイチップとを備える装置において、

前記アッセイチップは、

前記複数の検体ウェルのうちの 1 つからの前記放出エネルギーを特定の方向に誘導するための少なくとも 1 つの要素であって、屈折要素、回折要素、プラズモン要素、及び共振器からなる群から選択される少なくとも 1 つの要素をさらに備える、装置。

10

【請求項 19】

前記アッセイチップは、前記機器に接続され、かつそれから取り外されるように形成され、前記アッセイチップが前記機器に接続されるときに、前記複数の検体ウェルのうちの検体ウェルと前記複数のセンサのうちの前記対応するセンサとの間の光学距離が 30 cm 未満である、請求項 18 に記載の装置。

【請求項 20】

前記検体は、複数の波長バンドの 1 つの波長バンド内の前記放出エネルギーを放出する発光タグを含んでなり、及び

前記複数のセンサの各センサは、前記複数の波長バンドの各々の前記放出エネルギーを検出するように構成されるサブセンサを含んでなる、請求項 18 に記載の装置。

20

【請求項 21】

前記複数のセンサの各センサは少なくとも 2 つのサブセンサを含んでなる、請求項 20 に記載の装置。

【請求項 22】

前記機器は、第一の波長の放出エネルギーを前記少なくとも 2 つのサブセンサの第一のサブセンサに向かって誘導し、かつ第二の波長の放出エネルギーを前記少なくとも 2 つのサブセンサの第二のサブセンサに向かって誘導する、少なくとも 1 つの波長依存要素をさらに含んでなる、請求項 21 に記載の装置。

【請求項 23】

前記少なくとも 1 つの波長依存要素は回折光学要素及びスペクトルフィルタのうちの少なくとも 1 つである、請求項 22 に記載の装置。

30

【請求項 24】

各検体は、他の検体の少なくとも 1 つの他の発光タグの寿命と異なる寿命を有する発光タグを含んでなる、請求項 18 に記載の装置。

【請求項 25】

第一の検体に関連付けられる第一の発光タグは、第一の波長の光で励起されるが、第二の波長の光では励起されず、及び

第二の検体に関連付けられる第二の発光タグは、前記第二の波長の光で励起されるが、前記第一の波長の光では励起されない、請求項 20 に記載の装置。

【発明の詳細な説明】

40

【技術分野】

【0001】

本発明は、生物検体及び化学検体のうちの少なくとも一方において、高速な大規模並列定量解析を実行するための装置、方法、及び技術一般と、前記装置を製造する方法一般とに関する。

【背景技術】

【0002】

生物検体の検出及び解析は、生物学的アッセイ（「バイオアッセイ」）を使用して実行されることがある。バイオアッセイには従来、大型で高価な研究設備が関わり、研究にあたる科学者は、機器を操作し、バイオアッセイを実行するための訓練を受ける必要がある

50

。さらに、バイオアッセイは従来、大容量で行われ、検出及び定量化には特定の種類の検体を大量に要する。

【0003】

一部のバイオアッセイは、特定の波長の光を放出する発光タグで検体にタグ付けすることによって行われる。タグは、励起光源で照明されて発光させられ、その発光が光検出器により検出されて、タグにより放出される発光の量が定量化される。発光タグを用いるバイオアッセイには従来、検体を照明するための高価なレーザ光源と、照明された検体からの発光を収集するための複雑で嵩張る検出光学系及び電子機器とが関係する。

【発明の概要】

【課題を解決するための手段】

10

【0004】

いくつかの実施形態は、複数の検体ウェルを含むアッセイチップとインタフェースするように構成される機器に関する。複数の検体ウェルの各検体ウェルは、検体を受けてもよい。機器は、複数の検体ウェルの少なくとも一部の検体を励起するための少なくとも1つのパルス式励起光源を含む。機器はまた、複数のセンサを含み、複数のセンサの各センサは複数の検体ウェルのうちの検体ウェルに対応する。複数のセンサの各センサは、それぞれの検体ウェル内の検体からの放出エネルギーを検出する。また、複数のセンサの各センサは、放出エネルギーの検出時間を検出することができる。機器はまた、少なくとも1つの光学要素を含み、これは複数の検体ウェルの各検体ウェルからの放出エネルギーを複数のセンサのそれぞれのセンサに向かって誘導するように構成される。

20

【0005】

いくつかの実施形態は、アッセイチップと機器とを含む装置に関する。アッセイチップは複数のピクセルを含む。アッセイチップの各ピクセルは、励起されると放出エネルギーを放出する検体を受ける検体ウェルを含む。アッセイチップの各ピクセルはまた、放出エネルギーを特定の方向に誘導するための少なくとも1つの要素も含む。少なくとも1つの要素は、屈折要素、回折要素、プラズモン要素、又は共振器であってもよい。アッセイチップの各ピクセルはまた、光路であって、それに沿って放出エネルギーが検体ウェルから機器のセンサに向かって移動する、光路も含む。機器は、アッセイチップとインタフェースし、各検体ウェル内の検体を励起する少なくとも1つのパルス式励起光源を含む。機器はまた、複数のセンサを含み、複数のセンサの各センサはそれぞれの検体ウェルに対応する。複数のセンサの各センサは、それぞれの検体ウェル内の検体からの放出エネルギーを検出し、放出エネルギーの検出時間を検出する。機器はまた、各検体ウェルからの放出エネルギーを複数のセンサのそれぞれのセンサに向かって誘導する少なくとも1つの光学要素も含む。

30

【0006】

いくつかの実施形態は、試料を解析する方法に関する。方法は、複数の検体ウェルを含むアッセイチップの上面に試料を提供する工程を含む。方法はまた、チップを、少なくとも1つの励起光源及び少なくとも1つのセンサを含む機器と整列させる工程を含む。方法はまた、複数の検体ウェルの少なくとも1つにおいて、試料からの検体を少なくとも1つのパルス式励起光源からのパルス式励起光で励起する工程を含む。方法はまた、少なくとも1つのセンサで、励起光による励起に応答して少なくとも1つの検体ウェル内の検体により生成された放出エネルギーを検出する工程を含む。少なくとも1つのセンサは、検体により生成された放出エネルギーの寿命を判定できる。

40

【0007】

いくつかの実施形態は、標的核酸分子を配列解析する方法に関する。方法は、パルス式励起源と、光の少なくとも1つの時間的特性を検出できるセンサとを含む機器に隣接してチップを提供する工程を含む。チップは、前記チップが前記機器の検出位置にあるときに、前記励起源と前記センサとに動作可能に連結される少なくとも1つのウェルを含む。ウェルは、前記標的核酸分子、重合酵素、及び複数の種類のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を収容する。方法はまた、前記チップが前記検出位置にあるときに、前記重合酵素

50

の存在下で前記標的核酸分子のプライミング位置において伸張反応を実行して、前記ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を、前記標的核酸分子と相補的な成長鎖内に連続的に組み込む工程を含む。組み込み及び前記励起源からの励起エネルギーによる励起時に、前記ウェル内で前記ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体が信号を放出する。方法はまた、前記センサを使用して、前記複数の種類のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体に関して区別可能な前記信号の空間的及び／又は時間的分散パターンを検出する工程を含む。方法はまた、前記ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を、前記信号の前記空間的及び／又は時間的分散パターンに基づいて識別し、それにより、前記標的核酸分子を配列解析する工程を含む。

【0008】

いくつかの実施形態は、核酸配列解析の方法に関する。方法は、機器に隣接してチップを提供する工程を含む。チップは複数のウェルを含み、複数のウェルは、それぞれ、前記チップが前記機器の検出位置にあるときに、前記機器のパルス式励起源と、センサとに動作可能に連結される。前記複数の個々のウェルは、前記標的核酸分子、重合酵素、及び複数の種類のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体を収容する。方法はまた、チップが前記検出位置にあるときに、前記ヌクレオチド又はヌクレオチド類似体と前記重合酵素との存在下で前記標的核酸分子を重合反応にさらして、前記標的核酸分子と相補的な成長鎖を生成する工程を含む。組み込み中、前記励起源からの励起エネルギーによる励起時に、前記個々のウェル内でヌクレオチド又はヌクレオチド類似体が信号を放出する。方法はまた、前記センサを使用して、前記複数の種類のヌクレオチド又はヌクレオチド類似体に関して区別可能な前記信号の時間的分散パターンを検出する工程を含む。方法はまた、前記標的核酸分子の配列を、前記信号の空間的及び／又は時間的分散パターンに基づいて特定する工程を含む。

【0009】

本教示の上記及びその他の態様、実施形態、及び特徴は、添付の図面及び以下の説明からより十分に理解できる。

「ピクセル」という用語は、本開示内において、集積装置のユニットセルを指すために使用され得る。ユニットセルとは、検体ウェルとセンサとを含んでもよい。ユニットセルは、励起源をさらに含んでもよい。ユニットセルは、少なくとも1つの励起結合光学構造（これは、「第一の構造」と呼んでもよい）をさらに含んでもよく、これは、励起源から検体ウェルへの励起エネルギーの結合を促進するように構成される。ユニットセルは、少なくとも1つの放出光結合構造をさらに含んでもよく、これは、検体ウェルからセンサへの放出物の結合を促進するように構成される。ユニットセルは、集積電子装置（例えば、CMOS装置）をさらに含んでもよい。集積装置にアレイ状に配置された複数のピクセルがあってもよい。

【0010】

「光学」という用語は、本開示において、可視、近赤外、及び短波長赤外スペクトルバンドを指すために使用され得る。

「タグ」という用語は、本開示において、解析対象の検体に取り付けられるか、又は検体と反応し得る反応物質に取り付けられるタグ、プローブ、マーカ、又はレポータを指すために使用され得る。

【0011】

「励起エネルギー」という語句は、本開示において、検体ウェル内の検体及び／又はタグに送達されるあらゆる形態のエネルギー（例えば、放射又は非放射）を指すために使用され得る。放射励起エネルギーは、1つ又は複数の特徴的波長の光放射を含んでもよい。

【0012】

「特徴的波長」という語句は、本開示において、放射の限定的バンド幅内の中央又は支配的波長を指すために使用され得る。場合により、それは放射のバンド幅のピーク波長を指し得る。蛍光体の特徴的波長の例は、563 nm、595 nm、662 nm、及び68

10

20

30

40

50

7 nmである。

【0013】

「特徴的エネルギー」という語句は、本開示において、特徴的波長に関連するエネルギーを指すために使用され得る。

「放出物」という用語は、本開示において、タグ及び／又は検体からの発光を指すために使用され得る。これには、放射放出物（例えば、光学放出物）又は非放射エネルギー移動（例えば、デクスタ型エネルギー移動又はフェルスタ共鳴エネルギー移動）が含まれる。放出物は、検体ウェル内の検体及び／又はタグの励起から得られる。

【0014】

「検体ウェルからの放出物」又は「検体からの放出物」という語句は、本開示において、検体ウェル内のタグ及び／又は検体からの放出物を指すために使用され得る。

「セルフアライン」という用語は、本開示において、第一のリソグラフィによるパターンニング工程（例えば、フォトリソグラフィ、イオンビームリソグラフィ、EUVリソグラフィ）によって第一の要素のパターンが印刷され、第二のリソグラフィによるパターンニング工程によって、第一のリソグラフィによるパターンニング工程と整合させて第二の要素のパターンが印刷される2つの別々のリソグラフィパターンニング工程を使用せずに、少なくとも2つの異なる要素（例えば、検体ウェル及び放出物結合構造、検体ウェル及び励起源）が製造されて、相互に整列される微細製作プロセスを指すために使用され得る。セルフアラインプロセスは、1つのリソグラフィパターンニング工程に第一及び第二の要素の両方のパターンを含める工程を含んでいてもよく、又は第一の要素の製造後の構造の特徴物を使用して第二の要素を形成する工程を含んでいてもよい。

【0015】

「センサ」という用語は、本開示において、検体ウェルからの放出物を検出して、検出された放出物を表す少なくとも1つの電気信号を生成するように構成された1つ又は複数の集積回路装置を指すために使用され得る。

【0016】

「ナノスケール」という用語は、本開示において、その少なくとも1つの寸法又は最小特徴物の大きさが150ナノメートル（nm）以下であり、約500nmを超えないオーダーである構造を指すために使用され得る。

【0017】

「マイクロスケール」という用語は、本開示において、その少なくとも1つの寸法又は最小構造物の大きさが約500nm～約100マイクロメートルである構造を指すために使用され得る。

【0018】

「励起エネルギーを増大させる」という語句は、本開示において、検体ウェルの励起領域における励起エネルギーの強度を高めることを指すために使用され得る。強度は、例えば検体ウェルに入射する励起エネルギーを集束及び／又は共振させることによって高められてもよい。場合により、強度は、励起エネルギーが検体ウェルの励起領域内にさらに浸透できるようにする反射防止コーティング又は損失層によって高められてもよい。励起エネルギーの増大は、検体ウェルの励起領域における励起エネルギーを増大させるための構造を含まない実施形態の比較基準であってもよい。

【0019】

「約」、「略」、「実質的に」という用語は、本開示において、数値を示すために使用され得、言及された数値プラス及びマイナス容認可能なばらつきの範囲を含むものとする。ばらつきの大きさは、ある実施形態では5%未満、ある実施形態では10%未満、さらにある実施形態では20%未満とすることができる。装置が広い数値範囲、例えば1桁以上の範囲で適正に機能できる実施形態において、ばらつきの量は係数2とすることができる。例えば、装置が20～350の範囲の数値で適正に機能する場合、「約80」は40～160の数値を含んでいてもよい。

【0020】

「隣接」という用語は、本開示において、相互に近接して（例えば、ピクセルの横又は縦寸法の約5分の1未満の距離内に）配置された2つの要素を指すために使用され得る。場合により、隣接する要素間に介在構造又は層があってもよい。場合により、隣接する要素は、介在する構造又は要素がない状態で相互に直接隣接していてもよい。

【0021】

「検出」という用語は、本開示において、センサにおいて検体ウェルから放出物を受け、その放出物を表すか、又はそれに関連する少なくとも1つの電気信号を生成することを指すために使用され得る。「検出」という用語はまた、本開示において、検体ウェルからの放出物に基づいて、検体ウェル内の特定の検体又はタグの存在を判定するか、又はその特性を識別することを指すために使用され得る。

10

【0022】

当業者であれば、本明細書中で説明する図面が例示を目的としているにすぎないことがわかるであろう。当然のことながら、いくつかの例において、本発明の各種の態様が本発明の理解を容易にするために誇張又は拡大して示され得る。図面中、同様の参照文字は異なる図面を通じて概して同様の特徴、機能的に同様の及び／又は構造的に同様の要素を指す。図面は必ずしも正確な縮尺によるとはかぎらず、その代わりに本教示の原理を例示することに重点を置いている。図面は、決して本教示の範囲を限定することを意図されていない。

【図面の簡単な説明】

【0023】

20

【図1-1】いくつかの実施形態による2つの異なるマーカの蛍光寿命曲線を示すグラフ。

【図1-2A】いくつかの実施形態による放出波長スペクトルを示すグラフ。

【図1-2B】いくつかの実施形態による吸収波長スペクトルを示すグラフ。

【図1-2C】いくつかの実施形態による放出波長スペクトルを示すグラフ。

【図1-3A】放出波長及び放出寿命の位相空間を示すグラフ。

【図1-3B】吸収波長及び放出寿命の位相空間を示すグラフ。

【図1-4】放出波長、吸収波長、及び放出寿命の位相空間を示すグラフ。

【図2-1】いくつかの実施形態による、生物及び化学試料の高速モバイル解析に使用できる装置のブロック図。

30

【図2-2】いくつかの実施形態による、センサチップのピクセルとアッセイチップのピクセルとの間の関係の概略を示す上面図。

【図2-3】いくつかの実施形態による、アッセイチップの1つのピクセルとセンサチップの1つのピクセルとに関連する構成要素を示すブロック図。

【図2-4】いくつかの実施形態による機器の構成要素の一部を示す斜視図。

【図3-1A】いくつかの実施形態によるアッセイチップ及びチップホルダフレームの上面斜視図。

【図3-1B】いくつかの実施形態によるアッセイチップ及びチップホルダフレームの下面斜視図。

【図3-1C】いくつかの実施形態によるアッセイチップ及びチップホルダフレームの断面図。

40

【図3-2】いくつかの実施形態による、検体ウェルに入射する励起エネルギーを示す。

【図3-3】いくつかの実施形態による、ゼロモード導波路として形成される検体ウェルに沿った励起エネルギーの減衰を示すグラフ。

【図3-4】いくつかの実施形態における検体ウェルに関連する励起領域で励起エネルギーを増大させる窪みを含む検体ウェルを示す。

【図3-5】1つの実施形態による、窪みを有する検体ウェルと有さない検体ウェルとに関する励起強度の比較。

【図3-6】いくつかの実施形態による検体ウェル及び突出部に形成された窪みを示す断面図。

50

【図 3-7 A】いくつかの実施形態による、テーパ状の側壁を有する検体ウェルを示す断面図。

【図 3-7 B】いくつかの実施形態による、湾曲側壁及び横寸法がより小さい窪みを有する検体ウェルを示す断面図。

【図 3-7 C】表面プラズモン構造から形成された検体ウェルの側面図。

【図 3-7 D】表面プラズモン構造から形成された検体ウェルの平面図。

【図 3-7 E】いくつかの実施形態による、検体ウェルの側壁に沿って形成された励起エネルギー増大構造を含む検体ウェルを示す。

【図 3-7 F】いくつかの実施形態による、多層積層体内に形成された検体ウェルを示す。

10

【図 3-8】いくつかの実施形態による、検体ウェルの表面上に形成された表面コーティングを示す。

【図 3-9 A】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成するリフトオフプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-9 B】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成するリフトオフプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-9 C】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成するリフトオフプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-9 D】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成するリフトオフプロセスに関連する構造を示す断面図。

20

【図 3-9 E】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成するリフトオフプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-9 F】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成する代替的なリフトオフプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-10 A】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成する直接エッチングプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-10 B】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成する直接エッチングプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-10 C】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成する直接エッチングプロセスに関連する構造を示す断面図。

30

【図 3-10 D】いくつかの実施形態による、検体ウェルを形成する直接エッチングプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-11】いくつかの実施形態による、リフトオフプロセス又は直接エッチングプロセスを使用して多層内に形成できる検体ウェルを示す断面図。

【図 3-12】いくつかの実施形態による、窪みを形成するために使用できるエッチングプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-13 A】いくつかの実施形態による、窪みを形成する代替的なプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-13 B】いくつかの実施形態による、窪みを形成する代替的なプロセスに関連する構造を示す断面図。

40

【図 3-13 C】いくつかの実施形態による、窪みを形成する代替的なプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-14 A】いくつかの実施形態による、接着剤及び保護層を堆積させるためのプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-14 B】いくつかの実施形態による、接着剤及び保護層を堆積させるためのプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-14 C】いくつかの実施形態による、接着剤及び保護層を堆積させるためのプロセスに関連する構造を示す断面図。

【図 3-14 D】いくつかの実施形態による、接着剤及び保護層を堆積させるためのプロセスに関連する構造を示す断面図。

50

【図 3-15】いくつかの実施形態による、検体ウェル内の中央に接着剤を堆積させるためのプロセスに関連する構造を示す。

【図 4-1A】1つのみの実施形態による、表面プラズモン構造。

【図 4-1B】1つのみの実施形態による、表面プラズモン構造。

【図 4-1C】いくつかの実施形態による、検体ウェルに隣接して形成された表面プラズモン構造。

【図 4-1D】いくつかの実施形態による、検体ウェル内に形成された表面プラズモン構造。

【図 4-1E】いくつかの実施形態による、検体ウェル内に形成された表面プラズモン構造。

10

【図 4-2A】いくつかの実施形態による周期的な表面プラズモン構造の例を示す。

【図 4-2B】いくつかの実施形態による周期的な表面プラズモン構造の例を示す。

【図 4-2C】いくつかの実施形態による周期的な表面プラズモン構造の例を示す。

【図 4-2D】いくつかの実施形態による、周期的な表面プラズモン構造に隣接して形成された検体ウェルの励起エネルギーの数値的シミュレーションを示す。

【図 4-2E】いくつかの実施形態による周期的プラズモン構造を示す。

【図 4-2F】いくつかの実施形態による周期的プラズモン構造を示す。

【図 4-2G】いくつかの実施形態による周期的プラズモン構造を示す。

【図 4-2H】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造を含むナノアンテナを示す。

20

【図 4-2I】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造を含むナノアンテナを示す。

【図 4-3A】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造を形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図 4-3B】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造を形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図 4-3C】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造を形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図 4-3D】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造を形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

30

【図 4-3E】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造を形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図 4-4A】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す断面図。

【図 4-4B】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す断面図。

【図 4-4C】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す断面図。

【図 4-4D】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す断面図。

40

【図 4-4E】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す断面図。

【図 4-4F】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す断面図。

【図 4-4G】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す断面図。

【図 4-5A】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図 4-5B】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

50

【図４－５Ｃ】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－５Ｄ】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－５Ｅ】いくつかの実施形態による、表面プラズモン構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－６Ａ】いくつかの実施形態による、検体ウェルに隣接して形成された薄い損失膜を示す。

【図４－６Ｂ】いくつかの実施形態による、検体ウェル及び薄い損失膜の付近の励起エネルギーの数値的シミュレーションの結果を示す。

【図４－６Ｃ】いくつかの実施形態による、検体ウェル及び薄い損失膜の付近の励起エネルギーの数値的シミュレーションの結果を示すグラフ。

【図４－６Ｄ】いくつかの実施形態による、検体ウェルから離間された薄い損失膜を示す。

【図４－６Ｅ】いくつかの実施形態による、検体ウェルに隣接して形成された薄い損失膜積層体を示す。

【図４－７Ａ】いくつかの実施形態による、検体ウェルに隣接して共振空洞を形成するために使用できる反射積層体を示す。

【図４－７Ｂ】いくつかの実施形態による、検体ウェルに励起エネルギーを集束させるために使用できる誘電構造を示す。

【図４－７Ｃ】いくつかの実施形態による、検体ウェルに隣接してパターンニングできるフォトリソバンドギャップ構造を示す。

【図４－７Ｄ】いくつかの実施形態による、検体ウェルに隣接してパターンニングできるフォトリソバンドギャップ構造を示す。

【図４－８Ａ】いくつかの実施形態による、誘電構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－８Ｂ】いくつかの実施形態による、誘電構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－８Ｃ】いくつかの実施形態による、誘電構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－８Ｄ】いくつかの実施形態による、誘電構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－８Ｅ】いくつかの実施形態による、誘電構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－８Ｆ】いくつかの実施形態による、誘電構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－８Ｇ】いくつかの実施形態による、誘電構造及びセルフアライン検体ウェルを形成するためのプロセス工程に関連する構造を示す。

【図４－９Ａ】いくつかの実施形態による、非放射プロセスを介して励起エネルギーを検体に結合するための構造を示す。

【図４－９Ｂ】いくつかの実施形態による、非放射プロセスを介して励起エネルギーを検体に結合するための構造を示す。

【図４－９Ｃ】いくつかの実施形態による、複数の非放射プロセスにより検体に励起エネルギーを結合するための構造を示す。

【図４－９Ｄ】いくつかの実施形態による、放射又は非放射プロセスを介して励起エネルギーを検体に結合するために、１つ又は複数のエネルギー変換粒子を導入する構造を示す。

【図４－９Ｅ】いくつかの実施形態による、励起エネルギーの検体へのダウンコンバージョンに関連するスペクトルを示す。

【図４－９Ｆ】いくつかの実施形態による、励起エネルギーの検体へのアップコンバージョン

10

20

30

40

50

ョンに関連するスペクトルを示す。

【図5-1】いくつかの実施形態による同心円状のプラズモン円形回折格子。

【図5-2】いくつかの実施形態による螺旋プラズモン回折格子。

【図5-3A】いくつかの実施形態による、同心円状のプラズモン円形回折格子からの放出空間分布パターンを示す。

【図5-3B】いくつかの実施形態による、非周期的及び周期的な同心円状のプラズモン円形回折格子の指向性を示す。

【図5-4A】いくつかの実施形態によるプラズモンナノアンテナを示す。

【図5-4B】いくつかの実施形態によるプラズモンナノアンテナを示す。

【図5-5A】いくつかの実施形態によるプラズモンナノアンテナを示す。

【図5-5B】いくつかの実施形態によるプラズモンナノアンテナを示す。

【図5-5C】いくつかの実施形態による、ナノアンテナアレイからの放出エネルギーの放射パターンを示す。

【図5-6A】いくつかの実施形態によるアッセイチップの屈折光学系を示す。

【図5-6B】いくつかの実施形態によるアッセイチップのフレネルレンズを示す。

【図6-1】いくつかの実施形態による機器の顕微鏡構成要素を示す。

【図6-2A】いくつかの実施形態によるセンサチップの遠隔場スペクトル選別要素を示す。

【図6-2B】いくつかの実施形態によるセンサチップの遠隔場フィルタ要素を示す。

【図6-3A】いくつかの実施形態によるセンサチップの薄い損失膜を示す。

【図6-3B】いくつかの実施形態によるセンサチップの薄い損失膜を示す。

【図6-4A】いくつかの実施形態による機器の光学ブロックを示す斜視図。

【図6-4B】いくつかの実施形態による機器の光学ブロックを示す斜視図。

【図6-5】いくつかの実施形態による、光学システムを通る光路を示す。

【図7-1A】いくつかの実施形態による、センサチップのピクセル内のセンサを示す正面図。

【図7-1B】いくつかの実施形態による、2つの別々の同心円状のアクティブ領域を有するブルズアイ (bullseye) センサを示す。

【図7-1C】いくつかの実施形態による、4つの別々のアクティブ領域を有するストライプセンサを示す。

【図7-1D】いくつかの実施形態による、4つの別々のアクティブ領域を有する4眼センサを示す。

【図7-1E】いくつかの実施形態による、4つの別々のアクティブ領域を有する扇形セグメントセンサを示す。

【図7-1F】いくつかの実施形態によるスタックセグメントセンサを示す。

【図7-2A】いくつかの実施形態による、第一の波長で放出されるエネルギーのための選別要素からの放出分布を示す。

【図7-2B】いくつかの実施形態による、図7-2Aに示される放出分布に対応する、ブルズアイセンサにより受け取られる放射パターンを示す。

【図7-2C】いくつかの実施形態による、第二の波長で放出されるエネルギーのための選別要素からの放出分布を示す。

【図7-2D】いくつかの実施形態による、図7-2Cに示される放出分布に対応する、ブルズアイセンサにより受け取られる放射パターンを示す。

【図7-2E】いくつかの実施形態による、検体からの第一の放出波長のための2つのアクティブ領域を有するブルズアイセンサに関する信号検出の数値シミュレーションの結果を示すグラフ。

【図7-2F】いくつかの実施形態による、検体からの第二の放出波長のための、図7-2Eに関連するブルズアイセンサに関する信号検出の数値シミュレーションの結果を示すグラフ。

【図7-2G】いくつかの実施形態による、検体からの第三の放出波長のための、図7-

10

20

30

40

50

2 Eに関連するブルズアイセンサに関する信号検出の数値シミュレーションの結果を示すグラフ。

【図7-2 H】いくつかの実施形態による、検体からの第四の放出波長のための、図7-2 Eに関連するブルズアイセンサに関する信号検出の数値シミュレーションの結果を示すグラフ。

【図7-2 I】いくつかの実施形態による、検体からの第一の放出波長のための4つのアクティブ領域を有するブルズアイセンサに関する信号検出の数値シミュレーションの結果を示すグラフ。

【図7-2 J】いくつかの実施形態による、検体からの第二の放出波長のための、図7-2 Iに関連するブルズアイセンサに関する信号検出の数値シミュレーションの結果を示すグラフ。

10

【図7-3 A】いくつかの実施形態による、2つのアクティブ領域を含むセンサからの信号を読み取るために使用できる機器の回路図。

【図7-3 B】いくつかの実施形態による、信号累積及び読取りのための、センサチップに含めることのできる3トランジスタ回路図。

【図7-3 C】いくつかの実施形態による、4つのアクティブ領域を含むセンサからの信号を読み取るために使用できる機器の回路図。

【図7-4 A】いくつかの実施形態による、検体解析に使用できる2つの異なるエミッタの時間的放出特徴を示す。

【図7-4 B】いくつかの実施形態による、励起源及び検体からの発光の時間的展開を示す。

20

【図7-4 C】いくつかの実施形態による時間遅延サンプリングを示す。

【図7-4 D】いくつかの実施形態による、2つの異なるエミッタの時間的放出特徴を示す。

【図7-4 E】いくつかの実施形態による、センサの電荷蓄積ノードにおける電圧ダイナミクスを示す。

【図7-4 F】いくつかの実施形態による、センサセグメントのリセットなしの二重リードを示す。

【図7-4 G】いくつかの実施形態による、時間的に異なる放出特徴を有する2つのエミッタに関連する第一及び第二のリード信号レベルを示す。

30

【図7-4 H】いくつかの実施形態による、時間的に異なる放出特徴を有する2つのエミッタに関連する第一及び第二のリード信号レベルを示す。

【図7-5】いくつかの実施形態による、時間分解能力を有するピクセルの概略図を示す。

【図7-6】いくつかの実施形態による、時間分解能力を有するピクセルの概略図を示す。

【図8-1 A】いくつかの実施形態による励起源のスペクトル励起バンドを示す。

【図8-1 B】いくつかの実施形態による励起源のスペクトル励起バンドを示す。

【図8-2 A】いくつかの実施形態によるコヒーレント光源の概略図である。

【図8-2 B】いくつかの実施形態による、励起源の時間的強度プロファイルを示す。

40

【図8-3】いくつかの実施形態による、励起源からの弛緩振動及び光信号を示す。

【図8-4】いくつかの実施形態による、出力光パルスのテールのパワーを低減させるためのカスタム化電気パルスの使用を示す。

【図8-5】いくつかの実施形態による、時間に関する励起源の光出力パワーを示すグラフ。

【図8-6】いくつかの実施形態による、時間に関する励起源の光出力パワーを示すグラフ。

【図8-7】いくつかの実施形態による、より多くのワイヤボンドを使用することによる、高周波数でのより高い電流を示す。

【図8-8 A】いくつかの実施形態によるトランスミッションラインパルサの概略図であ

50

る。

【図 8-8 B】いくつかの実施形態による、トランスミッションラインから得られる光パルスの時間的プロファイルを示す。

【図 8-9】いくつかの実施形態による、パルス式励起光を生成するための例を示す回路図。

【図 8-10】いくつかの実施形態による、パルス式励起光を生成するための例を示す回路図。

【図 8-11 A】いくつかの実施形態による、出力パルスとしてカスタム化電気信号を生成するために使用可能な 1 つの RF 増幅器を有する例を示す回路図。

【図 8-11 B】図 8-11 A の回路から得られる電気パルスのプロファイル。

【図 8-12 A】いくつかの実施形態による、出力パルスとしてカスタム化電気信号を生成するために使用可能な 1 つの RF 増幅器を有する例を示す回路図。

【図 8-12 B】図 8-12 A の回路から得られる電気パルスのプロファイル。

【図 8-13 A】いくつかの実施形態による 4 つの異なる光源を組み合わせるための概略図を示す。

【図 8-13 B】いくつかの実施形態による、4 つの光源のインピーダンスに関する電流、パワー効率、及び電圧を示す。

【図 9-1】いくつかの実施形態による、生物及び化学試料の高速モバイル解析に使用できる小型装置の動作方法を示すフローチャート。

【図 9-2】いくつかの実施形態による校正手順を示すフローチャート。

【図 9-3】いくつかの実施形態によるデータ解析手順を示すフローチャート。

【図 10-1】いくつかの実施形態による単一分子拡散配列解析の概略図。

【図 10-2】1 つの検体ウェルにおけるある期間のシーケンシングプロセスを概略的に示す。

【図 10-3】いくつかの実施形態による、検体ウェル表面の処理プロセスを示す。

【図 10-4】いくつかの実施形態による例示的な寿命測定を示す。

【図 10-5】いくつかの実施形態による、センサに組み込まれたフレネルレンズを示す。

【図 10-6】いくつかの実施形態による 4 つのマーカの蛍光寿命を示す。

【図 10-7】図 10-6 からのマーカを区別するためにセンサによって使用される 16 のタイムビンを示す。

【図 10-8】いくつかの実施形態による 4 つのマーカの蛍光寿命を示す。

【図 10-9】図 10-6 からのマーカを区別するためにセンサによって使用される 13 のタイムビンを示す。

【図 10-10】いくつかの実施形態による寿命及びスペクトル測定方式を示す。

【図 10-11】いくつかの実施形態による、寿命及び放出波長に基づく 4 つのマーカの分離を示す。

【図 10-12】いくつかの実施形態による 3 つのマーカの放出スペクトルを示す。

【図 10-13】いくつかの実施形態による 4 つのマーカの蛍光寿命を示す。

【図 10-14】いくつかの実施形態による、4 眼センサを使用する図 10-12 からの 3 つのマーカの信号プロファイルを示す。

【図 10-15】いくつかの実施形態による 4 つのマーカの蛍光寿命を示す。

【図 10-16】いくつかの実施形態による、4 眼センサを使用する A T R h o 14 の信号プロファイルを示す。

【図 10-17】いくつかの実施形態による、寿命及び吸収エネルギー測定方式を示す。

【図 10-18】いくつかの実施形態による 4 つのマーカの吸収スペクトルを示す。

【図 10-19】いくつかの実施形態による 2 つのマーカの寿命測定を示す。

【図 10-20】図 10-19 からのマーカを区別するためにセンサによって使用される 8 つのタイムビンを示す。

【図 10-21】いくつかの実施形態による 4 つのマーカの信号プロファイルを示す。

10

20

30

40

50

【図10-22】いくつかの実施形態による4つのマーカの放出スペクトルを示す。

【図10-23】いくつかの実施形態によるコンピューティング環境を示す。

【図11-1】いくつかの実施形態による検体ウェルの製造方法を示す。

【図11-2】いくつかの実施形態による、リフトオフ方法を使用して検体ウェルを製造する方法を示す。

【図11-3】いくつかの実施形態による検体ウェルの形成方法を示す。

【図11-4】いくつかの実施形態による同心円回折格子の形成方法を示す。

【図11-5】いくつかの実施形態による同心円回折格子の形成方法を示す。

【図11-6】いくつかの実施形態によるナノアパーチャを位置決めする方法を示す。

【図11-7】いくつかの実施形態によるレンズアレイの製造方法を示す。

10

【図11-8】いくつかの実施形態による屈折レンズアレイを示す。

【図11-9】いくつかの実施形態による屈折レンズアレイを示す。

【図11-10】いくつかの実施形態によるレンズの形成方法を示す。

【図11-11】いくつかの実施形態によるレンズの形成方法を示す。

【図11-12】いくつかの実施形態による回折光学要素を示す。

【図11-13】いくつかの実施形態による、回折光学要素を形成するために使用される2つのユニットセル層を示す。

【図11-14】いくつかの実施形態による回折レンズパターンを示す。

【図11-15】いくつかの実施形態による回折光学要素の製造方法を示す。

【図11-16】いくつかの実施形態による回折光学要素の製造方法を示す。

20

【図11-17】いくつかの実施形態による埋込み型フレネルレンズの製造方法を示す。

【図11-18】いくつかの実施形態による埋込み型フレネルレンズの製造方法を示す。

【図11-19】いくつかの実施形態による埋込み型フレネルレンズの製造方法を示す。

【発明を実施するための形態】

【0024】

本願の実施形態の特徴及び利点は、図面と共に下記の詳細な説明を読めばより明らかとなるであろう。

本発明者らは、バイオアッセイを実行するための従来の装置が大型で高価であり、進歩した研究室での実行手法が必要であることを認識し、そのように理解した。多くの種類のバイオアッセイは、試料内の単一分子の検出に依存している。従来、単一分子検出には、分子の励起に必要な高強度の光を生成するために使用される大型で嵩張るレーザシステムが必要であった。それに加えて、試料にレーザ光を誘導するために嵩張る光学構成要素が使用され得、試料からの発光をセンサに誘導するために追加の光学構成要素が使用され得る。これらの従来の光学構成要素には、精密な整列及び安定化が必要となり得る。従来の研究室の機器、及びこの従来の機器を使用するために必要な訓練により、バイオアッセイは複雑で高価となる可能性がある。

30

【0025】

本発明者らは、生物及び／又は化学試料を簡単かつ安価に解析して、その構成部分の識別を判定することのできる装置が必要であると認識し、そのように理解した。このような装置の用途は、複数のアミノ酸を有する核酸分子又はポリペプチド（例えば、タンパク質）等の生体分子の配列解析用であってもよい。単一分子又は粒子の検出及び定量化を実行するための小型高速装置は、生物及び／又は化学検体の複雑な定量測定を実行する費用を削減し、生化学的な技術的発見速度を急速に高めることができる。さらに、容易に搬送可能である費用対効果の高い装置により、先進諸国においてバイオアッセイが実行される方法が変化するだけでなく、発展途上地域の人々にとって、初めて、重要な診断試験が容易に利用可能となり、これは発展途上地域の人々の健康及び福利を劇的に向上させることができる。例えば、いくつかの実施形態において、バイオアッセイを実行するための装置は、血液、尿、及び／又は唾液等の生物検体の診断試験を実行するために使用される。装置はまた、個人が家庭で、医師が発展途上国又は他のあらゆる場所、例えば過疎地域の診療所において使用してもよい。このような診断試験は、核酸分子又はタンパク質等、被験者

40

50

の生物検体における生体分子の検出を含むことができる。いくつかの例において、診断試験は、被験者の生物検体中の核酸分子の配列解析、例えば被験者の生物検体中の無細胞デオキシリボ核酸分子又は表現生成物の配列解析を含む。

【0026】

本発明者らはまた、検体に複数の異なる種類の発光マーカでタグ付けすると、発光マーカの何れの適当な特徴でも、集積装置の特定のピクセル内に存在するマーカの種類の識別に使用されてよいと認識し、そのように理解した。例えば、マーカにより放出される発光の特徴及び／又は励起吸収の特徴がマーカの識別に使用されてもよい。いくつかの実施形態において、（光の波長に直接関係する）発光の放出エネルギーが、第一の種類のマーカを第二の種類のマーカから区別するために使用されてもよい。それに加えて、又はその代わりに、発光寿命測定も特定のピクセル内に存在するマーカの種類の識別するために使用されてよい。いくつかの実施形態において、蛍光寿命測定は、光子がいつ十分な分解能で検出されて、寿命情報を取得したかを区別できるセンサを使用するパルス式励起源で行われてもよい。それに加えて、又はその代わりに、異なる種類のマーカにより吸収される励起光のエネルギーが、特定のピクセル内に存在するマーカの種類の識別するために使用されてもよい。例えば、第一のマーカは第一の波長の光を吸収し、第二の波長の光はそれと同等には吸収しないことができ、他方で、第二のマーカは第二の波長の光を吸収し、第一の波長の光はそれと同等には吸収しないことができる。このようにして、各々が異なる励起エネルギーを有する複数の励起光源を使用して検体をインタリーブ方式で照明できる場合、マーカの吸収エネルギーは、検体内に存在するマーカの種類の識別するために使用できる。異なるマーカはまた、異なる発光強度を有し得る。したがって、検出された発光強度も特定のピクセル内に存在するマーカの種類の識別するために使用されてよい。

【0027】

本発明者らが考える機器の用途の1つの非限定的な例は、複数のアミノ酸を有する核酸又はポリペプチド（例えば、タンパク質）等の生体分子の配列解析を実行できる装置である。このような装置を使用して実行できる診断試験は、被験者の生物検体内の核酸分子の配列解析、例えば被験者の生物検体中の無細胞デオキシリボ核酸分子又は表現生成物の配列解析を含む。

【0028】

本願は、核酸分子等の生体分子又はそのサブユニットを検出する装置、システム、及び方法を提供する。このような検出は、配列解析を含むことができる。生体分子は、被験者から取得した生物検体から抽出されてもよい。生物検体は、被験者の体液又は組織、例えば呼気、唾液、尿、又は血液（例えば、全血又は血漿）から抽出されてもよい。被験者は、病気（例えば、癌）等の健康状態を有すると疑われ得る。いくつかの例において、1つ又は複数の核酸分子が被験者の体液又は組織から抽出される。1つ又は複数の核酸は、被験者から得られる1つ又は複数の細胞、例えば被験者の組織の一部から抽出されても、又は被験者の無細胞体液、たとえば全血から得られてもよい。

【0029】

配列解析は、鋳型の生体分子（例えば、核酸分子）の個々のサブユニットを、鋳型と相補的又は同様の別の生体分子を合成することによって、例えば鋳型核酸分子と相補的な核酸分子を合成し、時間に伴うヌクレオチドの組込みを識別することによって判定すること（すなわち、合成による配列解析）を含むことができる。代替案として、配列解析は、生体分子の個別のサブユニットを直接識別することを含み得る。

【0030】

配列解析中、生体分子の個別のサブユニットを示す信号がメモリに回収されて、リアルタイムで又は後の時点で処理され、生体分子の配列を判定してもよい。このような処理は、信号を、個別のサブユニットの識別を可能にする基準信号と比較することを含んでいてもよく、これは場合によってはリードを生成する。リードは、例えば、染色体又はゲノム領域もしくは遺伝子上の場所と整列させることのできる、より大きい配列又は領域を特定するために使用可能な十分な長さの（例えば、少なくとも30の塩基対（b p : b a s e

pair))の配列であってもよい。

【0031】

生体分子の個別のサブユニットは、マーカを使用して識別されてもよい。いくつかの例において、発光マーカが生体分子の個別のサブユニットの識別に使用される。いくつかの実施形態は発光マーカ（本明細書においては「マーカ」とも呼ぶ）を使用し、これは外来性マーカでも内在性マーカでもよい。外来性マーカは、発光ラベリングのためのレポータ及び／又はタグとして使用される外部発光マーカであってもよい。外来性マーカの例としては、蛍光分子、蛍光体、蛍光染料、蛍光色素、有機染料、蛍光タンパク質、蛍光共鳴エネルギー移動（FRET）に関与する種、酵素、及び／又は量子ドットが含まれていてもよいが、これらに限定されない。その他の外来性マーカも当技術分野で知られている。このような外来性マーカは、特に特定の標的又は構成要素に結合するプローブ又は官能基（例えば、分子、イオン、及び／又は配位子）と共役であってもよい。外来性タグ又はレポータをプローブに取り付けることにより、外来性タグ又はレポータの存在の検出を通じて標的を識別できる。プローブの例としては、タンパク質、核酸（例えば、DNA、RNA）分子、脂質、及び抗体プローブを含んでもよい。外来性マーカと官能基との組合せは、検出に使用される何れの適当なプローブ、タグ、及び／又はラベルを形成してもよく、これには分子プローブ、標識プローブ、ハイブリダイゼーションプローブ、抗体プローブ、タンパク質プローブ、（例えば、ビオチン結合プローブ）、酵素ラベル、蛍光プローブ、蛍光タグ、及び／又は酵素レポータが含まれる。

10

【0032】

本開示は蛍光マーカについて言及するが、その他の種類のマーカが本明細書で提供する装置、システム、及び方法に使用されてもよい。このようなマーカは、質量タグ、静電タグ、又は電気化学ラベルであってもよい。

20

【0033】

外来性マーカは検体に追加されてもよいが、内在性マーカはすでに検体の一部であってもよい。内在性マーカは、励起エネルギーが存在すると発光又は「自己蛍光」可能である、存在するあらゆる蛍光マーカを含んでもよい。内在性蛍光体の自己蛍光は、ラベルを用いない非侵襲的な標識を可能にし、外来性蛍光体は不要である。このような内在性蛍光体の例としては、例えば、ヘモグロビン、酸素ヘモグロビン、脂質、コラーゲン及びエラスチンクロスリンク、還元型ニコチンアミドアデニンジヌクレオチド（NADH）、酸化フラビン（FAD及びFMN）、リポフスチン、ケラチン、及び／又はポルフィリン（prophyrins）が含まれていてもよいが、これらに限定されない。

30

【0034】

いくつかの実施形態は、試料中の単一分子を検出することによる診断試験に関していてもよいが、本発明者らはまた、本開示の単一分子検出能力が、例えば遺伝子の1つ又は複数の核酸セグメントのポリペプチド（例えば、タンパク質）配列解析又は核酸（例えば、DNA、RNA）配列解析を実行するために使用されてもよいと認識した。核酸配列解析技術は、核酸配列を判定するために使用される方法の他に、配列解析プロセスの速度、リード長さ、及びエラー発生率の点で異なってもよい。例えば、いくつかの核酸配列解析方法は合成による配列解析に基づいており、この場合、ヌクレオチドの識別は、そのヌクレオチドが、標的核酸と相補的である新たに合成された核酸ストランドに組み込まれたときに判定される。

40

【0035】

単一分子検出及び／又は核酸配列解析を実行するための簡素で単純な装置の必要性を認識したところで、本発明者らは、光学（例えば発光）タグ等のタグの集合を使用して異なる分子を標識する、発光タグの集合を使用して異なる分子を標識し、及び単一分子を検出する手法を考案した。このような単一分子は、タグを有するヌクレオチド又はアミノ酸であってもよい。タグは、単一分子に結合されている間に、又は単一分子から離れるときに、又は単一分子に結合されている間及びそれから離れるときに検出されてもよい。いくつかの例において、タグは発光タグである。選択された集合内の各発光タグは、それぞれの

50

分子に関連付けられる。例えば、4つのタグの集合がDNA内に存在する核酸塩基を「標識」するために使用されてもよく、集合内の各タグは異なる核酸塩基に関連付けられ、例えば、第一のタグはアデニン（A）に関連付けられ、第二のタグはシトシン（C）に関連付けられ、第三のタグはグアニン（G）に関連付けられ、第四のタグはチミン（T）に関連付けられる。さらに、タグの集合内の発光タグの各々は異なる特性を有し、これが、集合内の第一のタグを集合内の他のタグから区別するために使用されてもよい。このようにして、各タグは、これらの区別される特徴の1つ又は複数を使用して一意的に識別可能である。例えば、1つのタグをそれ以外のものと区別するために使用可能なタグの特徴としては、励起エネルギーに応答してタグが放出する光の放出エネルギー及び／もしくは波長、ならびに／又は特定のタグがそのタグを励起状態にするために吸収する励起光の波長が含まれていてもよいが、これらに限定されない。

10

【0036】

発光マーカは、それらが放出する光の波長、それらが放出する光の時間的特徴（例えば、その放出減衰期間）、及び励起エネルギーに対するその応答の点で異なる。したがって、発光マーカは、これらの特性の検出に基づいてその他の発光マーカから識別又は区別されてもよい。このような識別又は区別方式は、単独でも、何れの適当な組合せでも使用されてよい。

【0037】

いくつかの実施形態において、本願に記載されているような集積光検出器は、発光寿命、例えば蛍光寿命を測定又は区別することができる。寿命測定は、1つ又は複数のマーカ（例えば、蛍光分子）を励起し、発光の時間変化を測定することに基づく。あるマーカの、そのマーカが励起状態に到達した後に光子を放出する確率は、時間と共に指数関数的に低下する。この確率が低下する速度はマーカの特徴であってもよく、マーカの違いによって異なってもよい。マーカにより放出される光の時間的特徴によって、マーカを識別し、及び／又はマーカを相互に区別することができ得る。

20

【0038】

マーカは、励起状態に到達すると、ある時間に特定の確率で光子を放出し得る。励起したマーカから光子が放出される確率は、マーカの励起後、時間の経過と共に低下し得る。時間に伴う光子放出確率の低下は、指数関数的減衰関数 $p(t) = e^{-(t/\tau)}$ で表されてもよく、式中、 $p(t)$ は時間 t における光子放出確率であり、 τ はマーカの時間パラメータである。時間パラメータ τ は、励起後、マーカが光子を放出する確率が特定の数値であるときの時間を示す。時間パラメータ τ は、その吸収及び放出スペクトル特性から区別され得るマーカの特性である。このような時間的パラメータ τ は、発光寿命、蛍光寿命、又は単純にマーカの「寿命」と呼ばれる。

30

【0039】

図1-1は、寿命の異なる2つのマーカの、時間に関する光子放出の確率をグラフにしたものである。確率曲線Bにより表されるマーカの放出確率は、確率曲線Aにより表されるマーカの放出確率より速く減衰する。確率曲線Bにより表されるマーカは、確率曲線Aにより表されるマーカより短い時間的パラメータ τ 、すなわち寿命を有する。マーカの寿命は、いくつかの実施形態において、0.1～20 ns の範囲であってもよい。しかしながら、本明細書に記載されている技術は、使用されるマーカの寿命に関して限定されない。

40

【0040】

マーカの寿命は、複数のマーカ間で区別するために使用されてもよく、及び／又はマーカの識別のために使用されてもよい。いくつかの実施形態において、異なる寿命の複数のマーカが励起源により励起される寿命測定が行われてもよい。一例として、寿命がそれぞれ0.5、1、2、及び3ナノ秒の4つのマーカは、選択された波長（例えば、635 nm等）を有する光を放出する光源により励起されてもよい。マーカは、マーカにより放出される光の寿命を測定することに基づいて識別されるか、又は相互に差別化されてもよい。

50

【0041】

寿命測定は、絶対的な強度の数値と対照的に、時間と共に強度がどのように変化するかを比較することによって相対的強度測定を使用してもよい。その結果、寿命測定は、絶対的強度測定の困難の一部を回避できる。絶対的強度測定は、存在するマーカの濃度に依存していてもよく、マーカの濃度を変化させるための校正工程が必要であり得る。これに対して、寿命測定は、マーカの濃度により影響を受けないことがあり得る。

【0042】

実施形態は、ある集合内の第一のタグを同じ集合内の他のタグから区別するために、タグ特徴の何れの適当な組合せを使用してもよい。例えば、いくつかの実施形態は、タグを識別するために、タグからの放出光の時間情報のみを使用してもよい。このような実施形態において、選択されたタグの集合内の各タグは、その集合内の他のタグと異なる放出寿命を有し、発光タグの全てが単独の励起源からの光により励起される。図1-2Aは、ある実施形態による4つの発光タグからの放出タイミングを示しており、4つのタグは異なる放出寿命(τ)を示す。あるタグが測定され、特定の数値の寿命を有する確率は、本明細書において、そのタグの「放出タイミング」と呼ばれる。第一の発光タグからの第一の放出タイミング1-101は、 τ_1 において寿命を有するピーク確率を有し、第二の発光タグからの第二の放出タイミング1-102は、 τ_2 において寿命を有するピーク確率を有し、第三の発光タグからの第三の放出タイミング1-103は、 τ_3 において寿命を有するピーク確率を有し、第四の発光タグからの第四の放出タイミング1-104は、 τ_4 において寿命を有するピーク確率を有する。この実施形態において、4つの発光タグの寿命確率ピークは、関係 $\tau_1 < \tau_2 < \tau_3 < \tau_4$ の関係を満たす何れの適当な数値であってもよい。4つの放出タイミンググラフは、図1-2Aに示されるように、特定の発光タグの寿命のわずかなばらつきにより、重複する場合としない場合がある。この実施形態において、4つのタグによる励起源からの光の吸収が最大になる励起波長は実質的に等しいが、そうである必要はない。上述のタグ集合を使用して、4つの異なる分子がこのタグ集合からのそれぞれのタグで標識されてもよく、タグは単独の励起源を使用して励起されてもよく、タグは、光学システムとセンサとを使用してタグの放出寿命を検出することにより、相互に区別できる。図1-2Aは4つの異なるタグを示しているが、何れの適当な数のタグを使用してもよいと理解すべきである。

【0043】

他の実施形態は、タグの集合内のタグの識別を判定するために、何れの適当なタグ特徴の組合せを使用してもよい。使用可能なタグ特徴の例としては、励起波長、放出波長、及び放出寿命が含まれていてもよいが、これらに限定されない。タグ特徴の組合せは位相空間を形成し、各タグは、この位相空間内の点として表されてもよい。タグの集合内のタグは、集合内の各タグ間の「距離」が、検出メカニズムが各タグを集合内の他のタグから区別できる程度に十分に大きくなるように選択されるべきである。例えば、いくつかの実施形態において、タグのサブセットが同じ放出波長を有するが、異なる放出寿命及び／又は異なる励起波長を有するようなタグの集合が選択されてもよい。他の実施形態において、タグのサブセットが同じ放出寿命を有するが、異なる放出波長及び／又は異なる励起波長を有するようなタグの集合が選択されてもよい。他の実施形態において、タグのサブセットが同じ励起波長を有するが、異なる放出波長及び／又は異なる放出寿命を有するようなタグの集合が選択されてもよい。

【0044】

例えば、限定ではないが、図1-2Bは、ある実施形態による4つの発光タグからの放出スペクトルを示しており、タグの2つが第一のピーク放出波長を有し、残りの2つのタグが第二のピーク放出波長を有する。第一の発光タグからの第一の放出スペクトル1-105は、 λ_1 においてピーク放出波長を有し、第二の発光タグからの第二の放出スペクトル1-106も、 λ_1 においてピーク放出波長を有し、第三の発光タグからの第三の発光スペクトル1-107は λ_2 においてピーク放出波長を有し、第四の発光タグからの第四の放出スペクトル1-108も、 λ_2 においてピーク放出波長を有する。この実施形態に

において、4つの発光タグの放出ピークは、 $\lambda_1 < \lambda_2$ を満たす何れの適当な数値であってもよい。このような、ピーク放出波長が複数の発光タグについて同じである実施形態において、同じ放出波長を有するタグのスペクトル特徴は異なっていなければならない。例えば、 λ_1 において放出する2つのタグは、異なる放出寿命を有していてもよい。図1-3Aは、この状況を、放出波長及び放出寿命により画定される位相空間で概略的に示している。第一のタグは放出波長 λ_1 と放出寿命 τ_1 とを有し、第二のタグは放出波長 λ_1 と放出寿命 τ_4 とを有し、第三のタグは放出波長 λ_2 と放出寿命 τ_1 とを有し、第四のタグは放出波長 λ_2 と放出寿命 τ_4 とを有する。このようにして、図1-3Aに示されるタグの4つのタグは全て、相互に区別可能である。このようなタグ集合を使用することにより、4つの染料に関する吸収波長が同じであったとしても、4つのタグ間を区別できる。これは、放出波長の他に、フォトルミネッセンスの放出時間を検出できるセンサを使用して可能となる。

10

【0045】

例えば、限定ではないが、図1-2Cは、他の実施形態による4つの発光タグからの吸収スペクトルを示す。この実施形態において、タグの2つは第一のピーク吸収波長を有し、他の2つのタグは第二のピーク吸収波長を有する。第一の発光タグに関する第一の吸収スペクトル1-109は λ_3 においてピーク吸収波長を有し、第二の発光タグに関する第二の吸収スペクトル1-110は λ_4 においてピーク吸収波長を有し、第三の発光タグに関する第三の吸収スペクトル1-111は λ_3 においてピーク吸収波長を有し、第四の発光タグに関する第四の吸収スペクトル1-112は λ_4 においてピーク吸収波長を有する。図1-2Cにおいてピーク吸収波長を共有するタグは、別のタグ特徴、例えば放出寿命等により区別可能である点に留意されたい。図1-3Bは、この状況を、吸収波長及び放出寿命により画定される位相空間内で概略的に示している。第一のタグは吸収波長 λ_3 と放出寿命 τ_1 とを有し、第二のタグは吸収波長 λ_3 と放出寿命 τ_4 とを有し、第三のタグは吸収波長 λ_4 と放出寿命 τ_1 とを有し、第四のタグは吸収波長 λ_4 と放出寿命 τ_4 とを有する。このようにして、図1-3Aに示されるタグ集合の4つの全てのタグは相互に区別可能である。

20

【0046】

このようなタグ集合を使用することによって、4つの染料の放出波長が区別不能であったとしても、4つのタグ間の区別が可能である。これは、異なる波長を放出する2つの励起源又は複数の波長で放出可能な単独の励起源を、フォトルミネッセンスの放出時間を検出できるセンサと共に使用することにより可能である。励起光の波長が検出される放出イベントごとにわかっているならば、何れのタグが存在するかを判断できる。励起源は、第一の励起波長と第二の励起波長とで交互に切り換えられてもよく、これはインタリーブと呼ばれる。あるいは、第一の励起波長の2つ以上のパルス、第二の励起波長の2つ以上のパルスの後に使用してもよい。

30

【0047】

タグを区別するために使用される励起源又は励起波長の数は2つに限定されず、いくつかの実施形態において、3つ以上の励起波長又はエネルギーがタグを区別するために使用されてもよい。このような実施形態において、タグは、複数の励起波長にตอบสนองして放出される光子の強度又は数により区別されてもよい。タグは、タグを特定の励起波長にさらしたことにตอบสนองして放出された光子の量を検出することによって、複数のタグのなかから区別されてもよい。いくつかの実施形態において、タグは、タグが最大数の光子を放出した励起エネルギーを、複数の励起エネルギーのなかから識別することによって区別されてもよい。他の実施形態において、異なる励起エネルギーにตอบสนองしてタグから放出される光子の量がタグの識別に使用されてもよい。第二の励起エネルギーより第一の励起エネルギーにตอบสนองして光子を発生する確率の方が高い第一のタグは、第一の励起エネルギーより第二の励起エネルギーにตอบสนองして光子を放出する確率の方が高い第二のタグから区別されてもよい。このようにして、異なる励起エネルギーにตอบสนองして特定の量の光子を放出する確率が区別可能なタグは、未知のタグを異なる励起エネルギーにさらしながら、放出される光

40

50

子を測定することによって識別されてもよい。このような実施形態において、タグは複数の励起エネルギーにさらされてもよく、タグの識別は、そのタグが何れかの光を放出したか否か、及び／又は放出された光の量を判定することによって実現されてもよい。何れの適当な数の励起エネルギー源が使用されてもよい。いくつかの実施形態において、4つの異なる励起エネルギーが異なるタグ（例えば、4つの異なるタグ）を区別するために使用されてもよい。いくつかの実施形態において、3つの異なる励起エネルギーが異なるタグを区別するために使用されてもよい。異なる励起エネルギーに応答して放出される光子の量と共に、タグの他の特徴がタグの存在を区別するために使用されてもよく、これには放出寿命と放出スペクトルとが含まれる。

【0048】

10

他の実施形態において、タグ集合内のタグの3つ以上の特徴がタグの存在を区別するために使用されてもよい。図1-4は、タグの吸収波長、放出波長、及び放出寿命により画定される例示的な位相空間を示している。図1-4において、8つの異なるタグが位相空間内で分散されている。8つのタグのうちの4つは、同じ放出波長を有し、異なる4つのタグは同じ吸収波長を有し、異なる4つのタグは同じ放出寿命を有する。しかしながら、タグの各々は、タグの3つ全ての特徴が考慮されたときに、他の個々のタグから区別可能である。実施形態は、タグの何れの数にも限定されない。この概念は、少なくともこれら3つのタグ特徴を使用して、相互に区別可能な何れの数のタグを含むことにも拡張できる。

【0049】

20

図中には示されていないが、他の実施形態は、吸収周波数のみに基づいて発光タグの識別を判定してもよい。このような実施形態は、励起光が、タグ集合内のタグの吸収スペクトルとマッチする特定の波長に調整できれば可能である。このような実施形態において、各タグにより放出される光を誘導し、検出するために使用される光学システムセンサは、放出光の波長を検出できなくてもよい。これは、いくつかの実施形態において、そのような実施形態では放出波長の検出が不要であることから、光学システムとセンサとが単純化するため、有利であり得る。

【0050】

上述のように、本発明者らは、異なる発光タグを、タグの様々な特徴を使用して相互に区別できる必要性を認識し、理解した。タグの識別を判定するために使用される特徴の種類は、この解析を実行するために使用される物理的装置に影響を与える。本願は、このような異なる実験を実行するための装置、デバイス、機器、及び方法のいくつかの実施形態を開示する。

30

【0051】

簡単に言えば、本発明者らは、複数の個別の分子又は粒子を並列して検出できる、比較的多数のピクセル（例えば、数百、数千、数百万、又はそれを超える）を有するピクセル化されたセンサ装置を認識し、認めた。このような単一分子は、タグを有するヌクレオチド又はアミノ酸であってもよい。タグは、単一分子に結合されている間に、又は単一分子から離れるときに、又は単一分子に結合されている間及びそれから離れるときに検出されてもよい。いくつかの例において、タグは発光タグである。分子は、例えば、これらに限定されないが、タンパク質及び／又は核酸（例えば、DNA、RNA）であってもよい。さらに、1秒に100フレーム超でデータを取得できる高速装置によって、解析中の検体内で時間と共に発生する力学的プロセス又は変化の検出及び解析が可能となる。

40

【0052】

本発明者らは、生物検体から放出される光信号（例えば、発光）を測定するための励起光源と、光学系と、光センサとを含む機器に関連して安価な使い捨てのアッセイチップを使用してもよいことを認識し、そのように理解した。安価なアッセイチップを使用することにより、同じバイオアッセイでも、実行費用が削減される。生物検体をアッセイチップに取り付け、1回のバイオアッセイが完了したら廃棄してもよい。いくつかの実施形態において、複数の検体をアッセイチップの異なる部分に同時にセットすることにより、複数

50

の種類の検体を同時に並列的に解析してもよい。アッセイチップが、より高価な何度も使用される機器にインタフェースし、これは、多くの異なる使い捨てアッセイチップと共に繰返し使用されてもよい。小型のポータブル機器とインタフェースする安価なアッセイチップは、世界の何れの間所でも使用でき、検体の解析に研究室の専門知識を必要とするコスト高の生物研究室の制約を受けない。そのため、自動生物解析が、世界におけるこれまで生物検体の定量解析を実行できなかった領域にもたらされる。例えば、乳児の血液試験は、使い捨てアッセイチップ上に血液検体を載せ、使い捨てアッセイチップを小型のポータブル解析機器にセットし、結果をその機器に接続されたコンピュータで処理して、使用者が即時検討できるようにすることにより実行されてもよい。このデータはまた、データネットワークを通じて遠隔地に送信され、解析され、及び／又は後の臨床解析のために保存されてもよい。あるいは、機器は、機器のセンサから得られたデータを解析するための1つ又は複数のプロセッサを含んでいてもよい。

10

【0053】

各種の実施形態を以下により詳しく説明する。

1. いくつかの実施形態による装置の概要

装置2-100の概略が図2-1に示されている。システムは、アッセイチップ2-110と、励起源2-121と少なくとも1つのセンサ2-122を含む機器2-120との両方を含む。アッセイチップ2-110は、何れかの適当なアッセイチップインタフェースを使用して機器2-120とインタフェースする。例えば、機器2-120のアッセイチップインタフェースは、アッセイチップ2-110を受け、それを励起光源2-110及び少なくとも1つのセンサ2-122と正確に光学的に整列された状態に保持するソケット（図示せず）を含んでいてもよい。機器2-120の外部励起源2-121は、アッセイチップ2-110の検体ウェル2-111内の検体を励起する目的のために、アッセイチップ2-110に励起エネルギーを供給するように構成されている。いくつかの実施形態において、アッセイチップ2-110は、複数のピクセルを有し、各ピクセルの検体ウェル2-111は、他のピクセルとは独立して、解析中に使用される検体を受けるように構成される。アッセイチップ2-110の各ピクセルは、解析される試料からの検体を受け、保持し、解析するための検体ウェル2-211を含む。このようなピクセルは「パッシブソースピクセル」と呼ぶことができ、これは、ピクセルがピクセルから離れた励起源から励起エネルギーを受け取るからである。いくつかの実施形態において、機器2-120内に、アッセイチップ2-110の上に存在する各ピクセルに対応するピクセルがある。機器2-120の各ピクセルは、検体が励起源2-121からの励起エネルギーで照明されたことに応答して検体が放出する放出エネルギーを検出するための少なくとも1つのセンサを含む。いくつかの実施形態において、各センサは複数のサブセンサを含んでいてもよく、各サブセンサは、検体からの放出エネルギーの異なる波長を検出するように構成される。複数のサブセンサが特定の波長の放出エネルギーを検出できるが、各サブセンサは放出エネルギーの異なる波長バンドを検出してよい。

20

30

【0054】

いくつかの実施形態において、励起源2-121から励起エネルギーを検体ウェル2-111に案内し、結合するための光学要素が、アッセイチップ2-110と機器2-120との両方にあり、これらは図2-1において矢印2-101で示される。このような励起源-ウェル要素は、励起エネルギーをアッセイチップ2-110に結合するための、機器2-120上にあるミラー、レンズ、誘電コーティング及びビームコンバイナと、機器2-120から受け取った励起エネルギーを検体ウェル2-111に誘導するための、アッセイチップ2-110上のレンズ、プラズモン要素、及び誘電コーティングとを含んでいてもよい。それに加えて、いくつかの実施形態において、放出エネルギーを検体ウェル2-111からセンサ2-122に案内するための光学要素がアッセイチップ2-110と機器2-120とにあり、これらは図2-1において矢印2-102で示される。このようなウェル-検体要素は、放出エネルギーをアッセイチップ2-110から機器2-120に誘導するための、アッセイチップ2-110上にあるレンズ、プラズモン要素、及

40

50

び誘電コーティングと、アッセイチップ2-110から受け取った放出エネルギーをセンサ2-111に誘導するための、機器2-120上のレンズ、ミラー、誘電コーティング、フィルタ、及び回折光学系とを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、単独の構成要素が、励起エネルギーを検体ウェルに結合し、放出エネルギーを検体ウェルからセンサに供給することの両方において役割を果たしてもよい。

【0055】

いくつかの実施形態において、アッセイチップ2-110は複数のピクセルを含み、各ピクセルはそれ自体個別の検体ウェル2-111と、機器2-120上のそれ自体の関連するセンサ2-122とに関連付けられる。複数のピクセルはアレイ状に配置されてもよく、何れの適当な数のピクセルを有していてもよい。例えば、アッセイチップは、約1, 000ピクセル、10, 000ピクセル、約100, 000ピクセル、約1, 000, 000ピクセル、約10, 000, 000ピクセル、又は約100, 000, 000ピクセルを含んでいてもよい。

10

【0056】

いくつかの実施形態において、機器2-120は、複数のピクセルとして配置された複数のセンサ2-122を含むセンサチップを含む。センサチップの各ピクセルは、アッセイチップ2-110のピクセルに対応する。複数のピクセルはアレイ状に配置されてもよく、何れの適当な数のピクセルを有していてもよい。いくつかの実施形態において、センサチップはアッセイチップ2-110と同数のピクセルを有する。例えば、センサチップは、約10, 000ピクセル、約100, 000ピクセル、約1, 000, 000ピクセル、約10, 000, 000ピクセル、又は約100, 000, 000ピクセルを含んでいてもよい。

20

【0057】

機器2-120は、アッセイチップインタフェース（図示せず）を通じてアッセイチップ2-110とインタフェースする。アッセイチップインタフェースは、アッセイチップ2-110を機器2-120に位置付け、及び／又は整列させて、励起源2-121からアッセイチップ2-110への励起エネルギーの結合を改善する構成要素を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、励起源2-121は複数の励起源を含み、これらが結合されて、励起エネルギーをアッセイチップ2-110に供給する。複数の励起源は、異なる波長の光に対応する複数の励起エネルギーを生成するように構成されていてもよい。

30

【0058】

機器2-120は、機器の動作を制御するためのユーザインタフェース2-125を含む。ユーザインタフェース2-125は、使用者が、機器の機能を制御するために使用されるコマンド及び／又は設定等の情報を機器に入力できるように構成される。いくつかの実施形態において、ユーザインタフェース2-125は、ボタン、スイッチ、ダイヤル、及び音声コマンドのためのマイクロフォンを含んでいてもよい。それに加えて、ユーザインタフェース2-125により、使用者は機器及び／又はアッセイチップの性能に関するフィードバック、例えばセンサチップ上のセンサからのリード信号により得られる適正なアラインメント及び／又は情報を受け取ることができる。いくつかの実施形態において、ユーザインタフェース2-125は、可聴的フィードバックを提供するためのスピーカ、及び視覚的フィードバックを提供するためのインディケータランプ及び／又は表示スクリーンを使用してフィードバックを提供する。いくつかの実施形態において、機器2-120は、コンピューティングデバイス2-130と接続するために使用されるコンピュータインタフェース2-124を含む。何れの適当なコンピュータインタフェース2-124及びコンピューティングデバイス2-130が使用されてもよい。例えば、コンピュータインタフェース2-124は、USBインタフェース又はファイヤワイヤインタフェースであってもよい。コンピューティングデバイス2-130は、例えばラップトップ、デスクトップ、又はタブレットコンピュータ等の何れの汎用コンピュータであっても、携帯電話等のモバイルデバイスであってもよい。コンピュータインタフェース2-124により

40

50

、機器 2-120 とコンピューティングデバイス 2-130 との間の情報通信が容易となる。機器 2-120 の制御及び／又は校正のための入力情報は、機器のコンピュータインタフェース 2-124 に接続されたコンピューティングデバイス 2-130 を通じて提供されてもよい。それに加えて、出力情報は、コンピュータインタフェース 2-124 を通じてコンピューティングデバイス 2-130 により受け取られてもよい。このような出力情報は、機器 2-120 の性能に関するフィードバックと、センサ 2-122 のリード信号からの情報とを含んでいてもよい。機器 2-120 はまた、センサ 2-122 から受信したデータを解析するための処理装置 2-123 も含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、処理装置 2-123 は、汎用プロセッサ（例えば、中央処理ユニット（CPU：central processing unit）、フィールドプログラマブルゲートアレイ（FPGA：field programmable gate array）、又は特定用途集積回路（ASIC：application specific integrated circuit）等のカスタム集積回路であってもよい。いくつかの実施形態において、センサ 1-122 からのデータ処理は、処理装置 2-123 及び外部コンピューティングデバイス 2-130 の両方により実行されてもよい。他の実施形態において、コンピューティングデバイス 2-130 は省略されてもよく、センサ 2-122 からのデータの処理は、処理装置 2-123 のみによって実行されてもよい。

【0059】

励起源 2-121 がアッセイチップ 2-110 を励起エネルギーで照明すると、アッセイチップ 2-110 の 1 つ又は複数のピクセル内の検体が励起され得る。いくつかの実施形態において、試料は複数のマーカで標識され、複数のマーカの各々は試料内の異なる検体に関連付けられ、放出エネルギーにより識別可能である。検体ウェル 2-111 からセンサ 2-122 までの通路は、放出エネルギーに基づく複数のマーカの識別を支援する 1 つ又は複数の構成要素を含んでいてもよい。構成要素は、放出エネルギーをセンサ 2-122 に集光させてもよく、それに加えて、又はその代わりに、異なる特徴的エネルギーと、したがって異なる波長を有する放出エネルギーとを空間的に分離してもよい。いくつかの実施形態において、アッセイチップ 2-110 は、放出エネルギーをセンサ 2-122 へと誘導する構成要素を含んでいてもよく、機器 2-120 は、異なる波長の放出エネルギーを空間的に分離するための構成要素を含んでいてもよい。例えば、光学フィルタ又は回折光学系が、放出エネルギーの波長を空間自由度に結合するために使用されてもよい。センサ又はセンサ領域は、放射パターンに依存する放出エネルギーの空間的分布を検出するように構成された複数のサブセンサを含んでいてもよい。異なる放出エネルギー及び／又はスペクトル範囲を放出する発光タグは、異なる放出パターンを形成し得る。センサ又はセンサ領域は、放出エネルギーの空間的分布に関する情報を検出してもよく、これは複数のマーカのなかのマーカを識別するために使用できる。

【0060】

検体ウェル 2-110 内の検体からの放出エネルギーは、センサ 2-122 により検出され、少なくとも 1 つの電気信号に変換されてもよい。電気信号は、機器 2-120 の回路内の導電線に沿って送信され、処理装置 2-123 及び／又はコンピューティングデバイス 2-130 により処理され、及び／又は解析されてもよい。

【0061】

図 2-2 は、アッセイチップ 2-110 の上面図及びセンサチップ 2-260 の上面図であり、2 つのチップのピクセル間の対応を示している。アッセイチップ 2-110 は、複数のピクセルを含み、各ピクセルは、層 2-221 内に形成された検体ウェル 2-111 を含む。層 2-221 は導電材料を含み、これには金属、縮退的高ドープ半導体、及びグラフェンが含まれる。いくつかの実施形態において、層 2-221 は、1 つ又は複数の異なる種類の材料（例えば、金属、半導体、誘電体、絶縁体）から形成される複数の層を含んでいてもよい。センサチップ 2-260 はまた、複数のピクセルを含み、各ピクセルは基板 2-247 内又はその表面に形成されたセンサ 2-121 を含む。図 2-2 の矢印は、アッセイチップ 2-110 のピクセルの 2 つとセンサチップ 2-260 のピクセルの

10

20

30

40

50

2つとの対応を示している。明瞭化のために図示されていないが、アッセイチップ2-110の各ピクセルは、センサチップ2-260の1つのピクセルに関連付けられる。

【0062】

アッセイチップ2-110及びセンサチップ2-260のピクセルは、何れの適当な大きさ、形状、及び配置を有していてもよい。いくつかの実施形態において、アッセイチップ2-100及びセンサチップ2-260のピクセルは、図2-2に示されるように、長方形又は正方形の構成に配置されてもよい。

【0063】

アッセイチップ2-110の1つのピクセル及びセンサチップ2-260の1つのピクセルに関連付けられるいくつかの構成要素の概要が図2-3に示されている。装置2-100は、アッセイチップ2-110と機器2-120との両方を含む。いくつかの実施形態において、アッセイチップ2-110は、1つの試料の解析のために設計された使い捨てチップである。アッセイチップ2-110は、1つ又は複数の金属層2-221と、1つ又は複数の誘電体層2-225と、集光要素2-227とを含む。いくつかの実施形態において、金属層2-221は層の積層体を含み、そのうちのいくつかは吸収層を含んでもよい。機器2-120は、1つ又は複数の励起源2-250と、少なくとも1つのポリクロイックミラー2-230と、フィルタ要素2-241、スペクトル選別要素2-243、集光要素2-245、及び基板2-247内又はその表面の少なくとも1つのセンサ2-122を含んでもよいセンサチップ2-260とを含む。図2-3は、アッセイチップ2-110の1つのピクセルのみとセンサチップ2-260の1つのピクセルのみとを示しているが、機器2-120内の励起源2-250、ポリクロイックミラー2-230、及びフィルタ要素2-241等のいくつかの構成要素は、複数のピクセルで共有されてもよい。例えば、いくつかの実施形態において、1つの励起源2-250とポリクロイックミラー2-230とは、励起エネルギーをアッセイチップ2-110の各ピクセルに誘導してもよい。

【0064】

金属層2-221内の検体ウェル2-211は、試料からの検体が入るための検体空間を形成する。いくつかの実施形態において、試料は、血液、尿、又は唾液等の体液を含んでもよい。検体ウェル2-211の端の開口部は、ナノアパーチャと呼ばれてもよい。ナノアパーチャの幅は、励起源2-250により放出される励起エネルギー2-251の波長より小さくてもよい。試料の一部は検体と呼ばれ、検体ウェル2-211により画定される検体空間に入ってもよい。検体は、何れの粒子、分子、タンパク質、遺伝子材料、又は試料中に存在する他の何れの検体であってもよい。

【0065】

励起源2-250は励起エネルギー2-251を放出し、これは検体ウェル2-211に向かって誘導され、検体を照明する。いくつかの実施形態において、励起源2-251は、アッセイチップ2-110の全ピクセルのための励起エネルギーを提供する1つの光源であってもよい。ポリクロイックミラー2-230は、励起源2-250からの光を反射し、励起エネルギー2-251をアッセイチップ2-110の1つ又は複数の検体ウェル2-211に向かって誘導する。そのため、いくつかの実施形態において、ポリクロイックミラー2-230は1つのみでよく、これが励起エネルギーを、それ自体のポリクロイックミラーに関連付けられる各ピクセルではなく、全ての検体ウェルに向けて誘導する。同様に、励起エネルギーを検体ウェル2-211に誘導するために使用される他の光学要素間で1対多の関係があってもよい。

【0066】

同心円回折格子2-223が、検体ウェル2-211の下側ナノアパーチャに隣接して形成されてもよい。同心円回折格子2-223は、金属層2-221の底面から突出してもよい。検体ウェル2-211は、円形回折格子2-223の中心に、又はその付近に位置付けられてもよい。検体ウェル2-211のナノアパーチャのサブ波長スケールと同心円回折格子2-223との両方が場増強効果を生み、これが検体ウェル2-211内の励

10

20

30

40

50

起エネルギーの強度を増強させ、その結果、励起エネルギーと検体ウェル 2-211 内にある検体との結合が増加する。時間の少なくとも一部において、検体は励起エネルギーから光子を吸収し、励起エネルギー 2-251 のそれより低いエネルギーを有する光子（「放出エネルギー」 2-253 と呼ぶ）を放出する。放出エネルギー 2-253 は、下方向に放出されてもよい。円形回折格子 2-223 は、プラズモン要素として機能し、これは放出エネルギー 2-253 の広がりを縮小し、放出エネルギー 2-253 を関連するセンサへと誘導するために使用されてもよい。

【0067】

放出エネルギー 2-253 は、誘電体層 2-225 を通って移動し、これは放出エネルギー 2-253 がある程度の距離にわたり伝播できるようにするために使用されるスペーサ層であってもよい。誘電体層 2-225 はまた、アッセイチップ 2-110 に構造的強度を提供してもよい。したがって、放出エネルギー 2-253 は、1 つ又は複数の集光要素 2-227 を通って移動し、これは放出エネルギー 2-253 を、機器 2-120 内のセンサチップ 2-2260 の関連するピクセル内のセンサ 2-122 へとさらに誘導するために使用される。

10

【0068】

ポリクロイックミラー 2-230 は、放出エネルギー 2-253 を透過させ、及び／又はアッセイチップ 2-110 から反射された励起エネルギー 2-251 の一部を反射してもよい。励起光のうちのアッセイチップ 2-110 により反射されなかった部分は、アッセイチップを透過するか、又はアッセイチップにより吸収される。アッセイチップ 2-110 により反射され、ポリクロイックミラー 2-230 により反射されない励起エネルギー 2-251 の量をさらに減らすために、フィルタ要素 2-241 はセンサチップ 2-260 に向かう光路内に配置されてもよい。フィルタ構成要素 2-241 が、センサ 2-122 により検出された励起エネルギー 2-251 を減少させる機能を果たしてもよい。フィルタ要素 2-241 は、例えば、これに限定されないが、ブロードバンドフィルタ、ノッチフィルタ、又はエッジフィルタを含んでいてもよく、これらは放出エネルギー 2-253 を透過させ、及び／又は励起エネルギー 2-251 を反射する。

20

【0069】

いくつかの実施形態において、放出エネルギー 2-253 のスペクトル特性を使用して検体ウェル 2-211 のマーカの識別を判定しやすくするために、スペクトル選別要素 2-243 がセンサチップ 2-260 に含められて、放出エネルギー 2-253 のスペクトル自由度を放出エネルギー 2-253 の移動方向に結合させてもよい。例えば、回折光学要素は、第一の波長の放出エネルギー 2-253 を第一の方向に、第二の波長の放出エネルギー 2-253 を第二の方向に誘導するために使用されてもよい。1 つ又は複数の集光要素 2-245 は、スペクトル選別された光をセンサ 2-122 に誘導するために使用されてもよい。センサ 2-122 は、1 つ又は複数のサブセンサ（図示せず）を含んでいてもよく、その各々は、スペクトル選別要素 2-243 による異なる波長の光の方向転換に基づいて、放出エネルギー 2-253 の異なる波長に関連付けられる。このようにして、1 つ又は複数の集光要素 2-245 は、異なる特徴的波長を有する放出エネルギーについて異なる分布パターンを形成してもよく、これによって、放出エネルギーの特徴的波長に基づいてマーカの識別が可能となり得る。

30

40

【0070】

放出エネルギー 2-253 の寿命が検体ウェル 2-211 内のマーカの識別を判定するために使用される実施形態において、センサ 2-122 は、放出エネルギーの光子がセンサ 2-122 によっていつ吸収されたかを検出できてもよい。センサ 2-122 は、例えば、複数のタイムビンに検出された光子を選別できる CMOS 装置であってもよい。寿命は、複数の励起パルスから生じる複数の放出エネルギーの光子を検出することによって判定されてもよい。

【0071】

図 2-3 の上述の説明は、いくつかの実施形態による装置のいくつかの、ただし必ずし

50

も全部ではない構成要素の概要である。いくつかの実施形態において、図 2-3 の 1 つ又は複数の要素はなくても、又は別の場所にあってもよい。アッセイチップ 2-210 及び機器 2-220 の構成要素について、以下により詳しく説明する。

【0072】

アッセイチップ 2-110 と機器 2-120 とは、機械的に整列され、取外可能に連結され、相互から分離可能である。機器 2-120 は機器筐体を含んでもよく、その中に取付盤が配置される。図 2-4 は、機器 2-120 の取付盤 2-405 の上に含めることのできる構成要素の少なくともいくつかを示す。取付盤 2-405 は、プリント回路基板を含んでもよく、その上に取り付けられたセンサチップ 2-260（図 2-4 では見えない）と、ヒートシンク 2-407 と、光学筐体 2-401 とを有していてもよい。機器 2-120 の様々な光学構成要素は光学筐体 2-401 内に配置されてもよい。いくつかの実施形態において、機器筐体と取付盤は、何れの適当な大きさ及び形状を有していてもよい。例えば、取付盤は実質的に、直径が約 17.78~20.32 cm（約 7~8"）の円形であってもよい。アッセイチップ 2-110 は光学筐体 2-401 に連結されて、光学筐体 2-401 内の光学構成要素と確実に整列される。

10

【0073】

チップホルダフレーム 3-102 は、光学筐体 2-401 の開口部と整列されてもよい。アッセイチップ 2-110 は、チップホルダフレーム 2-401 内に格納されてもよい。いくつかの実施形態において、アッセイチップ 2-110 は、チップホルダフレーム 3-102 の下面に位置付けられてもよく、それによってチップホルダフレーム 3-102 を機器 2-120 に関して位置決めすることにより、アッセイチップ 2-110 はチップホルダフレーム 3-102 の、機器 2-120 に近い面に位置付けられる。チップホルダフレーム 3-102 は何れの適当な材料を含んでもよい。いくつかの実施形態において、チップホルダフレーム 3-102 は強磁性金属（例えば鋼鉄）を含んでもよく、それによってチップホルダフレーム 3-102 は、光学筐体 2-401 の表面上に位置付けられた、チップホルダフレーム 3-102 を所定の位置に保持する役割を果たす 1 つ又は複数の磁性構成要素によって光学筐体 2-401 の開口部と整列されてもよい。

20

【0074】

いくつかの実施形態において、アッセイチップ 2-110 は、機器 2-120 に取外可能に連結されてもよい。図 2-4 において示されるような、磁気シリンダ等、何れの適当な形状及び大きさの 1 つ又は複数の磁気構成要素 2-403a、2-403b、及び 2-403c が光学筐体 3-401 の開口部の周囲に設置されてもよく、それを通じて励起エネルギーが光学筐体 2-401 から出る。それに加えて、磁気構成要素 2-403a、2-403b、及び 2-2-403c は、チップホルダフレーム 3-102 が開口部と整列された状態に保持されるように校正されてもよい。チップホルダフレーム 3-102 は、磁気構成要素 2-403a、2-403b、及び 2-2-403c を使用してマイクロメートルレベル精度で位置決めされてもよい。いくつかの実施形態において、磁気構成要素 2-403a、2-403b、及び 2-2-403c は、チップホルダフレームを整列させるために使用される。しかしながら、実施形態はそのように限定されず、何れの適当な数の磁気、ばね式、空気圧式、又はその他のこのような構成要素が、チップを整列状態の所定の位置に保持するために使用されてもよい。例えば、チップホルダフレーム 3-102 は、ばね、空気圧、又は真空からの吸引等、非磁気要素で所定の位置に保持されてもよい。任意選択により、チップホルダフレーム 3-102 は、チップを光学ブロックと整列させて位置決めするのに適した何れの硬質材料を使用して構成されてもよい。

30

40

【0075】

本願のいくつかの態様によれば、アッセイチップ 2-110 が機器 2-120 に接続されているとき、アッセイチップ 2-110 の検体ウェルと機器 2-120 のセンサチップ 2-260 のセンサとの間の距離は、システムにとって十分なレベルの性能を達成するための所望の距離内にあってもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルとセンサとの間の光学的距離は 30 cm 未満、10 cm 未満、5 cm 未満又は 1 cm 未満であっても

50

よい。

11. アッセイチップ

いくつかの実施形態において、アッセイチップ2-110は、何れの能動的電子構成要素を含まなくてもよい。各ピクセルのための励起源2-250とセンサ2-122とは何れもチップの外の機器2-120に位置付けられてもよい。

【0076】

いくつかの実施形態において、アッセイチップ2-110は、図3-1Aに示されるように、チップホルダフレーム3-102に格納されてもよい。チップホルダフレーム3-102は、使い捨てであってもよく、1回使用した後にアッセイチップ2-110と共に処分されてもよい。アッセイチップ2-110は、図3-1Bに示されるように、チップホルダフレーム3-102の下側に位置付けられてもよい。チップホルダフレーム3-102は何れの適当な強磁性金属、例えば鋼鉄を含んでいてもよく、それによって、光学筐体2-401に固定された磁気構成要素2-403a、2-403b、及び2-403cはチップホルダフレーム3-102と、したがってアッセイチップ2-110とを所定の位置に保持する。いくつかの実施形態において、チップホルダフレーム3-102は、図2-4に示されるように、光学筐体2-401の上面に取り付けられてもよい。

【0077】

図3-1Cに示される他の実施形態において、アッセイチップ2-110は、チップホルダフレーム3-102の上面に取り付けられてもよい。プラスチックキャップ3-103がアッセイチップ2-110を取り囲み、アッセイチップ2-110のピクセルアレイは、プラスチックキャップ3-103の開口部を介して露出する。アッセイチップ2-110の使用者は、試料をプラスチックキャップ3-103の開口部にセットしてもよい。試料中の検体は、アッセイチップ2-110の上面と接触することによって、解析のために、アッセイチップ2-110の複数のピクセルの1つ又は複数内に導入されてもよい。いくつかの実施形態において、検体の一部を、強制的な流体流を介してピクセルに供給するための流体用通路又は装置は不要である。

【0078】

いくつかの実施形態において、アッセイチップは、縦に積み重ねられた構成要素の層を含んでいてもよい。これらの構成要素は、光、電気、化学、生化学、及び構造的要素を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、アッセイチップの各層は、各ピクセルについて同じである。以下に、1つのピクセルについて説明するが、いくつかの実施形態により、アッセイチップ上のピクセルアレイ内の個々のピクセルが全く同じレイアウトを有していてもよい。

A. 検体ウェル層

図2-3に示され、図3-2においてさらに詳しく示されるように、いくつかの実施形態はアッセイチップ2-110の1つ又は複数のピクセルに形成された検体ウェル2-211を含む。検体ウェルは、金属層2-221内に形成され、アッセイチップ2-110の表面に載せられた試料から検体が検体ウェル内に、及びそれから拡散するように配置された小さい空間又は領域を含んでいてもよい。各種の実施形態において、検体ウェル2-211は、励起源2-250から励起エネルギーを受け取るように配置されてもよい。検体ウェル内に拡散する検体は、接着剤3-211によって検体ウェルの励起領域3-215内に一時的又は永久に保持されてもよい。励起領域において、検体は、励起エネルギー（例えば、励起光3-245）により励起され、その後、エネルギーを放出してもよく、これを観察し、評価して、検体を特徴付けることができる。

【0079】

さらに詳しい動作において、解析される少なくとも1つの検体3-101は検体ウェル2-211内に、例えば検体の懸濁液を収容した試料（図示せず）から導入されてもよい。機器2-120内の励起源2-250からの励起エネルギー3-245は、検体、又は検体に取り付けられるかもしくは検体にその他の方法が関連付けられる少なくとも1つのタグ（生物マーカ、レポータ、又はプローブとも呼ばれる）を、それが検体ウェル内の励

起領域 3-215 にあるときに励起してもよい。いくつかの実施形態によれば、タグは、発光分子（例えば、発光タグ又はプローブ）又は量子ドットであってもよい。いくつかの実施形態において、検体を解析するために使用される複数のタグがあってもよい（例えば、参照によって本願に援用される J. エイド（J. Eid）ら著、「単一ポリメラーゼ分子からのリアルタイム DNA 配列解析（Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules）」、サイエンス（Science）、第 323 巻、p. 133（2009 年）に記載されているような単一分子遺伝子配列解析に使用される異なるタグ）。励起中及び／又は励起後、検体又はタグは放出エネルギーを放出し得る。複数のタグが使用される場合、これらは異なる特徴的エネルギーで（及びそのため異なる波長を有する）放出し、及び／又は異なる時間特徴で放出してもよい。いくつかの実装形態において、放出エネルギーは、何れの数の波長、例えば 2、3、4、5、6、7、又は 8 つの異なる波長を含んでいてもよい。検体ウェル 2-211 からの放出は、機器 2-120 上のセンサ 2-122 に照射されてもよく、そこでこれらが検出され、電気信号に変換され、それを使用して検体を特徴付けることができる。

10

【0080】

いくつかの実施形態によれば、検体ウェル 2-211 は、図 3-2 に示されるように部分的に取り囲まれた構造であってもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェル 2-211 は、少なくとも 1 つの材料層 2-221 内に形成されたマイクロメートル未満の大きさの穴又は開口部（少なくとも 1 つの横方向の寸法 D_{sw} により特徴付けられる）を含む。検体ウェルの横方向の寸法は、いくつかの実施形態によれば、約 20 ナノメートル～約 1 マイクロメートルであってもよいが、いくつかの実施形態においては、これより大きい又は小さいサイズを使用してもよい。検体ウェル 2-211 の容積は、いくつかの実装形態において、約 10^{-21} リットル～約 10^{-15} リットルであってもよい。検体ウェルは導波路として形成されてもよく、これは伝播モードをサポートしてもしなくてもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェルは、直径（又は最大の横断方向の寸法） D_{sw} の円筒形（又はこれと同様の形状）を有するゼロモード導波路（ZMW）として形成されてもよい。ZMW は、単独の金属層内に、ナノスケールの穴として形成されてもよく、これは穴を通じた光伝播モードをサポートしない。

20

【0081】

検体ウェル 2-211 の容積が小さいため、各ピクセルでの単一検体イベント（例えば、単一分子イベント）の検出は、検体が検査対象の試料中で、自然の環境で見られるものと同様の濃度に濃縮されたとしても可能であり得る。例えば、アッセイチップと接触するように置かれた試料内にマイクロモル濃度の検体が存在し得るが、ピクセルレベルのみに関する。アッセイ 2-110 の検体ウェルは、統計的に、それらが検体を含まないか、1 つの検体を含む可能性が最も高く、単一分子解析が実行され得るような大きさである。例えば、いくつかの実施形態において、検体ウェルの 30～40% が単一の検体を含む。しかしながら、検体ウェルには複数の検体が含まれていてもよい。各ピクセルで単一分子又は単一検体イベントが解析されてもよいため、アッセイチップにより、本来であればアンサンブル平均された測定では認識されないことがあり得る稀なイベントを検出することが可能となる。

30

40

【0082】

検体ウェルの横断方向の寸法 D_{sw} は、いくつかの実施形態において、約 500 ナノメートル（nm）～約 1 マイクロメートル、いくつかの実施形態において約 250 nm～約 500 nm、いくつかの実施形態において約 100 nm～約 250 nm、さらに、いくつかの実施形態において約 20 nm～約 100 nm であってもよい。検体ウェルの横断方向の寸法は、約 100 nm、約 130 nm、又は約 190 nm であってもよい。いくつかの実装形態によれば、検体ウェルの横断方向の寸法は、約 80 nm～約 180 nm、又は励起波長もしくは放出波長の約 4 分の 1～8 分の 1 である。他の実装形態によれば、検体ウェルの横断方向の寸法は、約 120 nm～約 170 nm である。いくつかの実施形態にお

50

いて、検体ウェル 2-211 の深さ及び高さは、約 50 nm～約 500 nm であってもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェル 2-211 の深さ又は高さは、約 80 nm～約 200 nm であってもよい。検体ウェル 2-211 を形成する材料の層 2-221 の厚さ、すなわち高さは、約 50 nm、約 100 nm、約 150 nm、約 200 nm、又は約 250 nm であってもよい。

【0083】

サブ波長の横断方向の寸法を有する検体ウェル 2-211 は、アッセイチップ 2-110 のピクセル 2-100 の動作を少なくとも 2 つの方法で改善できる。例えば、検体ウェルに試料の反対側から入射する励起エネルギー 3-245 は、パワーが指数関数的に減少しながら励起領域 3-215 に結合されてもよく、検体ウェルを通して試料中へと伝播しない。その結果、励起エネルギーは、それが関心対象の検体を励起する励起領域内で増大され、それが他の検体を励起し得る試料内で減少し、それは背景ノイズに寄与するであろう。また、ウェルの基部に保持される検体からの放出は、好ましくは、機器 2-120 のセンサに向かって誘導され、これは、放出が検体ウェルを通じて上方に伝播できないからである。これらの効果は何れもピクセルでの信号対ノイズ比を改善できる。本発明者らは、ピクセルにおける信号対ノイズレベルをさらに押し上げるように改善可能な検体ウェルのいくつかの態様を認識した。これらの態様は、ウェルの形状及び構造、ならびに励起エネルギーを検体ウェル及び検体ウェルからの放出エネルギーに結合するのを支援する、隣接する光学及びプラズモン構造に関する設置位置（後述する）に関係する。

【0084】

いくつかの実施形態によれば、検体ウェル 2-211 は、サブカットオフナノアパーチャ（SCN: sub-cut off nano-aperture）として形成されてもよく、これは伝播モードをサポートしない。例えば、検体ウェル 2-211 は、導電層 2-221 内の円筒形の穴又はボアを含んでもよい。検体ウェルの断面は丸である必要はなく、いくつかの実施形態において、楕円形、正方形、長方形、又は多角形であってもよい。励起エネルギー 3-245（例えば、可視又は近赤外放射）は、図 3-2 に示されているように、ウェルの第一の端において、検体ウェル 2-211 の壁 3-214 により画定され得る入口開口部 3-212 を通って検体ウェルに入ってもよい。SCN として形成された場合、励起エネルギー 3-245 は SCN に沿って指数関数的に減衰し得る。いくつかの実装形態において、導波路は、検体からの放出エネルギーのための SCN を含んでもよいが、励起エネルギーのための SCN でなくてもよい。例えば、検体ウェルにより形成される開口部と導波路は、励起エネルギーの伝播モードをサポートするのに十分な大きさであってもよく、これは、それが放出エネルギーをより短い波長であるからである。より長い波長での放出は、導波路内の伝播モードの他のカットオフ波長を超え得る。いくつかの実施形態において、検体ウェル 2-211 は、励起エネルギー 3-245 のための SCN を含んでもよく、それによって励起エネルギーの最大の強度が検体ウェル 2-211 の入口の検体ウェルの励起領域 3-215 に居所化される（例えば、図 3-2 に示されるように、層 3-235 と層 2-221 との間の界面付近に局所化される）。このような励起エネルギーの局所化は、検体からの放出エネルギー密度を増大させ、さらに、励起エネルギーを入口開口部 3-212 の付近に限定することができ、それによって観察された放出が単一検体に（例えば、単一分子）に限定される。

【0085】

SCN を含む検体ウェルの入口付近に局所化される励起の例が図 3-3 に示されている。数値シミュレーションを行って、SCN として形成された検体ウェル 2-211 内及びその付近の励起エネルギーの強度を判定した。その結果は、励起エネルギーの強度が検体ウェルの入口開口部において入射エネルギーの約 70 % であり、検体ウェルの約 100 nm 以内で入射強度の約 20 % まで低下することを示している。このシミュレーションに関して、励起エネルギーの特徴的波長は 633 nm であり、検体ウェル 2-211 の直径は 140 nm であった。検体ウェル 2-211 は、金の金属層内に形成された。グラフの各水平区間は 50 nm である。グラフにより示されるように、検体ウェルで受け取られた励

10

20

30

40

50

起エネルギーの半分超が検体ウェル 2-211 の入口開口部 3-212 から約 50 nm 以内に局所化される。

【0086】

検体ウェル 2-211 に局所化される励起エネルギーの強度を改善するために、本発明者らは他の検体ウェル構造を開発し、研究した。図 3-4 は、検体ウェル 2-211 の励起端において空洞又は窪み 3-216 を含む検体ウェルの実施形態を示している。図 3-3 のシミュレーション結果からわかるように、検体ウェルの入口開口部 2-212 の直前に、より高い励起強度の領域が存在する。いくつかの実施形態によれば、検体ウェル 2-211 に窪み 3-216 を追加することによって、検体はより励起強度の高い領域へと移動できる。いくつかの実装形態において、窪みの形状及び構造は、局所的な励起電場を変化させ（例えば、層 3-235 と検体ウェル内の試料流体との間の屈折率の違いによる）、さらに窪み内の励起エネルギーの強度を増大させることができる。

10

【0087】

窪みは、何れの適当な形状であってもよい。窪みは、検体ウェルの横断方向の形状と実質的に等しい横断方向の形状を有していてもよく、例えば円形、楕円形、正方形、長方形、多角形等である。いくつかの実施形態において、窪みの側壁は、検体ウェルの壁と同様に実質的に直線に縦方向であってもよい。いくつかの実装形態において、窪みの側壁は、図に示されているように傾斜及び／又は湾曲していてもよい。窪みの横断方向の寸法は、いくつかの実施形態において、検体ウェルの横断方向の寸法と略同じ大きさであってもよく、いくつかの実施形態において、検体ウェルの横断方向の寸法より小さくてもよく、あるいはいくつかの実施形態において、検体ウェルの横断方向の寸法より大きくてもよい。窪み 3-216 は、検体ウェルの金属層 2-221 の約 10 nm～約 200 nm だけ先まで延びていてもよい。いくつかの実装形態において、窪みは、検体ウェルの金属層 2-221 の約 50 nm～約 150 nm だけ先まで延びていてもよい。窪みを形成することによって、励起領域 3-215 は、図 3-4 に示されるように、検体ウェルの金属層 2-221 の外まで延びることができる。

20

【0088】

図 3-5 は、窪みを含む検体ウェルの励起領域における励起エネルギーの改善を示している（左側のシミュレーション画像に示される）。比較のために、窪みを有さない検体ウェルについての励起電場のシミュレーションも行い、それが右側に示されている。電場の大きさは、これらのプロットにおいてカラーレンダリングから変換され、窪みの底部における励起領域は、検体ウェル内の明るい領域より高い強度を表している。検体ウェルの上方の暗い領域は、最も低い強度を表す。これからわかるように、窪みによって、検体 3-101 はより高い励起強度の領域に移動でき、窪みはまた、検体ウェルの励起端における最も高い強度の領域の局所化を増大させる。高い強度の領域は、窪みを有さない検体ウェルに関してより分散されている点に留意されたい。いくつかの実施形態において、窪み 3-216 は、励起領域の励起エネルギーを 2 倍以上に増大させる。いくつかの実装形態において、2 倍超の増大は、窪みの形状と深さに応じて得ることができる。これらのシミュレーションにおいて、検体ウェルは、厚さ 100 nm の Al 層を含み、深さ 50 nm の窪みを有し、励起エネルギーの波長は 635 nm である。

30

40

【0089】

図 3-6 は、窪み 3-216 を含む検体ウェルが基板表面の突起 3-615 の上方に形成されている検体ウェル 2-211 の他の実施形態を示す。その結果として得られる検体ウェルの構造は、検体における励起エネルギーを、図 3-2 に示される検体ウェルと比較して 2 倍超だけ増大させることができ、検体ウェルからの放出を機器 2-120 のセンサに向かって誘導することができる。いくつかの実施形態によれば、突起 3-615 は、第一の材料層 3-610 にパターンニングされる。突起は、いくつかの実施形態において、円形の台又は断面が長方形の断面として形成されてもよく、第二の材料層 3-620 は、第一の層及び突起の上に堆積されてもよい。突起部分で、図のように、第二の層は突起の上方に、円筒形部分 3-625 に近似する形状を形成してもよい。いくつかの実装形態にお

50

いて、導電層 3-230（例えば、反射性金属）が第二の層 3-620 の上に堆積され、突起の上方の導電層内に検体ウェル 3-210 を形成するようにパターンニングされてもよい。窪みは、導電層 3-230 の約 50 nm～約 150 nm だけ下まで延びていてもよい。いくつかの実施形態によれば、第一の層 3-610 及び第二の層 3-620 は、任意選択により、透明であってもよく、同じ材料で形成されてもされなくてもよい。いくつかの実装形態において、第一の層 3-610 は、酸化物（例えば、 SiO_2 ）又は窒化物（例えば、 Si_3N_4 ）から形成されてもよく、第二の層 3-620 は、酸化物又は窒化物から形成されてもよい。

【0090】

いくつかの実施形態によれば、突起 3-625 の上方の導電層 3-230 は、球形リフレクタ 3-630 と近似する形状である。球状部分の形状は、突起の高さ h 、突起の直径又は横断方向の寸法 w 、及び第二の層 3-620 の厚さ t の選択によって制御されてもよい。励起領域の場所と検体の位置は、窪みの深さ d の選択によって、円筒形のリフレクタの光学焦点に関して調整することができる。球形リフレクタ 3-630 は、励起エネルギーを励起領域 3-215 に集中させることができ、また、検体から放出されたエネルギーを回収し、反射して、放射をセンサ 3-260 に集中させ得ることがわかるであろう。

【0091】

前述のように、検体ウェルは何れの適当な形状で形成されてもよく、円筒形のみに限定されない。いくつかの実装形態において、検体ウェルは円錐形、4面体、多面体等であってもよい。図 3-7A～図 3-7F は、いくつかの実施形態において使用できるいくつかの例示的な検体ウェルの形状及び構造を示している。検体ウェル 2-211 は、いくつかの実施形態によれば、励起エネルギーのための第二の開口部 3-218 より大きい第一の開口部 3-212 を有するように形成されてもよい。検体ウェルの側壁は、テーパ状であるか、湾曲していてもよい。このように検体ウェルを形成することによって、励起領域へのより多くの励起エネルギーを許容し、なおも試料に向かって移動する励起エネルギーを明らかに減衰させることができる。それに加えて、検体により放射される放出物は、より大きい開口部を有する検体ウェルの端に向かって優先的に放射してもよく、それは、その方向に有利なエネルギー移動によるものである。

【0092】

いくつかの実施形態において、窪み 3-216 は、図 3-7B に示されるように、検体ウェルの基部より小さい横断方向の寸法を有していてもよい。より小さい窪みは、検体ウェルの側壁を犠牲層で被覆してから、窪みをエッチングし、その後、犠牲層を除去することによって形成されてもよい。より小さい窪みは、検体ウェルの導電壁から、より等距離の領域に検体を保持するように形成されてもよい。検体を検体ウェルの壁から等距離に保持することによって、検体ウェルの壁が放射中の検体に与える望ましくない影響、例えば放射物の急冷及び／又は放射寿命の変更を減らすことができる。

【0093】

図 3-7C 及び図 3-7D は、検体ウェルの他の実施形態を示す。この実施形態によれば、検体ウェル 2-211 は、励起エネルギー増大構造 3-711 と、励起エネルギー増大構造に隣接して形成された接着剤 3-211 とを含んでいてもよい。エネルギー増大構造 3-711 は、いくつかの実施形態によれば、光学的に透明な層 3-235 上の導電材料内に形成された表面プラズモン又はナノアンテナ構造を含んでいてもよい。図 3-7C は、検体ウェル 2-211 及び付近の構造の立面図であり、図 3-7D は平面図である。励起エネルギー増大構造 3-711 は、小さい局所化された領域内の励起エネルギーを増大させるような形状及び構成であってもよい。例えば、構造は、検体ウェルにおいて鋭角を有する先端の尖った導電体を含んでいてもよく、これが励起領域 3-215 内の励起エネルギーの強度を増大させる。図の例において、励起エネルギー増大構造 3-711 は、蝶ネクタイの形態である。この領域内に拡散する検体 3-101 は、接着剤 3-211 によって一時的又は永久的に保持されてもよく、機器 2-120 に配置された励起源 2-250 から供給できる励起エネルギーにより励起されてもよい。いくつかの実施形態によれ

10

20

30

40

50

ば、励起エネルギーはエネルギー増大構造 3-7 1 1 内の表面プラズモン電流を駆動してもよい。その結果として得られた表面プラズモン電流は、構造 3-7 1 1 の尖った先端において高い電場を生成してもよく、これらの高い電場は、励起領域 3-2 1 5 に保持された検体を励起してもよい。いくつかの実施形態において、図 3-7 C に示されている検体ウェル 2-2 1 1 は、窪み 3-2 1 6 を含んでいてもよい。

【0094】

検体ウェルの他の実施形態が図 3-7 E に示されており、検体ウェル 2-2 1 1 の内壁に沿って形成された励起エネルギー増大構造 3-7 2 0 を示している。励起エネルギー増大構造 3-7 2 0 は、金属又は導電体を含んでいてよく、検体ウェルが形成される基板が堆積中に回転される、傾斜させた（又はシャドウイングを用いた）指向性堆積を使用して形成されてもよい。堆積中、検体ウェル 2-2 1 1 の基部は、ウェルの上壁によって陰になり、堆積される材料が基部に蓄積されない。その結果として得られた構造 3-7 2 0 は、構造の底部で鋭角 3-7 2 2 を形成してもよく、導電体のこの鋭角は、検体ウェル内の励起エネルギーを増大させることができる。

【0095】

図 3-7 E に示されているような実施形態において、検体ウェルが形成される材料 3-2 3 2 は、導電体である必要はなく、誘電材料等の何れの適当な材料であってもよい。いくつかの実装形態によれば、検体ウェル 2-2 1 1 と励起エネルギー増大構造 3-7 2 0 とは、誘電体層 3-2 3 5 にエッチングされた止まり穴に形成されてもよく、別の層 3-2 3 2 を堆積させる必要はない。

【0096】

いくつかの実装形態において、その後、図 3-7 E に示される構造にシャドウ蒸着を実行して、金属又は導電性のエネルギー増大構造、例えば、破線で示されるような検体ウェルの基部の台形構造又は先端の尖った円錐を堆積させてもよい。エネルギー増大構造は、表面プラズモンを通じてウェル内の励起エネルギーを増大させてもよい。シャドウ蒸着後、配向プロセス（例えば、化学機械的研磨工程又はプラズマエッチングプロセス）を実行して、ウェル内にエネルギー増大構造を残しながら、検体ウェルの上部に堆積された材料を除去するか、エッチバックしてもよい。

【0097】

いくつかの実施形態において、検体ウェル 2-2 1 1 は、複数の金属層から形成されてもよい。図 3-7 F は、多層構造内に形成された検体ウェルを示し、異なる材料が異なる層に使用されてもよい。いくつかの実施形態によれば、検体ウェル 2-2 1 1 は、第一の層 3-2 3 2（半導体又は導電性材料であってもよい）、第二の層 3-2 3 4（絶縁体又は誘電体であってもよい）、及び第三の層 2-2 2 1（導電体又は半導体であってもよい）に形成されてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルの層には、縮退ドープ半導体又はグラフェンが使用されてもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェルは 2 つの層に形成されてもよく、他の実装形態において、検体ウェルは 4 つ以上の層に形成されてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルを形成するために使用される多層材料は、検体ウェルの基部における表面プラズモン生成を増大させるか、又はウェルの上部において表面プラズモン放射を抑制するように選択されてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルを形成するために使用される多層材料は、励起エネルギーが検体ウェルと多層構造を超えてバルク試料へと伝播するのを抑制するように選択されてもよい。

【0098】

いくつかの実施形態において、検体ウェルを形成するために使用される多層材料は、検体ウェルに入射する励起エネルギーにより生成され得る界面励起子を増大又は抑制するように選択されてもよい。例えば、双励起子及び三励起子等の多励起子が、検体ウェルに隣接する 2 つの異なる半導体層間の界面において生成され得る。検体ウェルは、金属層と第一の半導体層との両方において形成されてもよく、それによって第一の半導体層と第二の半導体層との間の界面は、検体ウェルの励起領域 3-2 1 5 にある。界面励起子は、単独

10

20

30

40

50

の半導体層の体積内の励起子より長い寿命を有し得、それによって、励起子が F R E T 又は D E T を介して検体又はタグを励起する可能性が高くなる。いくつかの実施形態において、多励起子が励起され得る少なくとも 1 つの量子ドットが検体ウェルの底部に（例えば、結合分子によって）付着されてもよい。量子ドットにおいて励起される励起子も 1 つの半導体層の体積内の励起子より長い寿命を有し得る。界面励起子又は量子ドットにおいて生成される励起子は、いくつかの実施形態によれば、F R E T 又は D E T の速度を増大させることができる。

【0099】

上述の実施形態において説明されている検体ウェルを形成するために、様々な材料が使用されてもよい。いくつかの実施形態によれば、検体ウェル 2-211 は、少なくとも 1 つの材料層 2-221 から形成されてもよく、これは、導電性材料、半導体、及び絶縁体の何れか 1 つ又は組合せを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェル 2-211 は、高導電性の金属層、例えば金、銀、アルミニウム、銅等を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、層 2-221 は、多層積層体を含んでいてもよく、これは、金、銀、アルミニウム、銅、チタン、窒化チタン、及びクロムの何れか 1 つ又は組合せを含む。いくつかの実装形態においては、それに加えて、又はその代わりに他の金属が使用されてもよい。いくつかの実施形態によれば、検体ウェルは、AlCu 又は AlSi 等の合金を含んでいてもよい。

【0100】

いくつかの実施形態において、異なる金属又は合金の複数の層は、検体ウェルを形成するために使用されてもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェル 2-211 が形成される材料は、金属又は非金属の交互の層、例えば金属と 1 つ又は複数の誘電体との交互の層を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、非金属はポリビニルホスホン酸又はポリエチレングリコール (PEG) チオール等のポリマーを含んでいてもよい。

【0101】

検体ウェルが形成される層 2-221 は、いくつかの実施形態によれば、少なくとも 1 つの光学的に透明な層 3-235 の上又はそれに隣接して堆積されてもよく、それによって励起エネルギー（例えば、可視又は近赤外放射の形態）及び放出エネルギー（例えば、可視又は近赤外放射の形態）は、検体ウェル 2-211 へ及びそれから大きく減衰せずに移動できる。例えば、励起源 2-250 からの励起エネルギーは、少なくとも 1 つの光学的に透明な層 3-235 を通って励起領域 3-215 へと通過でき、検体からの放出は、同じ 1 つ又は複数の層を通してセンサ 2-260 へと通過できる。

【0102】

いくつかの実施形態において、検体ウェル 2-211 の少なくとも 1 つの表面は、図 3-8 に示されるように、検体ウェル内の検体の動作に影響を与える材料の 1 つ又は複数の層 3-211、3-280 で被覆されてもよい。例えば、薄い誘導体層 3-280（例えば、アルミナ、窒化チタン、又はシリカ）を検体ウェルの側壁上の保護コーティングとして堆積させてもよい。このようなコーティングは、励起領域 3-215 の外側の検体の検体接着を減少させ、又は検体と、検体ウェル 2-211 が形成される材料 2-221 との間の相互作用を軽減させるために実装されてもよい。検体ウェル内の保護コーティングの厚さは、いくつかの実施形態によれば、約 5 nm～約 50 nm であってもよい。

【0103】

いくつかの実装形態において、コーティング層 3-280 のための材料は、その材料に対する化学物質の親和性に基づいて選択されてもよく、層 3-280 は、検体の種が層に付着することをさらに阻止するために化学的又は生物学的物質で処理されてもよい。いくつかの実施形態において、追加の又は代替的なコーティング及び保護材が使用されてもよい。

【0104】

いくつかの実施形態によれば、検体ウェル 2-211 及び／又は窪み 3-216 の少なくとも底面は、検体の保持を促進するために、化学的又は生物学的接着剤 3-211（例

10

20

30

40

50

えば、ビオチン)で処理されてもよい。検体は、永久的に又は一時的に、例えば少なくとも約0.5ミリ秒~約50ミリ秒の期間にわたり保持されてもよい。他の実施形態において、接着剤は、検体3-101をより長い期間にわたり一時的に保持するのを促進することができる。各種の実施形態において、何れの適当な接着剤も使用されてよく、ビオチンに限定されない。

【0105】

いくつかの実施形態によれば、検体ウェルに隣接する材料の層3-235は、その層の材料に対する接着剤の親和性に基づいて選択されてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルの側壁の保護は、側壁上の接着剤のコーティングを阻止してもよく、それによって、接着剤3-211は優先的に検体ウェルの基部に堆積する。いくつかの実施形態において、接着剤コーティングは、検体ウェルの側壁の一部まで延びていてもよい。いくつかの実装形態において、接着剤は、異方性物理的堆積プロセス(例えば、蒸着、スパッタリング)により堆積されてもよく、それによって接着剤は検体ウェル又は窪みの基部に蓄積され、検体ウェルの側壁上にほとんど形成されない。

【0106】

アッセイチップのための検体ウェル2-211を製造するために、各種の製造方法が利用されてよい。以下にプロセスの数例を説明するが、本発明はこれらの例のみに限定されない。

【0107】

検体ウェル2-211は、何れの適当なマイクロ又はナノ製造工程により形成されてもよく、これには、フォトリソグラフィ、深紫外線フォトリソグラフィ、浸漬フォトリソグラフィ、近接場光接触フォトリソグラフィ、EUVリソグラフィ、X線リソグラフィ、ナノインプリントリソグラフィ、干渉リソグラフィ、ステップアンドフラッシュリソグラフィ、直接書込み電子ビームリソグラフィ、イオンビームリソグラフィ、イオンビームミリング、リフトオフ加工、反応イオンエッチング、選択的エピタキシ、分子自己組織化、有機合成等が含まれていてもよいが、これらに限定されない。いくつかの実施形態によれば、検体ウェル2-211は、フォトリソグラフィ及びリフトオフ加工を使用して形成されてもよい。検体ウェルのリフトオフ加工に関連する例示的な製造工程が図3-9A~図3-9Eに示されている。ピクセルにおいて単一の検体ウェル又は構造を製造することが典型的に図面に示されているが、基板上に(例えば各ピクセルに)多数の検体ウェル又は構造が同時製造されてもよいことがわかるであろう。

【0108】

いくつかの実施形態によれば、基板上の層3-235(例えば、酸化物層)は、図3-9Aに示されているように、反射防止コーティング(ARC: anti-reflection coating)層3-910とフォトレジスト3-920とで被覆されてもよい。フォトレジスト3-920は、フォトリソグラフィ及びレジストの現像を使用して露光され、パターニングされてもよい。フォトレジスト3-920は、現像によって露光部分又は非露光部分(レジストのタイプによって異なる)が除去され、ピラー3-922が残り、これは図3-9Bに示されるように、検体ウェルのための所望の直径と略等しい直径を有する。ピラー3-922の高さは、検体ウェルの所望の深さより大きくてもよい。

【0109】

ピラー3-922のパターンは、例えば、図3-9Cに示されるように、異方性反応イオンエッチング(RIE)を使用してARC層3-910に転写されてもよい。この領域は、その後、検体ウェルを形成するのに望ましい少なくとも1つの材料2-221、例えば導電体又は金属で被覆されてもよい。堆積された材料の一部は、図3-9Dに示されるように、ピラー3-922の上のキャップ3-232を形成する。フォトレジスト3-920とARC層3-910とは、その後、選択的除去プロセス(例えば、少なくともレジストを溶解させ、キャップを解放又は「リフトオフ」する、攪拌のある又はないケミカルバスを使用して)剥離されてもよい。ARC層3-910が残っている場合、選択的エッチングを使用して基板から剥離してもよく、それによって図3-9Eに示されるように、

検体ウェル 3-210 が残る。いくつかの実施形態によれば、検体ウェルの側壁 3-214 は、少なくとも 1 つの材料 2-221 の堆積の性質により、傾斜していてもよい。

【0110】

本明細書において使用されるかぎり、「選択的エッチング」とは、エッチング液が除去対象でないその他の材料をエッチングする速度より速く（例えば、少なくとも 2 倍の速度で）除去又はエッチングすることが望まれる 1 つの材料を、エッチング液が選択的にエッチングするエッチングプロセスを意味する。

【0111】

レジストと ARC 層は典型的にポリマー系であるため、これらは軟質材料と考えられ、これは高いアスペクト比（例えば、高さ対幅に関して、約 2 : 1 より大きいアスペクト比）を有する検体ウェルを形成するのに適していないことがあり得る。より高いアスペクト比の検体ウェルの場合、硬質材料がリフトオフプロセスに含められてもよい。例えば、ARC 層とフォトレジストを堆積させる前に、硬質（例えば、無機材料）の層が堆積されてもよい。いくつかの実施形態において、チタン又は窒化ケイ素の層が堆積されてもよい。硬質材料の層は、検体ウェルが形成される材料より優先的にエッチングされるはずである。フォトレジストがパターニングされた後、ピラーのパターンが ARC 層及びその下の硬質材料 3-930 に転写されてもよく、図 3-9F に示される構造が得られる。その後、フォトレジストと ARC 層が剥離され、材料 2-221 が堆積され、リフトオフ工程が実行されて、検体ウェルが形成されてもよい。

【0112】

いくつかの実施形態によれば、リフトオフプロセスは、図 3-7C と図 3-7D に示されるように、エネルギー増大構造 3-711 を含む検体ウェルを形成するために使用されてもよい。

【0113】

検体ウェルを形成するための代替的なプロセスが、図 3-10A ~ 図 3-10D に示されている。このプロセスにおいて、検体ウェルは、少なくとも 1 つの材料 3-236 中に直接エッチングされてもよい。例えば、検体ウェルがその中に形成される予定の少なくとも 1 つの材料 3-236 が、基板 3-325 の上に堆積させられてもよい。層は、図 3-10A に示されるように、ARC 層 3-910 とフォトレジスト 3-920 とにより被覆されてもよい。フォトレジストは、図 3-10B に示されるように、パターニングされて、検体ウェルの所望の直径と略等しい直径を有する穴が形成されてもよい。穴のパターンは、例えば、図 3-10C に示されるように異方性反応イオンエッチングを使用して、ARC 層に、及び層 3-230 を通して転写されてもよい。レジストと ARC 層が剥離され、図 3-10D に示される検体ウェルが得られる。いくつかの実施形態によれば、材料の層 3-230 内にエッチングにより形成された検体ウェルの側壁は、リフトオフプロセスから得られた側壁より垂直であり得る。

【0114】

いくつかの実施形態において、フォトレジスト及び ARC 層は、材料 3-236 上の硬質マスク（例えば、窒化ケイ素又は酸化物層であり、図示せず）をパターニングするために使用されてもよい。パターニングされた穴は、その後、硬質マスクに転写されてもよく、これは、その後、パターンを材料の層 2-221 に転写するために使用される。硬質マスクにより、材料の層 2-221 内により深くエッチングし、より高いアスペクト比の検体ウェルを形成することができる。

【0115】

上述のリフトオフプロセス及び直接エッチングによる製造方法は、検体ウェルが形成される材料の積層体を形成するのに異なる材料の複数の層が使用されている場合、検体ウェルを形成するために使用されてもよい。ある例示的な積層体が図 3-11 に示されている。いくつかの実施形態によれば、材料の積層体は、検体ウェルの励起領域への励起エネルギーの結合を改善するめに、又は励起エネルギーがバルク試料内に透過し、又は再放射されるのを減少させるために、検体ウェルの形成に使用されてもよい。例えば、吸収層 3-

942は、第一の層3-940の上に堆積されてもよい。第一の層は、金属又は金属合金を含んでいてもよく、吸収層は、表面プラズモンを阻止する材料、例えばアモルファスシリコン、Ta₂N₃、TiN、又はCrを含んでいてもよい。いくつかの実装形態において、表面層3-944はまた、検体ウェル周辺の表面を保護するために堆積されてもよい（例えば、分子の接着を阻止する）。

【0116】

窪み3-216を含む検体ウェルの形成は、何れの適当な方法で実行されてもよい。いくつかの実装形態において、窪みは、隣接する層3-235、及び／又は検体ウェルに隣接する何れかの1つ又は複数の介在層内へとさらにエッチングすることによって形成されてもよい。例えば、材料の層2-221内に検体ウェルを形成した後、その層2-221は、図3-12に示されているように、窪みをパターンニングするためのエッチマスクとして使用されてもよい。例えば、基板に対して選択的な異方性反応イオンエッチングを行ってもよく、それによって窪み3-216が隣接する層3-235にエッチングされてもよい。例えば、材料2-221が金属であり、隣接する層3-235が酸化シリコンである実施形態において、フィードガスがCHF₃又はCF₄を含む反応イオンプラズマエッチングが、検体ウェルの下に露出された酸化シリコンを優先的に除去し、窪み3-216を形成するために使用されてもよい。本明細書において使用されるかぎり、「酸化シリコン」は一般にSiO_xを指し、例えば二酸化シリコンを含んでいてもよい。

【0117】

いくつかの実装形態において、エッチング中にプラズマ内の状態（例えば、基板に対するバイアスと圧力）は、窪み3-216のエッチング形状を決定するために制御されてもよい。例えば、低圧（例えば、約13332.2Pa（約100mTorr）未満）及び高いDCバイアス（例えば、約20Vを超える）では、エッチングは、図に示されているように、異方性が高く、窪みの、実質的に直線に縦方向の側壁を形成してもよい。より高い圧力及びより低いバイアスでは、エッチングはより等方性が強く、窪みのテーパ状及び／又は湾曲した側壁を生成してもよい。いくつかの実装形態において、ウェットエッチングが窪みの形成に使用されてもよく、これは実質的に等方性で、略球形の窪みを形成し、これは材料2-221の下で横方向に、検体ウェルの側壁の上又はそれを超えるまで延びていてもよい。

【0118】

図3-13A～図3-13Cは、検体ウェル2-211（例えば、図3-7Bに示されているような窪み）より横断方向の寸法が小さい窪み3-216を形成するために使用できるプロセス工程を示している。いくつかの実装形態において、検体ウェルを形成した後、検体ウェルを含む領域の上に等角の犠牲層3-960を堆積させてもよい。いくつかの実装形態によれば、堆積層3-960は蒸着プロセス、例えば化学蒸着（CVD）、プラズマエンハンスドCVD、又は原子層堆積（ALD）を使用して堆積されてもよい。その後、犠牲層を、犠牲層3-960に対して選択的な第一の異方性エッチングを使用してエッチバックしてもよく、水平面から層を除去し、図3-13Bに示されているように、検体ウェルの壁の上に側壁コーティング3-962が残るようにする。エッチバックは、いくつかの実装形態において、選択的であり、材料2-221及び隣接する層3-235の上で停止してもよく、又はいくつかの実装形態において、非選択的で時間制御されたエッチングであってもよい。

【0119】

隣接する層3-235に選択的な第二の異方性エッチングを実行して、図3-13Cに示されるように、窪み3-216を隣接する層にエッチングしてもよい。その後、任意選択により、側壁の犠牲コーティング3-962を選択的なウェット又はドライエッチングにより除去してもよい。側壁コーティングの除去により、検体ウェルが開き、窪み3-216より大きい横断方向の寸法を有することになる。

【0120】

いくつかの実装形態において、犠牲層3-960は、隣接する層3-235と同じ材料

10

20

30

40

50

を含んでいてもよい。このような実施形態において、第二のエッチングにより、側壁が隣接する層 3-235 の内部までエッチングされる際に、側壁コーティング 3-962 の少なくとも一部が除去されてもよい。いくつかの実施形態において、側壁コーティングのこのようなエッチバックにより、窪みのテーパ状の側壁を形成できる。

【0121】

いくつかの実装形態において、犠牲層 3-960 は、検体ウェルの側壁を保護するため（例えば、検体ウェルの側壁への検体の付着を減少させる）ために使用される材料から形成され、又はその層を含んでいてもよい。層 3-960 の少なくとも一部が、窪みの形成後、検体ウェルの壁に残ってもよい。

【0122】

いくつかの実施形態によれば、側壁コーティング 3-962 の形成は、窪みの形成後に行われてもよい。このような実施形態において、層 3-960 は、窪みの側壁をコーティングする。このようなプロセスは、窪みの側壁を保護し、検体を窪みの中央に局所化するために使用されてもよい。

【0123】

検体ウェル 2-211 の基部の接着剤 3-211、及び保護層 3-280 を堆積させることに関連するプロセス工程が図 3-14A~3-14D に示されている。いくつかの実施形態によれば、検体ウェルは、検体ウェルの壁上の第一の保護層 3-280 を含んでいてもよい。第一の保護層は、例えば、図 3-13B 又は図 3-8 に関して上述したように形成されてもよい。いくつかの実施形態において、第一の保護層 3-280 は、何れの適当な堆積プロセス及びエッチングバックにより形成されてもよい。いくつかの実施形態において、第一の保護層は、検体ウェルが形成される材料 3-230 を酸化することにより形成されてもよい。例えば、検体ウェルは、アルミニウムで形成されてもよく、これを酸化させて、検体ウェルの側壁上にアルミナのコーティングを形成してもよい。

【0124】

接着剤 3-980 又は接着剤前駆体（例えば、接着剤と優先的に結合する材料）は、図 3-14A に示されるように、異方性物理堆積プロセス、例えば蒸着を用いて基板上に堆積されてもよい。接着剤又は接着剤前駆体 3-980 は、図 3-14B に示されるように、検体ウェルの基部に接着剤層 3-211 を形成してもよく、検体ウェルが形成される材料 2-221 の上面を被覆してもよい。その後の、図 3-14C に示される、傾斜させた指向性堆積（シャドウデポジション、又はシャドウエバポレーションプロセスと呼ばれることがある）は、第二の保護層 3-280 を、接着剤層 3-211 を被覆せずに、材料 2-221 の上面に堆積させるために使用されてもよい。シャドウデポジションプロセス中に、基板を基板に垂直な軸の周囲で回転させながら、保護層前駆体 3-990 を堆積させてもよく、それによって第二の保護層 3-280 は検体ウェルの上側縁の周囲により均一に堆積する。いくつかの実施形態により、その結果として得られる構造が図 3-14D に示されている。第二の保護層を堆積させる代わりに、平坦化エッチング（例えば、CMP 工程）が材料 3-230 の上面から接着剤を除去するために使用されてもよい。

【0125】

いくつかの実装形態によれば、接着剤層 3-211 は、図 3-15 に示されるように、テーパ付きの検体ウェルの基部の中央に堆積されてもよい。例えば、接着剤又は接着剤前駆体は、図 3-14A に示されるように、前述のように形成されたテーパ付きの検体ウェル内に指向的に堆積させてもよい。検体ウェルの壁は、接着剤層 3-211 の堆積前又は後に酸化プロセスによって保護されてもよい。材料 2-221 の表面上に残る接着剤又は前駆体は、図 3-14D に関連して説明したように保護されてもよい。いくつかの実施形態において、材料 2-221 の表面上の接着剤は、化学機械的研磨工程により除去されてもよい。接着剤層又は接着剤層前駆体を検体ウェルの基部の中央に形成することによって、検体からの放出に対する有害な効果（例えば、検体ウェルからの検体の放射の抑制又は急冷、検体ウェルの周囲に形成されたエネルギー結合構造に関して中央に位置付けられていないことによる検体からの好ましくない放射分布、検体に関する発光寿命に対する悪影

10

20

30

40

50

響)が低減し得る。

【0126】

いくつかの実施形態において、検体ウェル及び窪みを形成するために使用されるリフトオフパターンニング、エッチング、及び堆積プロセスは、センサチップ上に集積CMOS回路を形成するために使用されるCMOSプロセスと適合可能であり得る。したがって、センサは、従来のCMOS施設及び製造法を使用して製造できるが、いくつかの実装形態においては、カスタム又は専用製造施設が使用されてもよい。

【0127】

上述のプロセス工程の変形形態が、検体ウェルの代替的な実施形態を形成するために使用されてもよい。例えば、図3-7A又は図3-7Bに示されているようなテーパ状検体ウェルは、図3-14Cに示される傾斜堆積プロセスを使用して形成されてもよい。図3-7Bの検体ウェルに関して、堆積プロセス中に堆積の角度を変化させてもよい。このような実施形態の場合、実質的に直線に縦方向の側壁を有する検体ウェルがまず形成され、その後、追加の材料2-221が、傾斜堆積により堆積され、検体ウェルの側壁にテーパが付けられる。

B. 励起エネルギーの検体ウェルへの結合

図2-1, 2-3に示されているように、励起源2-250からの励起エネルギー2-251は、機器2-120の構成要素とアッセイチップ2-110の構成要素とを使用して、検体ウェル2-211に案内される。ここでは、励起エネルギー2-251を検体ウェル2-211に結合するのを補助できるアッセイチップ2-110の構成要素について

【0128】

励起源からのエネルギーの検体ウェルへの結合は、検体ウェル内及び／又はそれに近接して励起-結合構造を形成することによって改善し、又はそれに影響を与えることができる。励起-結合構造は、いくつかの実施形態において、検体ウェルの周囲に製造されたマイクロ又はナノスケール構造を含んでいてもよく、又はいくつかの実施形態において、検体ウェルに形成された構造又は粒子を含んでいてもよい。励起-結合構造は、いくつかの実装形態において、検体の放射励起に影響を与えてもよく、及びいくつかの実装形態において、検体の非放射励起に影響を与えてもよい。各種の実施形態において、放射励起-結合構造は、検体ウェルの励起領域内の励起エネルギーの強度を高めることができる。非放射

C. 放射励起-結合構造

励起源からの励起エネルギーの検体ウェル内の励起領域への結合に影響を与えるために使用可能な放射励起-結合構造には様々な種類のものがある。いくつかの放射結合構造は、導電体で形成されて(例えば、金属層を含む)、表面プラズモン振動を支援し、これは検体ウェルの付近及び／又はその中の励起エネルギーに局所的に影響を与える(例えば、電磁界を局所的に変化させる)。場合により、表面プラズモン構造は、検体ウェルの励起領域内の励起エネルギーを2倍以上増大させ得る。いくつかの放射結合構造は、励起磁場の位相及び／又は振幅を変化させて、検体ウェル内の励起エネルギーを増大させてもよい。このセクションでは、放射励起-結合構造の各種の実施形態を説明する。

【0129】

図4-1Aは、検体ウェル内への励起エネルギーの結合を促進するために使用可能な表面プラズモン構造4-120のごく一例を示す。図面は、表面プラズモン構造4-120の周囲の領域の平面図を示しており、構造の周囲の電場強度の数値シミュレーションの結果を表す。図面は、検体ウェル(図示せず)に近接して位置付けられた鋭角の頂点を有する3つの三角形の特徴物を含む表面プラズモン構造を示している。いくつかの実施形態によれば、表面プラズモン構造は金属又は導電体(例えば、以下の金属又は金属合金の何れか1つ又は組合せのパターンニングされた薄膜: Al、Au、Ag、Ti、TiN)を含んでいてもよい。薄膜の厚さは、いくつかの実施形態において約10nm~約100nmで

あってもよいが、他の実施形態においては他の厚さが使用されてもよい。表面プラズモン構造は、いくつかの実施形態において、検体ウェルに近接して（例えば、約100nm以内）に位置付けられた鋭角を有する構造物4-110を含んでいてもよい。

【0130】

図4-1Bは、図4-1Aの表面プラズモン構造の、破線で切った断面図を示す。シミュレーションは、表面プラズモン構造の三角形の頂点に近接した励起エネルギーの局所的な高強度の領域4-505を示している。このシミュレーションのために、表面プラズモン構造4-120を誘電体層4-135（二酸化シリコン）の上に位置付けた。表面プラズモン構造は導波路のエバネッセント場からのエネルギーを利用し、検体ウェルにおける強度を増大させる。

10

【0131】

いくつかの実施形態において、表面プラズモン構造による励起エネルギーの増大は、深い検体ウェル2-211が不要となる程度まで局所化されてもよい。例えば、直径約100nm、ピーク強度値が領域外の強度の約80%を超えるような高強度領域4-505が形成されると、深い検体ウェルが不要となり得る。高強度領域4-505内の検体のみが、検出のための感知可能な放出に寄与する。

【0132】

入射電磁場が表面プラズモン構造と相互作用すると、構造内に表面波電流が生成される。構造の形状はこれらの表面プラズモンの強度と分布に影響を与え得る。これらの局所化された電流は、図4-1Bの高強度領域4-505により示されているように、例えば表面プラズモン構造のすぐ近傍における入射電磁場と相互作用し、これを大きく変化させ、増強させることができる。いくつかの実施形態において、表面プラズモン構造の付近でエネルギーを発するエミッタ（例えば、蛍光タグ）は、その放出をこの構造により変化させるようにして、エミッタからの遠隔場放射パターンを変化させることができる。

20

【0133】

表面プラズモン構造4-122の他の実施形態が図4-1Cの平面図に示されている。図の蝶ネクタイ型構造は、検体ウェル2-211に隣接して位置付けられた2つの三角形の金属構造を含む。この構造は、例えば検体ウェルの下方において、及び／又は検体ウェルの励起領域に近接してパターンニングされてもよい。いくつかの実装形態において、表面プラズモン構造の検体ウェルと鋭角を有する特徴物4-125間にギャップ4-127があってもよい。いくつかの実装形態によれば、ギャップ4-127は約10nm～約200nmであってもよい。いくつかの実装形態においてギャップ4-127は、約10nm～約100nmであってもよい。鋭角を有する特徴物4-125は、図面に示されているように、表面プラズモン構造の縁に先端又は尖った曲げ部を含んでいてもよい。鋭角を有する特徴物は、何れの適当な形状であってもよい。いくつかの実装形態において、鋭角を有する特徴物4-125の曲げ半径は、入射励起エネルギーに関連する波長の約5分未満であってもよい。いくつかの実装形態において、鋭角を有する特徴物4-125の曲げ半径は、入射励起エネルギーにより励起される表面プラズモン波に関連する波長約2分未満であってもよい。いくつかの実装形態において、鋭角を有する特徴物4-125の曲げ半径は、入射励起エネルギーにより励起される表面プラズモン波に関連する波長約5分未満であってもよい。いくつかの実装形態において、鋭角を有する特徴物4-125の曲げ半径は、入射励起エネルギーにより励起される表面プラズモン波に関連する波長約2分未満であってもよい。

30

40

【0134】

いくつかの実装形態によれば、表面プラズモン構造4-122は、図4-1Dの立面図に示されているように、検体ウェル2-211内にパターンニングされてもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェル内の表面プラズモン構造は、図に示されているように、検体ウェルの側壁にパターンニングされた1つ又は複数の指部（例えば、金属の指部）を含んでいてもよい。図4-1Eは検体ウェル2-211の平面図を示し、検体ウェル内の側壁上に形成された表面プラズモン構造4-122を示している。いくつかの実装形態にお

50

いて、これらの表面プラズモン構造 4-1 2 2 の下端は、鋭角を有する特徴物又は曲げ部を形成し、そこで電磁場が増強される。表面プラズモン構造 4-1 2 2 は、検体ウェルの基部まで延びていてもいなくてもよい。

【0135】

いくつかの実施形態において、表面プラズモン構造 4-1 2 2 は、励起エネルギー及び／又は検体ウェルからの放出エネルギーの偏向に影響を与えるように配置されてもよい。例えば、図 4-1 E に示されているパターンは、線形又は楕円形の励起偏光の好ましい方位及び／又は検体ウェル内のエミッタからの線形又は楕円偏光の好ましい方位に影響を与えるために使用されてもよい。

【0136】

表面プラズモン構造は、図 4-1 A～図 4-1 E に示されているもの以外の形状にパターンニングされてもよい。例えば、表面プラズモン構造は、いくつかの実施形態によれば、図 4-2 A に示されているように、規則的又は周期的構造としてパターンニングされてもよい。例えば、表面プラズモン構造は、その中に検体ウェル 2-2 1 1 が形成される材料 2-2 2 1 の下面の突出する特徴物 4-2 1 0 のアレイとしてパターンニングされてもよい。周期的表面プラズモン構造は、規則的なアレイ状に、例えば回折格子、グリッド、ラティス、円形回折格子、螺旋回折格子、楕円回折格子、又は他のあらゆる適当な構造として形成されてもよい。表面プラズモン構造の突起 4-2 1 0 間に、実質的に均等な間隔 s があってもよい。いくつかの実装形態において、間隔 s の数値は約 40 nm～約 250 nm であってもよい。いくつかの実施形態によれば、突起の高さ h は約 20 nm～約 100 nm であってもよい。いくつかの実装形態において、間隔は不均一であってもよく、又はチャープしていてもよい（半径方向の距離がより大きい場合に数値が減少する）。いくつかの実施形態において、表面プラズモン構造の突起 4-2 1 0 は、フレネルゾーンプレートとしてパターンニングされてもよい。いくつかの実施形態によれば、表面プラズモン構造 4-2 1 0 は、透明層及び／又は誘電体層 3-2 3 5 に隣接して形成されてもよい。いくつかの実施形態において、突起 4-2 1 0 間の間隔は周期的であってもよく、他の実施形態においては、突起 4-2 1 0 は非周期的であってもよい。

【0137】

いくつかの実装形態において、表面プラズモン構造 4-2 1 2 は、図 4-2 B に示されているように、検体ウェルが形成される材料 2-2 2 1 から離間されていてもよい。例えば、表面プラズモン構造 4-2 1 2 と材料 4-2 3 0 との間に介在誘電体層 4-2 4 7 があってもよい。いくつかの実施形態によれば、表面プラズモン構造 4-2 1 2 は、図 4-2 B に示されているように、検体ウェルの窪み 3-2 1 6 に隣接して位置付けられていてもよい。例えば、表面プラズモン構造 4-2 1 2 は、図 4-2 B に示されているように、窪み 3-2 1 6 の側壁に隣接して位置付けられていてもよい。

【0138】

図 4-2 C は、同心円回折格子として形成された表面プラズモン構造 4-2 1 4 を示している。構造 4-2 1 4 は、いくつかの実施形態によれば、同心円状の導電リング 4-2 1 5 を含んでいてもよい。リングは、図 4-2 A に関連して説明したように、規則的間隔 s により分離され、高さ h を有していてもよい。いくつかの実施形態によれば、任意選択による窪みを有する検体ウェル 4-2 1 0 は、リングの中央に位置付けられてもよい。円形回折格子は、検体ウェルの基部に隣接してパターンニングされてもよい。

【0139】

表面プラズモン構造の周期性は、いくつかの実施形態によれば、共振構造を形成するように選択されてもよい。例えば、表面プラズモン構造の間隔 s は、励起エネルギーによって構造内に生成される表面プラズモン波の波長の約半分となるように選択されてもよい。共振構造として形成された場合、表面プラズモン構造は、周期的表面プラズモン構造の方向に沿って励起エネルギーを蓄積させ、共振させてもよい。このような共振挙動は、図 4-2 D に示されるように、検体ウェル内の、また検体ウェルに隣接する電磁エネルギーを増強できる。表面プラズモン構造の間隔はいくつかの実施形態において周期的であって

よいが、他の実施形態においては、空間は非周期的である。非周期的な間隔を使用することにより、電場増強を励起エネルギーの波長と、関連する放出エネルギーの波長に合わせて特に設計することができる。図4-2Dは、検体ウェルの基部と周期的な表面プラズモン構造の周囲における電磁場の数値シミュレーションの結果を表す。表面プラズモン構造4-216は、その中に検体ウェルが形成される材料2-221に隣接して位置付けられ、検体ウェル2-211の基部に近接している。表面プラズモン構造は、検体ウェルから離れた領域内及びシミュレート領域外で、規則的又は不規則的な間隔インターバルを繰り返す回折格子又は円形回折格子の形態であってもよい。例えば、表面プラズモン構造4-216の繰返し格子突起が3~50であってもよい。高強度領域4-240は、検体ウェル2-211の基部に見ることができる。この領域内の強度は、表面プラズモン構造の直下の周辺領域にわたり、2倍超だけ増強されている。

10

【0140】

図4-2Eは、立面図で、共振表面プラズモン構造4-218の代替的な実施形態を示す。いくつかの実施形態によれば、表面プラズモン構造は周期的又は非周期的回折格子又はグリッドパターンとして形成されてもよく、多層4-247にパターンニングされてもよい。いくつかの実施形態によれば、検体ウェル2-211は、多層4-247を通じて、また共振表面プラズモン構造4-218内でパターンニングされてもよい。いくつかの実装形態において、共振表面プラズモン構造は、図4-2Fの平面図に示されているように、個別の導電性要素4-222を含んでいてもよい。いくつかの実装形態において、共振表面プラズモン構造は、図4-2Gに示されているように、連続的なラティスパターン4-250を含んでいてもよい。誘電フィルタ4-252は導電材料4-250中の空洞に位置付けられてもよく、検体ウェル2-211は空洞と共に位置付けられてもよい。

20

【0141】

検体ウェルへの結合を増強させるため、又は検体ウェル内の検体からの放出に影響を与えるために使用できる表面プラズモン構造には様々な種類がある。図4-2Hは、平面図で、表面プラズモン構造のまた別の代替的な実施形態を示す。図4-2Hの線4-2Iに沿って切断した構造の断面図が図4-2Iに示されている。いくつかの実装形態によれば、表面プラズモン構造は、検体ウェル2-211の周囲に分散されたディスク4-260のアレイを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、各ディスク4-260は、検体ウェル2-211から略距離Rだけ離れていてもよい。しかしながら、図のように、各ディスク4-260から検体ウェル2-211までの距離は均一でなくてもよい。また、各ディスク4-260の大きさは異なってもよい。いくつかの実装形態において、導電性ディスク4-260を使用する代わりに、表面プラズモン構造は導電層を含んでいてもよく、それを通して分散パターンの穴が形成される。このような構造は「ナノアンテナ」と呼ばれてもよい。

30

【0142】

検体ウェルに隣接する表面プラズモン構造をパターンニングするために、様々なプロセスが使用されてもよい。図4-3A~図4-5Eは、いくつかの実施形態による、検体ウェルに隣接して表面プラズモン構造を形成するために使用できるプロセス工程に関連する構造を示している。ここで、図4-3Aを参照すると、表面プラズモン構造を形成する工程は、マスキング層4-330の上の反射防止コーティング(ARC)4-320上にレジスト層4-310を形成する工程を含んでいてもよい。これらの層は、いくつかの実装形態によれば、透明誘電体層3-235の上に堆積されてもよい。レジスト層4-310は、リソグラフィによるパターンニング可能なフォトリソレジスト、又は電子もしくはイオンビームレジストを含んでいてもよい。マスキング層4-330は、いくつかの実施形態によれば、無機材料(例えば、シリコンもしくは窒化シリカ、又は他のあらゆる適当な材料)で形成された硬質マスクを含んでいてもよい。

40

【0143】

いくつかの実装形態において、図4-3Bに示されているように、レジスト4-310をパターンニングするために、フォトリソグラフィプロセスが使用されてもよい。選択され

50

たパターンは、所望の表面プラズモン構造を形成するために使用される突起又は穴のレイアウトを含んでいてもよい。レジスト4-310の現像後、ARCの領域が露出し、パターンがARC層4-320に、その後、マスクング層4-330内にエッチングされてもよい。レジストとARCは基板から剥離されてもよく、その結果として得られる構造は、図4-3Cに示されるように見え得る。マスクング層4-330は、その後、エッチマスクとして使用されてもよく、それによってパターンが、図4-3Dに示されるように、選択的異方性エッチを通じて下にある誘電体層3-235に転写されてもよい。

【0144】

その後、図4-3Eに示されているように、導電材料2-221又は導電体を含む材料の層が堆積されてもよい。表面プラズモン構造を形成するためには、それが材料2-221から分離された層として堆積されるか否かを問わず、何れの適当な導電材料が使用されてもよい。例えば、場合により、第一の導電材料が材料2-221の基底層として堆積されてもよく、その中に表面プラズモン構造が形成される。表面プラズモン構造を形成するために使用できる材料の例としては、Au、Al、Ti、TiN、Ag、Cu、及びこれらの合金又は組合せの層を含むが、これらに限定されない。

10

【0145】

材料2-221又は材料の層は、何れの適当な堆積プロセスで堆積されてもよく、これには物理堆積プロセス又は化学蒸着プロセスが含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、材料2-221の厚さは約80nm～約300nmであってもよい。いくつかの実装形態において、材料2-221は平坦化（例えば、CMPプロセスを使用）されてもよいが、平坦化は必須ではない。検体ウェルは、検体ウェルの製造に関連して本明細書で説明した何れの適当なプロセスを使用して材料2-221内に形成されてもよい。

20

【0146】

本発明者らは、図4-3A～図4-3Eに示される工程に従って表面プラズモン構造を形成するには、検体ウェルを表面プラズモン構造に正確に整列させる必要があり得ることを認識した。例えば、図4-2Cに示されているように、同心円回折格子を含む表面プラズモン構造には、検体ウェル2-211を表面プラズモン構造4-214の中心に正確に整列させる必要があり得る。このような正確な整列に関連する製造上の困難を回避するために、図4-4A～図4-5Eに示されるセルフアラインメントプロセスが使用されてもよい。

30

【0147】

ここで、図4-4Aを参照すると、表面プラズモン構造と、表面プラズモン構造とセルフアラインにより検体ウェルを形成するためのプロセスは、透明誘電体層3-235の上にマスクング層4-410を形成する工程を含んでいてもよい。マスクング層は、いくつかの実施形態によれば、シリコン、又は窒化シリコン等の無機材料で形成された硬質マスクを含んでいてもよい。マスクング層4-410の厚さは、検体ウェル2-212の所望の高さと略同じであってもよい。例えば、マスクング層の厚さは、いくつかの実施形態によれば、約50nm～約200nmであってもよいが、他の実施形態では他の厚さが使用されてもよい。

40

【0148】

マスクング層4-410は、誘電層3-235にパターニングされることになる表面プラズモン構造の所望のパターンを有する空洞4-430を作るためにパターニングされてもよい。マスクング層4-410のパターニングは、何れの適当なリソグラフィプロセス（例えば、フォトリソグラフィ、電子ビームリソグラフィ、イオンビームリソグラフィ、EUVリソグラフィ、X線リソグラフィ）で行われてもよい。結果として得られる構造は、図4-4Bに示されるように見え得る。構造は、中央ピラー4-420を含んでいてもよく、これは、その後、セルフアラインによる検体ウェルを形成するために使用される。

【0149】

次に、レジスト4-440（例えば、フォトレジスト）が、図4-4Cに示されている

50

ように、パターンニングされたマスキング層 4-410 の上にパターンニングされてもよい。レジスト 4-440 (例えば、基板アラインメントのためのマスク) をパターンニングするためのアラインメントは高い精度である必要はなく、レジスト 4-440 が中央ピラー 4-420 を覆い、表面プラズモン構造の形成に使用されることになる空洞 4-430 を覆わなければならない。

【0150】

次に、いくつかの実施形態によれば、図 4-4D に示されているように、選択的異方性エッチングを用いて、誘電体層 3-235 のエッチングし、表面プラズモン構造のパターンを誘電体に転写してもよい。その後、選択的等方性エッチングを用いて、マスキング層 4-410 の露出部分を除去してもよい。等方性エッチングは、例えばウェットエッチングであってもよいが、いくつかの実施形態においては等方性ドライエッチングが使用されてもよい。レジスト 4-440 が中心ピラー 4-420 を覆うため、図 4-4E に示されているように、中央ピラーはエッチングされず、基板に残る。次に、図 4-4F に示されているように、レジスト 4-440 が基板から剥離されてもよく、ピラー 4-420 が露出する。

10

【0151】

いくつかの実施形態によれば、図 4-4G に示されているように、金属導電材料 2-221、又は導電材料を含む材料の積層体とその領域の上に堆積されてもよい。中央ピラー 4-420 とピラー上に堆積された材料のキャップは、その後、ピラーの選択的ウェットエッチングによって除去され、キャップがリフトオフされてもよい。中央ピラーを除去すると、検体ウェルが残り、これは下の表面プラズモン構造 4-450 とセルフアラインする。

20

【0152】

表面プラズモン構造とセルフアライン式の検体ウェルを形成するために代替的なプロセスが使用されてもよく、これは図 4-5A ~ 図 4-5E に示されている。いくつかの実施形態によれば、図 4-5A に示されるように、1つ又は複数の導電層 4-510、4-520 が、あらゆる適当なリソグラフィプロセスを使用して透明誘電体層 3-235 の上にパターンニングされてもよい。いくつかの実装形態において、第一の層 4-510 はアルミニウムを含んでいてもよく、第二の層 4-520 は窒化チタンを含んでいてもよいが、様々な実施形態において、他の材料の組合せが使用されてもよい。1つ又は複数の層の全体の厚さは、いくつかの実施形態によれば、検体ウェルの所望の厚さと略同じでもよい。パターンは、1つ又は複数の金属層内に検体ウェル 2-211 と、検体ウェルに隣接する空洞 4-525 を形成してもよい。空洞は、所望の表面プラズモン構造のパターンに配置されてもよい。

30

【0153】

いくつかの実装形態において、誘電体層 3-235 は、図 4-5B に示されているように、エッチングされて表面プラズモン構造及び検体ウェル 2-211 のパターンが誘電体層に転写され、誘電体空洞 4-530 が形成されてもよい。誘電体空洞 4-530 のエッチング深さは、いくつかの実施形態によれば、約 20 nm ~ 約 150 nm であってもよい。レジスト 4-440 は、図 4-5C に示されているように検体ウェルを覆うようにパターンニングされてもよい。レジストをパターンニングするためのアラインメントは高い精度でなくてもよく、表面プラズモン構造を形成するために使用されることになる誘電体層 3-235 の隣接するエッチング領域を覆わずに検体ウェルを覆えばよい。

40

【0154】

図 4-5D に示されているように、導電性材料 4-512 又は導電体を含む材料の層は、この領域上に、何れの適当な堆積プロセスを使用して堆積されてもよい。材料 4-512 は、誘電体層のエッチングされた領域を充填してもよく、また 1つ又は複数の層 4-510、4-520 の上まで延びていてもよい。レジスト 4-440 と、レジストを覆う材料とは、その後、リフトオフプロセスによって除去されてもよい。結果として得られる構造は、図 4-5E に示されており、周辺の表面プラズモン構造とセルフアラインした検体

50

ウェルが残っている。検体ウェルは、窪み 3-216 を含む。

【0155】

いくつかの実施形態において、図 4-5A~図 4-5E に示されているプロセスは、窪み 3-216 を有さない検体ウェルを形成するために使用されてもよい。例えば、レジスト 4-440 は、誘電体層 3-235 がエッチングされる前に検体ウェル 2-211 の上にパターニングされてもよい。その後、誘電体層 3-235 がエッチングされてもよく、これによって表面プラズモン構造のパターンが誘電体層に転写されるが、空洞は形成されない。プロセスは、その後、図 4-5D 及び図 4-5E に示されているように進められてもよく、空洞を有さないセルフアラインによる検体ウェルが作られる。

【0156】

表面プラズモン構造に加えて、又はその代わりに、他の構造が検体ウェル 2-211 の付近にパターニングされて、検体ウェル内の励起エネルギーを増大させてもよい。例えば、いくつかの構造は入射励起電場の位相及び／又は振幅を変化させて、検体ウェル内の励起エネルギーの強度を増大させてもよい。図 4-6A は、入射励起エネルギーの位相及び振幅を変化させて、検体ウェル内の電磁放射の強度を増大させるために使用できる損失薄膜 4-610 を示している。

【0157】

いくつかの実施形態によれば、損失薄膜 4-610 は、励起エネルギーの強め合う干渉を生じさせてもよく、その結果、検体ウェルの励起領域内の電場が増強される。図 4-6B は、検体ウェルに入射する励起エネルギーの、損失薄膜 4-610 が検体ウェルに直に隣接して形成されていた場合の数値シミュレーションを示している。このシミュレーションに関しては、検体ウェルは直径約 80 nm で、厚さ約 200 nm の金の金属層内に形成されている。検体ウェルは、SCN を含み、励起エネルギーが検体ウェルを通じて伝播するのを抑制する。損失薄膜 4-610 は、厚さ約 10 nm であり、ゲルマニウムから形成され、二酸化シリコンを含む下の透明誘電体を覆う。損失薄膜は、検体ウェルの入口開口部を通して延びる。シミュレーションは、励起エネルギーの強度が検体ウェルの入口開口部で最高の数値であることを示している。この明るい領域 4-620 の励起エネルギーの強度は、検体ウェルの左右の強度の数値の 2 倍以上である。

【0158】

損失薄膜は、何れの適当な材料から製作されてもよい。例えば、損失薄膜は、屈折率 n が材料の減衰係数 k と略同じ大きさである材料から製作されてもよい。いくつかの実施形態において、損失薄膜は、屈折率 n が材料の減衰係数 k の数値と約 2 桁異なる材料から製作されてもよい。可視波長におけるこのような材料の非限定的な例は、ゲルマニウムとシリコンである。

【0159】

損失薄膜は何れの適当な厚さであってもよく、これは励起源に関連する特徴的波長に依存し得る。いくつかの実施形態において、損失薄膜の厚さは約 1 nm~約 45 nm であってもよい。他の実施形態において、損失薄膜の厚さは約 15 nm~約 45 nm であってもよい。さらに別の実施形態において、損失薄膜の厚さは約 1 nm~約 20 nm であってもよい。

【0160】

損失薄膜に対して、検体ウェルが形成される材料 2-221 からの反射、損失薄膜内の励起エネルギー損失、及び材料 2-221 内の励起エネルギー損失に与える影響が、図 4-6C のグラフに示されている。グラフでプロットされている 1 つの曲線は反射率曲線 4-634 を表し、材料 2-221 及び損失薄膜 4-610 からの反射が、損失薄膜の厚さが 0 nm から 100 nm へと変化するのに伴ってどのように変化するかを示している。反射率は、シミュレートされた実施形態によれば、約 25 nm で最小値に到達する。反射率の最小値は、励起エネルギーの特徴的波長と損失薄膜及び材料 2-221 に使用される材料とに応じて異なる厚さで発生する。いくつかの実装形態において、損失薄膜の厚さは、反射率が略その最小値にあるように選択される。曲線 4-632 は、薄膜の厚さに関する

10

20

30

40

50

薄膜内の損失を表し、曲線 4-636 は、薄膜の厚さに関する金属内の損失を表す。

【0161】

いくつかの実施形態において、損失薄膜 4-610 は、図 4-6D に示されているように、検体ウェル 2-211 及び材料 2-221 から離間されていてもよい。例えば、薄い誘電体層 4-620（例えば、酸化シリコン SiO_x ）が損失薄膜の上に形成されてもよく、検体ウェル 2-211 は誘電体層 4-620 に隣接して形成されてもよい。誘電体層 4-620 の厚さは、1つの実施形態によれば、約 10 nm～約 150 nm であってもよいが、いくつかの実施形態において他の厚さが使用されてもよい。

【0162】

損失薄膜は、単独の層として描かれているが、2つ以上の材料の複数の層を含んでいてもよい。いくつかの実装形態において、損失薄膜 4-610 と誘電体層 4-620 との交互の層を含む多層積層体が、図 4-6E に示されているように検体ウェル 2-211 に隣接して形成されてもよい。いくつかの実装形態によれば、積層体内の損失薄膜 4-610 の厚さは約 5 nm～約 100 nm であってもよく、積層体内の誘電体層 4-620 の厚さは約 5 nm～約 100 nm であってもよい。いくつかの実装形態において、多層積層体は、二酸化シリコンの層（厚さ 4.2 nm）、シリコンの層（厚さ 14.35 nm）、及びゲルマニウム層（厚さ 6.46 nm）を含んでいてもよいが、他の実施形態では他の厚さが使用されてもよい。いくつかの実装形態において、多層積層体は、二酸化シリコンの層（厚さ約 4.2 nm）、シリコンの層（厚さ約 14.4 nm）、及びゲルマニウムの層（厚さ約 6.5 nm）を含んでいてもよいが、他の実施形態においては他の厚さが使用されてもよい。

【0163】

損失薄膜は、入射放射に対して少なくとも一部の損失を示す、何れの適当な材料から製造されてもよい。いくつかの実装形態において、損失薄膜は半導体材料、例えばシリコンとゲルマニウムを含んでいてもよいが、他の材料が使用されてもよい。いくつかの実装形態において、損失薄膜は無機材料又は金属を含んでいてもよい。いくつかの実装形態において、損失薄膜は半導体合金又は化合物を含んでいてもよい。例えば、損失薄膜は、Si（57.4 重量%）、Ge（25.8 重量%）、及び SiO_2 （16.8 重量%）を含む合金を含んでいてもよいが、他の実施形態においては他の比率と組成物が使用されてもよい。

【0164】

いくつかの実施形態によれば、損失薄膜は、何れの適当なブランケット堆積プロセス、例えば物理堆積プロセス、化学蒸着プロセス、スピノングプロセス、又はそれらの組合せを使用して基板上に形成されてもよい。いくつかの実装形態において、損失薄膜は堆積後に処理されてもよく、例えば、バーク、アニール、及び／又はイオン打ち込みが行われる。

【0165】

検体ウェル内の励起エネルギーを増大させるために、上記に加えて、又はその代わりに他の位相／振幅変更構造が使用されてもよい。いくつかの実装形態によれば、図 4-7A に示されるように、反射積層体 4-705 は検体ウェル 2-211 から離間されていてもよい。いくつかの実装形態において、反射積層体は、交互に屈折率の異なる材料の誘電体の積層体を含んでいてもよい。例えば、第一の誘電体層 4-710 は第一の屈折率を有していてもよく、第二の誘電体層 4-720 は、第一の屈折率と異なる第二の屈折率を有していてもよい。反射積層体 4-705 は、いくつかの実装形態において、励起エネルギーに対して高い反射率を示し、検体ウェル内のエミッタからの放射放出に対して低い反射率を示してもよい。例えば、反射積層体 4-705 は、励起エネルギーに対して約 80% を超える反射率を示し、検体からの放出に対して約 40% 未満の反射率を示してもよいが、いくつかの実装形態においてはその他の反射率の数値が使用されてもよい。励起エネルギーを透過させる誘電体層 4-730 は、反射積層体と検体ウェルとの間に位置付けられてもよい。

【0166】

いくつかの実装形態によれば、図4-7Aに示されている反射積層体4-705は、その中に検体ウェル2-211が形成される材料2-221との共振器を形成してもよい。例えば、反射積層体は材料2-221から、誘電材料4-730内の励起エネルギーの波長の半分又はその整数倍と略等しい距離だけ離間されていてもよい。共振器を形成することによって、励起エネルギーは、反射積層体を通し、共振し、材料2-221と反射積層体4-705との間の空間において生成されてもよい。これによって、検体ウェル2-211内の励起強度を高めることができる。例えば、強度は、いくつかの実装形態において、共振器の構造内で2倍超、いくつかの実装形態において5倍超、いくつかの実装形態においてさらに10倍超だけ増大してもよい。

10

【0167】

図4-7B及び図4-7Cに示されるように、その他の構造が検体ウェルに近接して追加されてもよい。いくつかの実装形態によれば、図4-7Bに示されているように、誘電体層4-730の第二の屈折率より高い第一の屈折率を有する誘電プラグ4-740が検体ウェル2-211に隣接して形成されてもよい。プラグは、検体ウェルのそれと略等しい直径を有する円筒形であってもよいが、他の形状及び大きさが使用されてもよい。そのより高い屈折率のために、誘電プラグ4-740は、励起エネルギーを濃縮し、検体ウェルに案内してもよい。

【0168】

プラグ4-740等の誘電体構造は、いくつかの実装形態によれば、反射積層体4-705があってもなくても使用されてよい。このような誘電体構造は、誘電体共振アンテナと呼ばれてもよい。誘電体共振アンテナは、何れの適当な形状を有していてもよく、例えば円筒形、長方形、正方形、多角形、台形、又は角錐形である。

20

【0169】

図4-7C及び図4-7Dは、いくつかの実装形態によれば、検体ウェル2-211に近接して形成されてもよいフォトリソニックバンドギャップ(PBG: photonic band gap)構造を示す。フォトリソニックバンドギャップ構造は、光学コントラスト構造4-750の規則的なアレイ又はラティスを含んでいてもよい。光学コントラスト構造は、いくつかの実装形態によれば、周辺の誘電材料の反射率と異なる反射率を有する誘電材料を含んでいてもよい。いくつかの実装形態において、光学コントラスト構造4-750は、周囲の媒体と異なる損失値を有していてもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェル2-211は、図4-7Dに示されているように、ラティスの欠陥に位置付けられてもよい。様々な実装形態によれば、フォトリソニックラティスの欠陥は、光子を欠陥の領域に閉じ込めてもよく、これは検体ウェルにおける励起エネルギーの強度を増大できる。反射積層体4-705と組み合わせると、検体ウェルにおける閉じ込めを三次元にすることができる。フォトリソニックバンドギャップ構造による閉じ込めは、実質的に、基板の表面に対して横断方向の2次元であり得る。いくつかの実装形態において、フォトリソニックバンドギャップ構造は、反射積層体を設けずに使用されてもよい。

30

【0170】

図4-6A～図4-7Dに示されている励起-結合構造を製造するために、様々な方法が考案されてきた。いくつかの実装形態によれば、平坦な薄膜(例えば、交互に異なる屈折率を有する誘電体膜)を必要とする構造が、平坦堆積プロセスによって形成されてもよい。平坦堆積プロセスは、物理的堆積(例えば、電子ビーム蒸着又はスパッタリング)又は化学蒸着プロセスを含んでいてもよい。例えば図4-7Bに示されている誘電体共振アンテナ4-740又は図4-7Cに示されている光学コントラスト構造4-750等の、3次元形状で形成される個別の埋め込み型誘電体を必要とする構造は、例えば、リソグラフィパターンニングと、パターンを基板にエッチングするためのエッチングプロセスとを使用して、また誘電層の堆積と基板の平坦化とを使用して形成されてもよい。また、誘電体共振アンテナ及びフォトリソニックバンドギャップ構造を検体ウェル2-211に近接して形成するためのセルフアライン式加工技術も想定される。

40

50

【0171】

図4-8A~図4-8Gは、図4-7Cに示されているようなフォトリソバンドギャップ構造セルフライン式の検体ウェルを形成するために使用できる1つのみのセルフライン式のプロセスに関連する構造を示す。いくつかの実施形態によれば、反射積層体4-705がまず、図4-8Aに示されているように、基板上の、誘電層3-235の上方に形成されてもよい。次に、第二の誘電層4-730が反射積層体の上に堆積されてもよい。誘電体層4-730の厚さは、材料中の励起エネルギーの波長の約半分又はその整数倍と略等しくてもよい。その後、図4-4A~図4-4Eに関連して説明したプロセス工程を実行して、誘電体層4-730の上のピラー4-420、及びフォトリソバンドギャップ構造のためにエッチングされた特徴物4-810のパターンを形成してもよい。エッチングされた特徴物は、誘電体層4-730内に、また任意選択により反射積層体4-705内まで延びていてもよい。その結果得られた構造は、図4-8Aに示されるように見え得る。

10

【0172】

ピラー4-420を覆うレジスト4-440が基板から剥離されてもよく、図4-8Bに示されるように、コンフォーマルデポジションが行われてエッチングされた特徴物に充填材料4-820が充填されてよい。充填材料4-820は、いくつかの実施形態によれば、ピラー4-420を形成するために使用されるものと同じ材料であってもよい。例えば、充填材料4-820とピラー4-420とは窒化シリコンで形成されてもよく、誘電体層4-730は酸化物、例えば SiO_2 を含んでいてもよい。

20

【0173】

その後、異方性エッチングが実行されて、充填材料4-820がエッチバックされてもよい。いくつかの実施形態によれば、充填材料がエッチバックされて、誘電体層4-730の表面が露出されてもよく、その結果、図4-8Cに示されるような構造が得られる。エッチングにより、当初のピラー4-420と、充填材料4-820から残る側壁4-822を含むピラー4-830とが残ってもよい。

【0174】

その後、図4-8Dに示されているように、レジスト4-440が基板の上にパターニングされてもよい。例えば、レジストは、基板、レジスト内にパターニングされた穴、及びレジストの、ピラー4-830の周辺領域を開放するために現像されたレジストを被覆してもよい。穴とピラーとの整列は、高い精度である必要はなく、誘電体層4-730に埋め込まれる下のフォトリソバンドギャップ構造を露出せずに、ピラー4-830が露出すればよい。

30

【0175】

ピラー4-830が露出した後、等方性エッチングを使用してピラーの横断方向の寸法が減じられてもよい。いくつかの実施形態によれば、その結果として得られるピラーの形状は、図4-8Eに示されているように見え得る。その後、レジスト4-440が基板から剥離されてもよく、材料2-221又は材料の層がその領域の上に堆積されてもよい。いくつかの実施形態において、材料2-221は、CMPプロセスを使用してエッチバックされてもよく、それによって図4-8Fに示されるようにその領域が平坦化される。その後、選択的ドライ又はウェットエッチングを使用して、残っているピラー構造を除去してもよく、図4-8Gに示されるように、検体ウェル2-211が残る。図に示されているように、検体ウェル2-211は、誘電体層4-730内にパターニングされるフォトリソバンドギャップ構造とセルフアラインされる。

40

【0176】

代替的なプロセスとして、充填材料4-820は、ピラー4-420を形成するために使用される材料と異なる材料を含んでいてもよい。このプロセスにおいて、図4-8D及び図4-8Eに関連する工程は省略されてもよい。材料2-221の堆積及び平坦化後、図4-8Fに示されているように、選択的エッチングを実行してピラー4-420を除去してもよい。これによって、検体ウェル2-211を裏打ちする充填材料4-820の側

50

壁が残ってもよい。

D. 非放射励起－結合構造

本開示は、励起エネルギーの検体ウェル内の検体への非放射結合のための構造を提供する。非放射結合構造の1つのみの実施形態が図4-9Aに示されている。いくつかの実施形態によれば、非放射結合構造は、検体ウェル2-211に直接隣接して形成された半導体層4-910を含んでいてもよい。半導体層4-910は、いくつかの実施形態においては有機半導体であってもよく、又はいくつかの実施形態においては無機半導体であってもよい。いくつかの実装形態において、窪み3-216は、半導体層内に形成されてもされなくてもよい。半導体層4-910の厚さは、いくつかの実施形態によれば、約5nm～約100nmであってもよいが、いくつかの実施形態においては他の厚さが用いられてもよい。いくつかの実装形態によれば、励起源からの励起エネルギー又は光子4-930は半導体層4-910に衝突し、励起子4-920を生成してもよい。励起子は、検体ウェルの表面へと拡散してもよく、ここで、これらは非放射的に再結合し、エネルギーを検体ウェルの壁に隣接する検体へと移動させてもよい。

【0177】

図4-9Bは、半導体層4-912が励起エネルギーからのエネルギーを検体に非放射的に移動するために使用できる別の実施形態を示している。いくつかの実施形態において、半導体層4-912は、図面に示されているように、検体ウェルの底部又は検体ウェル2-211の窪みに形成されてもよい。半導体層4-912は、いくつかの実施形態によれば、接着剤を検体ウェルの底部に堆積させるためのプロセス工程に関連して本明細書に記載されている指向性堆積プロセスを使用して検体ウェル内に形成されてもよい。半導体層4-912の厚さは、いくつかの実施形態によれば約5nm～約100nmであってもよいが、他の実施形態においては他の厚さが使用されてもよい。入射放射は、半導体層内に励起子を生成してもよく、これは、その後、検体ウェル2-211の底面へと拡散してもよい。その後、励起子は検体ウェル内の検体にエネルギーを非放射的に移動してもよい。

【0178】

本開示はまた、励起エネルギーを検体に移動するための複数の非放射的経路を提供してもよい。いくつかの実施形態によれば、図4-9Cに示されているように、エネルギー移動粒子4-940が検体ウェル内に堆積されてもよい。エネルギー移動粒子は、いくつかの実施形態においては量子ドットを含んでいてもよく、いくつかの実施形態においては分子を含んでいてもよい。いくつかの実装形態において、エネルギー移動粒子4-940は、結合分子を通じて検体ウェルの表面に対して官能基化されてもよい。薄い半導体層4-910は、図に示されているように、検体ウェルに近接して、又は検体ウェル内に形成されてもよく、励起子が半導体層内で、半導体層に入射する励起エネルギーから生成されてもよい。励起子は、検体ウェルの表面へと拡散し、エネルギーを非放射的にエネルギー移動粒子4-940に移動させてもよい。その後、エネルギー移動粒子4-940は、エネルギーを検体ウェル内の検体3-101へと非放射的に移動させてもよい。

【0179】

いくつかの実装形態によれば、検体ウェル内に複数のエネルギー移動粒子4-940があってもよい。例えば、図4-9Cに示されている検体ウェル等、エネルギー移動粒子の層4-942が検体ウェル内に堆積されてもよい。

【0180】

いくつかの実装形態において、図4-9Dに示されているように、エネルギー移動粒子4-942又は単一エネルギー移動粒子4-940が検体ウェルの基部に堆積されてもよい。エネルギー移動粒子は、ウェル内の検体3-101に励起エネルギーを放射的又は非放射的に移動してもよい。例えば、エネルギー移動粒子は、入射エネルギーを吸収して、エネルギー移動粒子の励起状態を形成し、その後、エネルギーを検体3-101へと放射的また非放射的に移動させてもよい。

【0181】

いくつかの実装形態において、エネルギー移動粒子は、入射励起エネルギーを吸収し、その後、吸収された励起エネルギーの波長と異なる波長の放射エネルギーを再放出してもよい。その後、再放出されたエネルギーは、検体ウェル内の検体を励起するために使用されてもよい。図4-9Eは、ダウンコンバートエネルギー移動粒子に関連するスペクトルグラフを表す。いくつかの実装形態によれば、ダウンコンバートエネルギー移動粒子は量子ドットを含み、これは短波長放射（より高いエネルギー）を吸収し、1つ又は複数の、より長い波長の放射（より低いエネルギー）を放出してもよい。例示的吸収曲線4-952は、グラフでは、半径が6~7 nmの量子ドットに関する破線として示されている。量子ドットは、曲線4-954により示されている第一の放射バンドと、曲線4-956により示される第二の放射バンドと、曲線4-958により示される第三の放射バンドを放出してもよい。

10

【0182】

いくつかの実装形態において、エネルギー移動粒子は、励起源からのエネルギーをアップコンバートしてもよい。図4-9Fは、エネルギー移動粒子からのアップコンバージョンに関連するスペクトルを示している。いくつかの実装形態によれば、量子ドットは、約980 nmの放射で励起され、その後、グラフに示されているように、3つのスペクトルバンドの1つに再放出してもよい。第一のバンドの中心は約483 nmであってもよく、第二のバンドの中心は約538 nmであってもよく、第三のバンドの中心は約642 nmであってもよい。量子ドットから再放出された光子は、量子ドットを励起するために使用される放射の光子よりエネルギーが大きい。したがって、励起源からのエネルギーはアップコンバートされる。放出されるスペクトルバンドの1つ又は複数の検体を励起するために使用されてもよい。

20

E. 放出エネルギーのセンサへの誘導

アッセイチップ2-110は、機器の上のセンサによる放出エネルギーの回収を改善するために、1ピクセルごとに1つ又は複数の構成要素を含んでもよい。このような構成要素は、放出エネルギーをセンサへと空間的に誘導し、検体ウェル2-211からの放出エネルギーの指向性を増強するように設計されてもよい。表面光学系と遠隔場光学系との両方が、放出エネルギーをセンサへと誘導するために使用されてもよい。

1. 表面光学系

アッセイチップ2-110のピクセル内の、そのピクセルの検体ウェルの付近に位置付けられた構成要素は、検体により放出された放出エネルギーと結合するように構成されていてもよい。このような構成要素は、アッセイチップの2つの層間の界面に形成されてもよい。例えば、いくつかの放出エネルギー結合要素は、検体ウェルの層と、検体ウェルの層の、検体ウェルが形成される個所と反対側で隣接する層との間の界面に形成されてもよい。いくつかの例において、検体ウェル層の下にある層は誘電体層であり、放出エネルギー結合要素は、表面プラズモンをサポートしてもよい。他の実施形態において、検体ウェル層は、光学的に透明な材料に隣接する導電材料であってもよい。表面エネルギー結合要素は、検体ウェルからの放射放出物によって励起され、それと相互作用する表面光学構造であってもよい。

30

【0183】

回折格子周期、特徴物の大きさ、又は検体ウェルからの距離等、表面光学構造の特徴的な寸法は、放出エネルギーモーメントベクトルの平行成分を表面プラズモンのための表面波モーメントベクトルと最も多く結合するように選択されてもよい。例えば、放出エネルギーモーメントベクトルの平行成分は、いくつかの実装形態によれば、構造によりサポートされる表面プラズモンの表面波モーメントベクトルとマッチしてもよい。いくつかの実装形態において、検体ウェルから表面光学構造の縁又は特徴的特徴物までの距離dは、検体ウェルからの放出エネルギーを、例えば表面の法線又は表面の法線から角度θの傾斜等、選択された方向に誘導するように選択されてもよい。例えば、距離dは、放出物を表面に垂直に誘導するための表面プラズモン波長の整数であってもよい。いくつかの実装形態において、距離dは、表面プラズモン波長の分数又はその波長モジュロとなるように選択

40

50

されてもよい。

【0184】

いくつかの実施形態によれば、表面光学構造は、検体ウェルからの放射放出エネルギーを検体ウェル層に垂直方向へと誘導してもよい。連結されたエネルギーは、より狭い指向的放射パターンで法線方向に誘導されてもよい。

【0185】

表面光学構造の一例は、同心円回折格子である。放出エネルギーをピクセルの1つ又は複数のセンサへと誘導するために、アッセイチップのピクセルに、同心円回折格子構造が形成されてもよい。同心円回折格子構造は、検体ウェルの周囲に形成されてもよい。表面プラズモン構造としての同心円回折格子表面5-102の一例が図5-1に示されている。円形回折格子は、何れの適当な数の環を含んでいてもよく、図5-1に示される環の数(6)は非限定的な例である。円形回折格子は、導電層の表面から突出する環を含んでいてもよい。例えば、円形回折格子は、検体ウェルの層と検体ウェルの層の下に形成された誘電体層との界面に形成されてもよい。検体ウェル層は導電材料であってもよく、同心円回折格子は、導電材料と誘電体との間の界面に格子構造をパターンニングすることによって形成されてもよい。円形回折格子の環は、規則的な周期的間隔をあけたものであってもよく、又は環間に不規則的又は非周期的な間隔を有していてもよい。検体ウェルは、円形回折格子の中心に、又はその付近に位置付けられてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルは、円形回折格子の中心からずらして位置付けられてもよく、回折格子の中心から特定の距離の位置に位置付けられてもよい。いくつかの実施形態において、回折格子型の表面エネルギー結合構成要素は、螺旋回折格子も含んでよい。螺旋回折格子5-202の一例が図5-2に示されている。螺旋回折格子5-202は、導電フィルムの螺旋開口部を含んでいてもよい。螺旋回折格子の何れの適当な寸法が螺旋回折格子の形成に使用されてもよい。

【0186】

同心円回折格子は、何れの適当な数の環を有していてもよく、何れの適当な大きさであってもよい。例えば、これらに限定されないが、同心円回折格子は、半径が約234nm、約606nm、約1005nm、約1397nm、約1791nm、約2186nmの6つの環を有してよい。他の実施形態において、同心円の環は、2つ、3つ、4つ、又は8つの環を有していてもよい。

【0187】

図5-3Aは、検体ウェル2-211からの放出エネルギーに関する放射パターン5-302を示している。同心円回折格子構造2-223によって、放出エネルギーは、回折格子構造2-223がない状態で形成される放射パターンと比較して、指向性がより大きくなる。いくつかの実施形態において、放出エネルギーは、金属層2-221に垂直に下方に誘導される。放射パターンは、放出エネルギーを、光のほとんどがセンサに向かう実質的に同じ方向に集光されるように集光してもよい。いくつかの実施形態において、放射パターンは発光を、発光のほとんどが標的空間の下に中心を置き、センサに向かって下方に向かう狭いコラム様の形状を形成するように集光してもよい。いくつかの実施形態において、図5-3Bのプロットで示されているように、同心円回折格子は、1つの環について10超、2つの環について15超、3つの環について18超、4つの環について20超、又は1つの環について15超の指向性を提供してもよい。

【0188】

表面光学系又は表面プラズモン構造の別の例は、ナノアンテナ構造である。ナノアンテナ構造は、検体ウェルからの放出エネルギーを空間的に誘導するように設計されてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルの、ナノアンテナ構造に関する位置は、検体ウェルからの放出エネルギーを1つ又は複数のセンサに向かって特定の方向に誘導するように選択される。ナノアンテナは、放出エネルギーにより励起されると、指向性放射パターンを生成するように設計されたナノスケールダイポールアンテナ構造を含んでいてもよい。ナノアンテナは、検体ウェルの周囲に分散されていてもよい。指向性放射パターンは

、アンテナの電磁場を合計した結果であってもよい。いくつかの実施形態において、指向性放射パターンは、アンテナの電磁場と検体から直接放出される磁場を合計した結果であってもよい。いくつかの実装形態において、検体から直接放出される電場は、検体ウェルとナノアンテナ構造との間の表面プラズモンによって仲介されてもよい。

【0189】

ナノアンテナ構造を形成する個々のナノアンテナの寸法は、特定の分散パターンを生成するナノアンテナ構造全体の複合的能力に合わせて選択されてもよい。例えば、個々のナノアンテナの直径は、ナノアンテナ構造内で変化してもよい。しかしながら、いくつかの例において、直径はナノアンテナの集合内で同じであってもよい。他の実装形態において、ナノアンテナ構造全体を通じて、いくつかの選択された直径が使用されてもよい。いくつかのナノアンテナは、半径Rの円形に分散されてもよく、いくつかは、その縁から半径方向にシフトされてもよい。いくつかのナノアンテナは、半径Rの円の周囲に等間隔で離間されていてもよく（例えば、中心の位置が等しい極角分だけずれる）、いくつかはその円の周囲で等しい間隔からシフトされてもよい。いくつかの実施形態において、ナノアンテナは、検体ウェルの周囲で螺旋状に配置されてもよい。それに加えて、又はその代わりに、ナノアンテナの他の構成、例えば、検体ウェルの周囲のマトリクスアレイ、交差分布、及び星形分布も可能である。個々のナノアンテナは円以外の形状、例えば正方形、長方形、十字、三角形、蝶ネクタイ、環状、五角形、六角形、多角形等とすることもできる。いくつかの実施形態において、開口部又はディスクの円周は、略波長の分数の整数倍、例えば $(N/2)\lambda$ であってもよい。

【0190】

ナノアンテナアレイは、検体からの放出エネルギーを集束放射ローブに誘導してもよい。検体がエネルギーを放出すると、これは表面プラズモンを励起し、それが検体ウェルから検体ウェルの周囲に分散されたナノアンテナへと伝播する。したがって、表面プラズモンはナノアンテナの放射モード又はダイポールエミッタを励起し得、それが検体ウェル層の表面に垂直な放射を放出する。あるナノアンテナの励起モード又はダイポールの位相は、検体ウェルからのナノアンテナの距離に依存する。検体ウェルと個々のナノアンテナとの間の距離を選択することによって、ナノアンテナから放出される放射の位相を制御する。ナノアンテナで励起された空間放射モードは、ナノアンテナの形状及び／又は大きさに依存する。個々のナノアンテナの大きさ及び／又は形状を選択することによって、ナノアンテナから放出される空間放射モードを制御する。アレイ内の全てのナノアンテナ、及びいくつかの例においては検体ウェルからの寄与は、全体的な放射ローブ又は放射パターンを形成するローブを決定し得る。理解される点として、個々のナノアンテナから放出される位相と空間放射モードは波長に依存し得、それにより全体的な放射ローブ又は放射パターンを形成するローブも波長に依存することになる。電磁場の数値シミュレーションを用いて、異なる特徴的波長の放出エネルギーに関する全体的な放射ローブパターンを判定できる。

【0191】

ナノアンテナは、導電フィルム内の穴又は開口部のアレイを含んでいてもよい。例えば、ナノアンテナ構造は、導電性の検体ウェル層とその下の誘電体層との間の界面に形成されてもよい。穴は、中心点を取り囲む同心円状に分散された穴の集合を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルは、アレイの中心点に位置付けられ、他の実施形態において、検体ウェルは中心がずれていてもよい。円形に分散された穴の各集合は、円形分布の周囲で、小さい順に配置される、異なる直径の集合を含んでいてもよい。穴の直径は、集合間で異なってもよく（例えば、1つの集合内の最も小さい穴は、他の集合内の最も小さい穴より大きくてもよい）、最も小さい穴の位置は円の各集合に関して、異なる極角に向けられていてもよい。いくつかの実施形態において、ナノアンテナ内に、円形に分散された穴の集合が1〜7つであってもよい。他の実施形態において、集合は8つ以上であってもよい。いくつかの実施形態において、穴は円形でなくてもよく、何れの適当な形状であってもよい。例えば、穴は楕円形、三角形、長方形等であってもよい。他の実

施形態において、穴の分散は円形でなくてもよく、螺旋形状をなしてもよい。

【0192】

図5-4A及び5-4Bは、導電層の穴又は開口部からなる例示的なナノアンテナ構造を示している。図5-4Aは、アッセイチップの表面の上面図を示し、検体ウェル5-108は穴5-122により取り囲まれている。ナノアンテナの穴は、その中心が略半径Rの円周囲に分散されている。この非限定的な例において、穴の直径は、穴の縁の円周に沿って段階的に増加することによって変化する。図5-4Bは、図5-4Aに示されるアッセイチップの、線B-B'で切断した断面図の概略を示す。検体ウェル層5-116は、検体ウェル5-108と、ナノアンテナ構造の一部である開口部5-122を含む。アッセイチップの層5-118は、検体ウェル層5-116の下にある。層5-118は、誘電材料及び／又は光学的に透明な材料であってもよい。

10

【0193】

いくつかの実施形態において、ナノアンテナ構造は、複数のディスクを含んでいてもよい。ナノアンテナ構造のディスクは、導電性材料の表面から突出する導電ディスクとして形成されてもよい。導電性材料は、光学的に透明な材料に隣接していてもよい。いくつかの実施形態において、ナノアンテナは、検体ウェルの周囲に分散されていてもよい。いくつかの例において、ナノアンテナは略、検体ウェルの周囲の半径Rの円に分散されていてもよい。ナノアンテナアレイは略、検体ウェルの周囲の異なる半径の別の円の上に分散されたナノアンテナの複数の集合を含んでいてもよい。

【0194】

20

図5-5A及び5-5Bは、導電層から突出するディスクを含むナノアンテナ構造の例示的な実施形態を示す。図5-5Aは、アッセイチップの表面の上面図の概略を示し、検体ウェル5-208はディスク5-224により取り囲まれている。ナノアンテナディスクは、略、半径Rの円の周囲に分散されている。この非限定的な例において、ディスクには2つの直径が使用され、ディスクは、ナノアンテナの円の円周に沿って、交互にこれら2つの直径の何れかをとる。図5-5Bは、図5-5Aに示されるアッセイチップの、線C-C'に沿った断面図の概略を示す。検体ウェル層5-216は、検体ウェル5-208と、ナノアンテナ構造の一部であるディスク5-224を含む。ディスク5-224は、検体ウェル層5-216から特定の距離だけ突出する。いくつかの実施形態において、ディスクが検体ウェル層から延びる距離は、ナノアンテナ構造内で異なってもよい。アッセイチップの層5-218は、検体ウェル層5-216の下にある。層5-218は、誘電性材料及び／又は光学的に透明な材料であってもよい。検体ウェル層5-216及び突出するディスクは、導電性材料であってもよい。

30

【0195】

いくつかの実施形態において、ナノアンテナ構造は、中心が検体ウェルの近傍にあってもよい。ナノアンテナは何れの適当な形状をとってもよい。例えば、これらに限定されないが、ナノアンテナは円筒形、ディスク、又はキューブ等の対称形状であってもよい。ナノアンテナは、何れの適当な誘電性材料から製作されてもよく、例えば窒化シリコンがある。あるいは、酸化チタンが使用されてもよい。ナノアンテナの寸法は、使用される誘電材料に依存していてもよく、所望の増強を行うように調整されてもよい。いくつかの実施形態において、ナノアンテナは、幅が約800nm、深さが約1050nmであってもよい。ナノアンテナは、光のほとんどが実質的に同じ方向、例えば、図5-5Cに示されるように、標的空間及び対応するナノアンテナの下に中心があり、センサに向かって下に向かう狭いコラム様の形状に集光されるような、検体ウェルからの放出エネルギーの放射パターンであってもよい。いくつかの実施形態において、指向性は39.7と予想される。

40

【0196】

発光をセンサに向かって集光することに加えて、ナノアンテナは、検体ウェルへの励起エネルギーを増強させてもよい。ナノアンテナの下から標的空間に向かう励起エネルギーは、ナノアンテナに入り、ほとんどが標的空間で集束される。いくつかの実施形態において、幅400nm、高さ1050µmのナノアンテナの場合、検体ウェルにおける57.

50

4の増強が予想される。

2. 遠隔場光学系

いくつかの実施形態において、表面光学系の直下にある層はスペーサ層2-225であってもよく、これは何れの適当な厚さで、何れの適当な誘電材料から製作されていてもよい。スペーサ層は、例えば、厚さ10 μm で、二酸化シリコンから製作されていてもよい。あるいは、このスペーサ層は、48 μm 又は50 μm であってもよい。スペーサの下層は、追加のスペーサ層を有する1つ又は複数のレンズ層であってもよい。例えば、図5-6Aは、上側レンズ層5-601を示しており、これは少なくとも1つの屈折レンズを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、上側レンズ層は、検体ウェル層2-221の5 μm 下に位置付けられていてもよい。各検体ウェルに関連して1つ又は複数のレンズがあってもよい。いくつかの実施形態において、レンズアレイ、例えば屈折レンズアレイ等が使用されてもよい。いくつかの実施形態において、上側レンズ層5-601の各レンズは、中心が検体ウェル2-211の下にあり、例えば10.5 μm より小さい半径を有していてもよい。上側レンズ層は、例えば、これに限定されないが、窒化シリコン等の何れの適当な誘電材料から製作されてもよい。

10

【0197】

いくつかの実施形態において、上側レンズ層の寸法は以下のとおりである：d1は約12 μm であってもよく、d2は約2 μm であってもよく、隣接するレンズのd1間の距離は約20.966 μm であってもよく、レンズの曲率半径は約20.35 μm であってもよい。あるいは、d1は約8 μm であってもよく、d2は約6 μm であってもよい。

20

【0198】

上側レンズ層の真下の層は、何れの適当な材料で製作される構造及び／又は光学層5-605であってもよい。この構造及び／又は光学層5-605は、熔融シリカの形態の窒化シリコンで製作されてもよい。構造層の真下の層は、少なくとも1つの追加のレンズを含み得る下側レンズ層5-603であってもよい。いくつかの実施形態において、下側レンズ層5-603内の各レンズはまた、検体ウェルの下に中心があってもよい。下側レンズ層5-603は、例えば、これに限定されないが、窒化ケイ素等の何れの適当な誘電材料で製作されてもよい。上側レンズ層の上から下側レンズ層の底部までの距離は、100~500 μm であってもよい。下側レンズ層の真下の層は、励起エネルギーと放出エネルギーとの両方を通過させ、反射光の量を減少させる反射防止層を含んでいてもよい。反射防止層の真下の層は、チップが機器と整列し、その上に取り付けられるようにするための構造的構成要素を含んでいてもよい。チップ取付層の真下の層は、システムを損傷や埃を含む汚染物質から保護するための保護カバーを含んでいてもよい。

30

【0199】

図5-6Aは屈折層レンズを使用した2つレンズ層を示しているが、何れの適当なレンズが使用されてもよい。例えば、フレネルレンズ、マイクロレンズ、屈折レンズペア、及び／又はフラットレンズが使用されてもよい。図5-6Bは、構造及び／又は光学層5-605により分離された上側レンズ層5-611と下側レンズ層5-613との両方にフレネルレンズを使用した実施形態を示している。

【0200】

40

いくつかの実施形態において、チップ内の上述の層間の界面の何れも、反射防止コーティング又は反射防止層を含んでいてもよい。上側レンズ層と第二のレンズ層とは何れも検体ウェルの下に配置されて、検体ウェルのアレイから放出された発光を機器のリレーレンズに集光してもよい。検体ウェル層の底部から標的空間からの発光の焦点までの距離は、例えば約30.3 mmであってもよい。この焦点は、リレーレンズ内の、例えばリレーレンズの長さ方向の中心点にあってもよい。

III. 機器の構成要素

A. 機器の顕微鏡層

いくつかの実施形態において、機器は顕微鏡層を含んでいてもよく、図6-1に示されているようなサブレイヤを含んでいてもよい。特に、顕微鏡層はサブレイヤを含んでいて

50

もよく、これは角度 θ だけ傾けられて、励起エネルギーをアッセイチップに誘導するポリクロイックミラー 2-230 を含む。このポリクロイックミラーは実質的に誘電体であってもよく、励起エネルギーを反射し、その一方で検体からの放出エネルギーをアッセイチップ上の検体ウェルの 1 つ又は複数へと透過させる。任意選択により、追加の誘電体層を含む非点収差補償要素 6-101 がポリクロイックミラーの下に提供されて、同じ角度 θ であるが、ポリクロイックミラーの傾斜のそれに直交する軸の周囲で傾斜されていてもよく、それによってポリクロイックミラーにより導入される非点収差が補償される。図 6-1 において、非点収差補償要素 6-101 は、上側フィルタと同じ平面内で傾けられているように示されているが、図は、上側フィルタに関する傾斜も表しており、非点収差補償要素 6-101 の向きを何れの方法でも限定しようとしていないと理解するべきである。この非点収差補償要素 6-101 はまた、さらにフィルタ処理を行うこともできる。例えば、非点収差補償要素 6-101 は、別のポリクロイックミラーであってもよく、これは励起エネルギーをさらにフィルタ処理し、その一方で放出エネルギーを透過させる。レンズ 6-103 は非点収差補償要素 6-101 の下に提供されてもよく、これは検体ウェルからの放出エネルギーの処理をさらに促進する。レンズ 6-103 は、例えば、直径が 25.4 μm であってもよいが、何れの適当な直径が使用されてもよい。いくつかの実施形態において、レンズは複数のレンズ要素を含むリレーレンズである。例えば、リレーレンズは、6 つの別々のレンズ要素を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、リレーレンズは長さ約 17.5 mm であってもよい。レンズ 6-103 の前又は後で追加のフィルタ処理要素を使用し、励起エネルギーをさらに拒絶して、それがセンサに届かないようにしてもよい。

10

20

B. センサチップ

検体ウェル内の検体から放出された放出エネルギーは、様々な方法でピクセルのセンサへと伝えられ得、そのいくつかの例を以下に詳しく説明する。いくつかの実施形態は、光学及び／又はプラズモン構成要素を使用して特定の波長の光がセンサのうち、専らその特定の波長の光を検出する領域又は部分に誘導される可能性を高めてもよい。センサは、異なる波長の放出エネルギーを同時に検出する複数のサブセンサを含んでいてもよい。

【0201】

図 6-2 A は、少なくとも 1 つの選別要素 6-127 が使用されて、特定の波長の放出エネルギーをそれぞれのサブセンサ 6-111、6-112、6-113、及び 6-114 に誘導するいくつかの実施形態によるセンサチップの単一ピクセルの概略図である。放出エネルギー 2-253 は、検体ウェルからアッセイチップ及び機器の光学システムを通過して移動し、最終的にセンサチップの選別要素 6-127 に到達する。選別要素 6-127 は、放出エネルギー 2-253 の波長を空間自由度に結合し、それによって放出エネルギーを、選別放出エネルギーと呼ばれるその構成波長成分に分離する。図 6-2 A は、放出エネルギー 2-253 が誘電材料 6-129 を通る 4 つの選別放出エネルギー経路に分離され、4 つの経路の各々がピクセルのサブセンサ 6-111~6-114 に関連付けられることを概略的に示している。このようにして、各サブセンサは、スペクトルの異なる部分に関連付けられ、センサチップの各ピクセルのための分光計を形成する。

30

【0202】

放出エネルギーの異なる波長を分離するために、何れの適当な選別要素 6-127 が使用されてもよい。実施形態は、光学又はプラズモン要素を使用してよい。光学選別要素の例としては、ホログラム回折格子、位相マスク回折格子、振幅マスク回折格子、及びオフセットフレネルレンズが含まれるが、これらに限定されない。プラズモン選別要素の例としては、フェーズドナノアンテナアレイ及びプラズモン準結晶が含まれるが、これらに限定されない。

40

【0203】

図 6-2 B は、特定の波長の放出エネルギーをそれぞれのサブセンサに誘導して、他の波長の放出エネルギーを他のサブセンサに到達するのを防止するために、フィルタ処理要素 6-121、6-122、6-123、及び 6-124 が使用されるいくつかの実施形

50

態によるセンサチップの1つのピクセルの概略図である。放出エネルギー2-253は、検出ウェルからアッセイチップ及び機器の光学システムを通して移動し、最終的にフィルタ処理要素6-121~6-124の1つに到達する。フィルタ処理要素6-121~6-124は、各々が特定のサブセンサ6-111~6-114に関連付けられ、各々がそれぞれの波長の放出エネルギーの透過と別の波長の放出エネルギーの拒絶を、放出エネルギー（図6-1Bでは示されていない）を吸収し、及び／又は放出エネルギーを反射することによって行うように構成されている。それぞれのフィルタ処理要素を通過した後、フィルタ処理された放出エネルギーは誘電材料6-129を通り、ピクセルの対応するサブセンサ6-111~6-114に衝突する。このようにして、各サブセンサはスペクトルの異なる部分に関連付けられ、センサチップの各ピクセルのための分光計を形成する。

10

【0204】

放出エネルギーの異なる波長を分離するために、何れの適当なフィルタ処理要素が使用されてもよい。実施形態は、光学又はプラズモンフィルタ要素を使用してもよい。光学選別要素の例としては、反射多層誘電フィルタ又は吸収フィルタが含まれるが、これらに限定されない。プラズモン選別要素の例には、特定の波長のエネルギーを透過させるように設計された周波数選択表面とフォトリソニックバンドギャップ結晶が含まれるが、これらに限定されない。

【0205】

上述の選別要素とフィルタ処理要素の代わりに、又はこれらに加えて、追加のフィルタ処理要素が各サブセンサ6-111~6-114に隣接して設置されてもよい。追加のフィルタ処理要素は、特定の波長の放出エネルギーのための強め合う干渉を作るように構成された損失薄膜を含んでいてもよい。損失薄膜は、単層膜でも多層膜でもよい。損失薄膜は、何れの適当な材料から製作されてもよい。例えば、損失薄膜は、屈折率 n が減衰係数 k と略同じ大きさである材料から製作されてもよい。他の実施形態において、損失薄膜は、屈折率 n が材料の減衰係数 k の数値から約2桁の差以内である材料から製作されてもよい。可視波長でのこのような材料の非限定的な例は、ゲルマニウム及びシリコンである。

20

【0206】

損失薄膜は、何れの適当な厚さであってもよい。いくつかの実施形態において、損失薄膜の厚さは1~45 nmであってもよい。他の実施形態において、損失薄膜の厚さは15~45 nmであってもよい。また別の実施形態において、損失薄膜の厚さは1~20 nmであってもよい。図6-3Aは、損失薄膜6-211~6-214の各々が、少なくとも一部に、各サブセンサ6-111~6-114に関連付けられる波長により決定される、異なる厚さを有する実施形態を示している。薄膜の厚さは、少なくとも一部に、選択的に損失薄膜を通してサブセンサに至る異なる波長を決定する。図6-3Aに示されているように、損失薄膜6-211の厚さは d_1 であり、損失薄膜6-212の厚さは d_2 であり、損失薄膜6-213の厚さは d_3 であり、損失薄膜6-214の厚さは d_4 である。後続の各損失薄膜の厚さは、 $d_1 > d_2 > d_3 > d_4$ となるように、前の損失薄膜より小さい。

30

【0207】

それに加えて、又はその代わりに、損失薄膜は、異なる特性の異なる材料で形成されてもよく、異なる波長の放出エネルギーは、それぞれのサブセンサの各々で強め合うように干渉する。例えば、屈折率 n 及び／又は減衰係数 k は、特定の波長の放出エネルギーの透過を最適化するように選択されてもよい。図6-3Bは、厚さは同じであるが各損失薄膜が異なる材料から形成されている損失薄膜6-221、6-222、6-223、及び6-224を示している。いくつかの実施形態において、損失薄膜の材料と損失薄膜の厚さは何れも、所望の波長の放出エネルギーが強め合うように干渉し、膜を透過するように選択されてもよい。

40

【0208】

図6-1は、回折要素とレンズとの組合せが、波長による放出エネルギーの選別に使用される実施形態を示す。センサチップの第一の層6-105は、ブレード位相格子を含

50

んでいてよい。ブレード格子は、例えば実質的に40度と等しい角度 Φ のブレードを有していてもよく、ブレード格子のラインスペース(A)は実質的に1.25 μm と等しくてもよい。当業者であればわかるように、異なるブレード角度及び周期を使用して、放出エネルギーの異なる波長の光の分離を実現してもよい。さらに、放出エネルギーの異なる波長を分離するために、何れの適当な光学要素が使用されてもよい。例えば、位相マスク、振幅マスク、ブレード格子、又はオフセットフレネルレンズが使用されてもよい。

【0209】

センサチップ2-260の第二の層6-106は、第一の層6-105の下に配置された1つ又は複数のフレネルレンズを含んでいてもよく、それによって放出エネルギーをさらに選別し、センサ6-107へと誘導する。さらに、放出エネルギーの異なる波長をさらに分離するために、何れの適当なレンズ要素が使用されてもよい。例えば、フレネルレンズの代わりに屈折レンズが使用されてもよい。

10

【0210】

第三のレンズ層のフレネルレンズとブレード位相格子とは、まとめて回折光学要素(DOE)と呼ぶことができる。いくつかの実施形態において、DOEの厚さは、幅が約10マイクロメートル~30マイクロメートルの範囲である場合、約400~600 μm の範囲である。エアスペース層はDOEの真下に位置付けられていてよく、厚さは、いくつかの実施形態において約150 μm であってもよい。あるいは、スペース層は、DOEの焦点距離と同じ光学的厚さを有し、及び/又は二酸化シリコンで製作されてもよい。

20

【0211】

図6-1の各種の構成要素は、何れの適当な距離で離間されていてもよい。例えば、センサの表面は、フレネルレンズ層6-106の下5 μm の距離に位置付けられていてもよく、顕微鏡層のレンズ6-103の中心からフレネルレンズ層6-106までの距離は50.6 mmであってもよく、ブレード位相格子6-105は、センサの表面上方約100 μm の距離に位置付けられてもよい。あるいは、アッセイチップの底部から回折格子6-105の上部までの距離は、約53 mmであってもよい。センサ層の幅は約10 mmであってもよい。フレネルレンズは、層内で相互に、約10マイクロメートル、約20マイクロメートル、及び約30マイクロメートルの距離だけ離間されていてもよい。

【0212】

いくつかの実施形態において、オフセットフレネルレンズが使用されてもよく、この場合、フレネルレンズの中心は、図6-1に示されているように、レンズ6-103のようなレンズの中心からずれていてもよい。オフセットフレネルレンズの中心は、約50マイクロメートル、約60マイクロメートル、約70マイクロメートル、又は約80マイクロメートルだけずれていてもよいが、他の距離もあり得る。いくつかの実施形態において、オフセットフレネルレンズは第二のオフセットを有していてもよく、これはオフセットフレネルレンズの中心からセンサの中心までのオフセットであり、これは、例えば、10 μm 又は100 μm のオーダーであってもよいが、他の距離もあり得る。オフセットフレネルレンズは、任意の好適な方法で作成することができる。例えば、各々の異なる格子ピッチを有する2つの区間とを重ねて、バイナリオフセットフレネルレンズ構造より効率化されたシングルオフセットフレネルを作成してもよい。いくつかの実施形態において、ピッチ220 nmの「小さい」区間とピッチ440 nmの「大きい」区間とを重ねて、図のようなオフセットフレネルレンズを製作してもよい。オフセットフレネルレンズアレイは、センサアレイの上に位置付けられてもよく、オフセットフレネルレンズ要素の中心からセンサ中心までの横方向にずれていてもよく、約80マイクロメートル~約150マイクロメートルの範囲の焦点距離で動作するように設計され、波長625 nm用に設計されてもよい。

30

40

【0213】

画像化光学系及びエアスペース層の真下の層は、センサ層であってもよい。センサ層は、CMOS感光センサを含む複数のセンサを含んでいてもよい。センサ層は、何れの適当な厚さを有していてもよく、これには約6マイクロメートル~約8マイクロメートルの範

50

囲を含む。あるいは、センサ層の厚さは $2\text{ }\mu\text{m}$ ～ $15\text{ }\mu\text{m}$ の範囲であってもよい。センサは、複数のセグメント又はピクセルに分離されてもよく、幅は約 $21\text{ }\mu\text{m}$ であってもよい。センサ層の上部から放出エネルギーの焦点までの距離は、約 30.3 mm であってもよい。

【0214】

アッセイチップ及び機器の各種の層は、上述の順序である必要はない。いくつかの実施形態において、機器の集光及び／又は選別要素と画像化光学系は逆の順序であってもよい。例えば、ブレード位相格子6-105は、フレネルレンズ層6-106の後に設置されてもよい。あるいは、集光及び／又は選別要素と画像化光学系は、1つの回折光学要素(DOE)に組み込まれてもよい。これに加えて、アッセイチップ及び機器の各種の構成要素は、例えば、画像化光学系が集光及び／又は選別要素の上下の両方にあり得るように組み合わせることができる。

10

【0215】

システム内の上述した層間の界面は全て、空気とシステムの層との間の界面を含め、反射防止コーティングを含んでいてもよい。

C. 機器の光ブロック

いくつかの実施形態において、機器1-120の光ブロックは、上述の光学構成要素の一部又は全部を含んでいてもよい。光ブロックは、図6-4Aにおいて配置されているような光学構成要素を提供してもよい。図6-4Aは、図6-4Aに示され光学構成要素を通過する、 λ_1 及び λ_2 を有する光を示している。上述の構成要素に加えて、光ブロックは、励起エネルギーの第一の波長、 λ_1 を搬送する第一の光ファイバが接続されていてもよい第一のファイバコネクタ6-401と、励起エネルギーの第二の波長、 λ_2 を搬送する第二の光ファイバが接続されてもよい第二のファイバコネクタ6-402とを含んでいてもよい。例として、ただし限定ではないが、励起エネルギーの第一の励起波長は $630\sim 640\text{ nm}$ であってもよい。光ファイバコネクタは、FC又はLCコネクタ等、何れの適当な従来のコネクタであってもよい。2つの異なる波長が入力される場合、波長は、ダイクロイック又はポリクロイックミラー等の波長コンバイナ6-403で合成されてもよい。第二の励起波長は $515\sim 535\text{ nm}$ であってもよい。入力励起エネルギーは、線形偏光等の何れの適当な偏光であってもよい。いくつかの実施形態において、励起エネルギーを搬送するファイバは、偏光維持ファイバであってもよい。任意選択により、励起フィルタと偏光板、例えば光ファイバー自由空間カブラが、光ファイバ入力の後で使用されて、励起エネルギーをさらにフィルタ処理し、又はその特徴を変化させてもよい。

20

30

【0216】

光ブロックは、レンズ、及びビーム整形等の光学処理のためのその他の光学構成要素を保持するために、1つ又は複数の金属筐体を含んでいてもよい。図6-4Aは、4つの金属筐体6-405～6-408を示しており、各々がレンズ及び／又はその他の光学構成要素を保持する。励起エネルギーをコリメートし、集光するために使用されるレンズはいくつであってもよい。励起エネルギーをアッセイチップ2-110に向かって案内するために、1つ又は複数のミラー6-411及び6-412が金属筐体内のいくつかの間に配置される。図6-4Aにおいて、第一のミラー6-411は励起エネルギーを第二の筐体6-406から第三の筐体6-407に誘導し、第二のミラー6-412は励起エネルギーを第四の筐体6-408からポリクロイック誘電ミラー2-230へと反射する。ポリクロイック誘電ミラー2-230は、励起エネルギーを非点収差補償フィルタ6-601へと誘導する。

40

【0217】

いくつかの実施形態において、円形偏光は検体ウェル内に誘導されてもよく、それによって発光マーカを同様の強度で発光させる。1/4波長板は線形偏光を、それがアッセイチップに到達する前に円形偏光に変換するために使用されてもよい。ポリクロイック誘電ミラー2-230は、励起エネルギーを1/4波長板6-415に誘導する。図6-4Aに示されるように、1/4波長板6-415は、非点収差補償フィルタ6-101とアッ

50

セイチップ 2-110 との間に配置されてもよい。したがって、円形偏光された励起エネルギーはアッセイチップ上の複数のピクセルに向けて誘導される。ピクセルに誘導されない励起エネルギーは、ビームダンパ構成要素 6-417 により吸収されてもよい。1 つ又は複数の検体ウェル内の検体に到達する励起エネルギーによって、検体は放出エネルギーを放出し、これはセンサ 2-260 に向かって誘導される。放出エネルギーは、偏光光学系、非点収差補償要素 6-101、ポリクロイックミラー 2-230、及びリレーレンズ 6-103 等の光学構成要素を通過してもよい。ポリクロイックミラーはフィルタとして機能し、これは、例えばノッチフィルタ、スパイクフィルタ、又はカットオフフィルタであってもよい。リレーレンズ 6-103 は、放出エネルギーをセンサに向かって結像してもよい。放出エネルギーの一部は次に、センサ 2-260 の上方に位置付けられた 1 つ又は複数の放出フィルタ 6-421 及び 6-422 を通過してもよく、これはさらに放出エネルギーをフィルタ処理してもよい。いくつかの実施形態において、放出フィルタはフィルタの透過特性を調整し、及び／又は後方反射による干渉を軽減するために、入射放射エネルギー伝播方向に関して斜めに傾斜されてもよい。上側フィルタ 6-421 が角度 θ で傾斜されると、下側フィルタ 6-422 は、同じ角度 θ で、ただし上側フィルタの傾斜の軸に直交する軸の周囲で傾斜されてもよく、それによって放出放射ビーム経路内に非点収差が確実に導入されなくなる。

【0218】

図 6-5 は、アッセイチップ 2-110 からセンサチップ 2-260 まで、装置を通過する光路を表すレイアウトの一例を示す。アッセイチップ 2-110 内の各始点は、放出エネルギーを放出するピクセルを表し、システムによって、センサチップ 2-260 上の対応するピクセルに結像される。光路は、約 55.4 mm の距離に沿って存在していてもよいが、何れの適当な距離が使用されてもよい。図の例において、検体ウェルアレイから放出される光線は、上述の光学要素を使用して、フィルタ処理され、センサに向かって集光される。図 6-5 は、6 つの個々のレンズを含む 1 つの考え得るリレーレンズ 6-103 を示している。リレーレンズとして、何れの数のレンズ及び／又はその他の光学要素が使用されてもよいと認識するべきである。

I V. センサ

本開示は、センサ、センサの動作、及び信号処理方法の各種の実施形態を提供する。いくつかの実施形態によれば、センサチップ 2-260 のピクセルにあるセンサ 2-122 は、検体ウェル内の 1 つ又は複数のタグから放出エネルギーを受け取り、受け取った放出エネルギーを表す 1 つ又は複数の電気信号を生成可能な何れの適当なセンサを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、センサは少なくとも 1 つの光検出器（例えば、半導体基板に形成された p-n 接合）を含んでいてもよい。図 7-1 A 及び図 7-1 B は、センサチップのピクセル 2-100 内で製造可能なセンサの 1 つの実施形態を示す。

【0219】

いくつかの実施形態によれば、センサ 2-122 はセンサチップの各ピクセル 2-100 で形成されてもよい。センサは、アッセイチップの検体ウェル 2-211 に関連付けられてもよい。センサの上方に 1 つ又は複数の透明層 7-110 があってもよく、それによって検体ウェルからの放出は大きく減衰せずにセンサまで移動できる。センサ 2-122 は、いくつかの実施形態によれば、半導体基板 7-120 内のピクセルの基部に形成されて、検体ウェルの、アッセイチップ（図示せず）と同じ側に位置付けられてもよい。

【0220】

センサは、1 つ又は複数の半導体接合光検出器セグメントを含んでいてもよい。各半導体接合は、第一の導電型のウェルを含んでいてもよい。例えば、各半導体接合は、図に示されているように、p 型基板内に形成された n 型ウェルを含んでいてもよい。いくつかの実施形態によれば、センサ 2-122 は図 7-1 B の平面図に示されているように、ブルズアイ検出器 7-162 として配置されていてもよい。第一の光検出器 7-124 はセンサの中心に位置付けられてもよく、第二の環状光検出器 7-122 は、中央の光検出器の周囲にあってもよい。ウェルとの電気接触は、第一の、又は後続の金属配線レベルに形成

された導電トレース7-134を通じて、及び導電ビア7-132を通じて行われてもよい。これらは、ビアの接触領域において高濃度にドーブされた半導体材料の領域7-126があってもよい。いくつかの実施形態において、フィールド酸化膜7-115が光検出器間の表面に形成されてもよく、各光検出器の一部を被覆してもよい。いくつかの実装形態において、センサ2-122に隣接するピクセル内に形成された追加の半導体装置7-125（例えば、トランジスタ、増幅器等）があってもよい。ピクセル内に追加の金属配線レベル7-138、7-136があってもよい。

【0221】

いくつかの実装形態において、金属配線レベル7-136は、ピクセルのほとんどにわたって延び、光検出器7-124の上方に中心のある開口部を有してもよく、それによって検体ウェルからの放出物はセンサに到達できる。場合により、金属配線層7-136は、基準電位又はグラウンドプレーンとして機能してもよく、さらに、少なくとも一部の背景放射（例えば、励起源から、又は周囲環境からの放射）がセンサ2-260に到達するのを防止する光ブロックとして機能してもよい。

【0222】

図7-1A及び図7-1Bに示されているように、センサ2-122は複数の光検出器セグメント7-122、7-124に細分されてもよく、これらは相互に空間的かつ電気的に分離される。いくつかの実施形態において、センサ2-122のセグメントは、反対の型にドーブされた半導体材料の領域を含んでいてもよい。例えば、第一のセンサセグメントのための第一の電荷蓄積ウェル7-124は、基板の第一の領域が第一のウェル内で第一の導電型（例えば、n型）となるようにドーブすることによって形成されてもよい。基板はp型であってもよい。第二のセンサセグメントのための第二の電荷蓄積ウェル7-122は、基板の第二の領域が第二のウェル内で第一の導電型となるようにドーブすることによって形成されてもよい。第一及び第二のウェルは、基板のp型領域により分離されてもよい。

【0223】

センサ2-122の複数のセグメントは、ブルズアイレイアウト以外の何れの適当な方法で配置されてもよく、センサ内に3つ以上のセグメントがあってもよい。例えば、いくつかの実施形態において、複数の光検出器セグメント7-142が相互から横方向に分離されて、図7-1Cに示されるように、縞状センサ7-164を形成してもよい。いくつかの実施形態において、4眼（4分割）センサ7-166は、図7-1Dに示されるように、4分割パターンでセグメント7-144を配置することによって形成されてもよい。いくつかの実装形態において、図7-1Eに示されているように、円弧状のセグメント7-146がブルズアイパターンと組み合わせて形成され、円弧状セグメントセンサ7-168を形成してもよい。他のセンサ構成はパイピース形部分を含んでいてもよく、これは円の別々の区域に配置された個々のセンサを含んでいてもよい。場合により、センサセグメントは検体ウェル2-211の周囲に対称に、又は検体ウェルの周囲に非対称に配置されてもよい。センサセグメントの配置は、上述の配置のみに限定されず、センサセグメントの何れの適当な分散が使用されてもよい。

【0224】

本発明者らは、4分割センサ7-166、パイ扇形センサ、又は同様の扇形センサは、他のセンサ構成より有利に、より小型のピクセルサイズに合わせて縮小できる。4分割及び扇形検出器は、検出される波長の数及びセンサのアクティブエリアに対して消費するピクセル面積が少ないことができる。

【0225】

センサは、様々な幾何学的形状に配置されてもよい。いくつかの例において、センサは、正方形構成又は六角形構成に配される。

センサは、検体ウェルから放出された放出エネルギーを捕捉するための何れの適当な方法で大きさが決められ、位置付けられてもよい。例えば、センサは検体ウェルの下に中心を置き、5 μm $\times$ 5 μm の平坦な寸法を有していてもよい。あるいは、各サブセンサは、

10

20

30

40

50

1. $6\text{ }\mu\text{m}\times 10\text{ }\mu\text{m}$ の寸法で、4. $6\text{ }\mu\text{m}$ のピッチ（すなわち各サブセンサ間に $3\text{ }\mu\text{m}$ のギャップ）を有しているもよい。

【0226】

本開示のセンサは、独立して（すなわち個別に）アドレス可能であってもよい。個別にアドレス可能なセンサは、他のセンサから独立して信号を検出し、出力を提供できる。個別にアドレス可能なセンサは、個別に読み出し可能であってもよい。

【0227】

いくつかの実施形態において、図7-1Fに示されているように、積層型センサ7-169が、複数の別々のセンサセグメント7-148を縦の積層体として製造することによって形成されてもよい。例えば、セグメントは上下に配置されてもよく、積層されたセグメント間に絶縁層があってもなくてもよい。縦方向の層の各々は、特定のエネルギーの放出エネルギーを吸収し、別のエネルギーの放出物を通過させるように構成されてもよい。例えば、第一の検出器は、より短い波長の放射（例えば、検体からの約 500 nm 未満の青波長放射）を吸収し、検出してもよい。第一の検出器は、検体からの緑及び赤波長の放出を通過させてもよい。第二の検出器は、緑波長放射（例えば、約 $500\text{ nm}\sim$ 約 600 nm ）を吸収し、検出してもよく、赤放射を通過させてもよい。第三の検出器は、赤放射を吸収し、検出してもよい。いくつかの実施形態において、積層体内に反射膜7-149が組み込まれて、選択された波長バンドの光を反射して、セグメント内に戻してもよい。例えば、薄膜は第二のセグメントにより吸収されなかった緑波長の放射を反射して、第二のセグメント内に戻してもよく、それによってその検出効率が高まる。

【0228】

センサセグメントが縦方向に積層されている、いくつかの実施形態において、放出結合構成要素が検体ウェルに含められず、放出波長に依存する検体放出物の別々の空間分布パターンを生成してもよい。分光的に異なる放出物の識別は、いくつかの実施形態によれば、縦積層型センサ7-169で、その積層セグメントからの信号の比を解析することによって実現されてもよい。

【0229】

いくつかの実施形態において、センサ2-122のセグメントはシリコンから形成されるが、何れの適当な半導体（例えば、Ge、GaAs、SiGe、InP等）が使用されてもよい。いくつかの実施形態において、センサセグメントは、有機光伝導膜を含んでいてもよい。他の実施形態において、量子ドット光検出器がセンサセグメントに使用されてもよい。量子ドット光検出器は、量子ドットの大きさに基づいて異なる放出エネルギーに回答してもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルから受け取った異なる放出エネルギー又は波長間での区別を行うために、様々な大きさの複数の量子ドットが使用されてもよい。例えば、第一のセグメントは、第一の大きさを有する量子ドットから形成されてもよく、第二のセグメントは、第二の大きさを有する量子ドットから形成されてもよい。各種の実施形態において、センサ2-122は、従来のCMOSプロセスを使用して形成されてもよい。

【0230】

前述のように、放出結合構成要素は、いくつかの実施形態において、検体ウェルに隣接して製造されてもよい。選別要素2-243は、検体ウェル2-211内の検体からの放出を変化させて、放出波長に依存する検体放出の異なる空間的分布パターンを生成することができる。図7-2Aは、第一の波長で第一の検体から生成できる第一の空間的分布パターン7-250の一例を示している。第一の空間的分布パターン7-250は、図7-2Bに示されるように、例えばブルズアイセンサ7-162の中央セグメントに向けられた明確な中央ローブを有しているもよい。このようなパターン7-250は、検体が約 663 nm の波長で放出するとき、何れの適当な回折要素によって生成されてもよい。センサに入射する投影パターン7-252は、図7-2Bに示されているように見え得る。

【0231】

図7-2Cは、いくつかの実施形態による、同じ検体ウェルから第二の波長で放出され

10

20

30

40

50

る第二の検体から生成され得る空間的分布パターン7-260を示している。第二の空間分布パターン7-260は、2つの放射ローブを含み、第一の空間分布パターン7-250と異なってもよい。第二の空間分布パターン7-260の投影パターン7-262は、いくつかの実施形態によれば、図7-2Dに示されているように見え得る。第二の空間分布パターン7-260は、検体が約687nmの波長で放出するときに、何れの適当な回折要素によって生成されてもよい。

【0232】

センサ2-122のセグメントは、いくつかの実施形態によれば、特定の放出エネルギーを検出するように配置されてもよい。例えば検体ウェルとセンサのセグメントに隣接する放出結合構造は、組み合わせて、特定の放出エネルギー間の信号差分を増大させるように設計されてもよい。放出エネルギーは、センサチップと使用される選択されたタグに対応してもよい。一例として、ブルズアイセンサ7-162は、そのセグメントを、検体からの投影パターン7-260、7-262とよりよくマッチするような大きさ及び／又は位置付けとすることができ、それによってより高い強度の領域がセンサのアクティブセグメントの中央により近くなる。その代わりに、又はそれに加えて、回折要素は、投影パターン7-260、7-262を変化させて、高強度領域がセンサセグメント内のより中心に近くなるように設計されてもよい。

【0233】

センサ2-122は、2つのセグメントを含んでいるが、いくつかの実施形態において、検体からの3つ以上の空間的に異なる放出バンドを識別することも可能である。例えば、各放出バンドは、センサセグメント上に異なる投影パターンを生成し、センサセグメントからの信号の異なる組合せを生じさせてもよい。信号の組合せを解析して、放出バンドを判別し、識別してもよい。図7-2E～図7-2Hは、4つの異なる放出パターンに露出された2セグメントセンサ2-122からの信号の数値シミュレーションの結果を示す。図からわかるように、2つのセンサセグメントからの信号の各組合せは異なり、4つの波長でのエミッタ間の区別可以使用できる。シミュレーションに関して、ブルズアイセンサ7-162の外側の検出器セグメントのほうが大きい面積であったため、その検出器についてより多くの信号が統合された。これに加えて、検出器間の領域に衝突した光によりキャリアが生成され、これは何れかの検出器セグメントに向かってドリフトし、両方のセグメントからの信号に寄与し得る。

【0234】

いくつかの実施形態において、ピクセルあたりN個の光検出器セグメントがあってもよく、Nは何れの整数値でもよい。いくつかの実施形態において、Nは1以上、10以下であってもよい。他の実施形態において、Nは2以上、5以下であってもよい。N個の検出器により検出され得る判別可能な検体放出の数M（例えば、異なる発光タグからの異なる放出波長）はNと等しいか、それより大きくてもよい。M個の検体放出の判別は、いくつかの実施形態によれば、各センサセグメントからの信号の比を評価することによって実現されてもよい。いくつかの実装形態において、受け取った信号の比、合計、及び／又は振幅を測定、解析して、検体ウェルからの放出物の特徴的波長を判定してもよい。

【0235】

いくつかの実施形態において、検体ウェル2-211内で、複数のエミッタがある時間枠内に異なる特徴的波長で放出してもよい。センサ2-122は、異なる波長の複数の放出からの信号を同時に検出し、合計された信号をデータ処理のために提供してもよい。いくつかの実装形態において、多波長放出は、センサセグメントからの信号値の別の集合として区別可能であってもよい（例えば、図7-2E～図7-2Hに示されるものと異なる信号値）。信号値を解析して、多波長放出が発生したことを判別し、その放出物に関連付けられるエミッタの特定の組合せを識別してもよい。

【0236】

本発明者らはまた、4つの同心円状のセグメントを有するブルズアイセンサを検討し、解析した。セグメントからの信号が図7-2I及び図7-2Jに示されており、これはそ

10

20

30

40

50

れぞれ図7-2 G及び図7-2 Hに関連する同じ放出条件に関する。4眼ブルズアイセンサはまた、個別の信号を示し、これを解析して、検体ウェル内の特定のエミッタを識別してもよい。

【0237】

波長フィルタリングが各センサセグメントで使用される場合、又はスペクトル分離が高い場合、センサの各セグメントは実質的に選択された放出バンドのみを検出してもよい。例えば、第一の波長は第一のセグメントによって検出されてもよく、第二の波長は第二のセグメントによって検出されてもよく、第三の波長は第三のセグメントによって検出されてもよい。

【0238】

図7-1 Aを再び参照すると、ピクセル2-100内には別の電子回路7-125があってもよく、これはセンサ2-122の各セグメントからの信号を収集し、読み出すために使用されてもよい。図7-3 A及び図7-3 Dは、いくつかの実施形態による、マルチセグメントセンサと組み合わせて使用できる回路を示している。一例として、信号収集回路7-310は、各センサセグメントにつき3つのトランジスタを含んでいてもよい。いくつかの実装形態による3つのトランジスタの配置が図7-3 Bに示されている。各セグメントに関連する電荷蓄積ノード7-311の信号レベルは、リセットトランジスタRSTによってリセットされてもよく、セグメントの信号レベル（電荷蓄積ノードにおける電荷の量により決まる）は読取りトランジスタRDで読み出されてもよい。

【0239】

ピクセル回路は、いくつかの実施形態によれば、増幅及び相関二重サンプリング回路7-320をさらに含んでいてもよい。増幅及び二重サンプリング回路は、センサセグメントからの信号を増幅するように構成されたトランジスタの他に、センサに放出エネルギーが存在しないときに（例えば、検体ウェルにおいて励起エネルギーが印加される前）、電荷蓄積ノードでの電圧レベルをリセットし、そのノードの背景、すなわち「リセット」信号を読み取り、例えば、その後の放出信号を読み取るように構成されたトランジスタを含んでいてもよい。

【0240】

いくつかの実施形態によれば、相関二重サンプリングは、検出された放出信号レベルから背景又はリセット信号レベルを減算することによって、背景ノイズを減少させるために使用される。センサの各セグメントに関連する収集された放出信号と背景信号は、コラムライン7-330に読み出されてもよい。いくつかの実施形態において、放出信号レベルと背景信号は共通のコラムラインに時分割多重化される。各センサセグメントのための別のコラムラインがあってもよい。コラムラインからの信号は、増幅回路7-340（アクティブピクセルアレイの外にあってもよい）で緩衝され、及び／又は増幅されて、さらに処理、解析されるために提供されてもよい。いくつかの実施形態において、二重サンプリングされた信号の減算は、オフチップで、例えばシステムプロセッサにより計算される。他の実施形態において、減算はオンチップで、すなわち機器の回路内で実行されてもよい。

【0241】

相関二重サンプリングのいくつかの実施形態は、サンプリングすべき行を選択することによって動作してもよく、その行に関連するセンサはサンプリング期間にわたり、統合信号の電荷を有し、かつ信号レベルを含む。信号レベルは、コラムラインに同時に読み出されてもよい。統合信号レベルをサンプリングした後、選択された行内の全てのピクセルはリセットされ、直ちにサンプリングされてもよい。このリセットレベルは、リセット解除後に蓄積を開始する次の統合信号と相関されてもよく、後に同じ行が再び選択されたときに、フレーム時間の統合を終了する。いくつかの実施形態において、フレームのリセット値はオフチップで保存されてもよく、信号が統合を完了し、サンプリングされると、保存された相関リセット値を減算できる。

【0242】

いくつかの実施形態において、3以上のセグメントを有するセンサ2-122には、追加の回路が必要となり得る。図7-3Cは、4眼センサに関連する信号収集7-312、増幅7-320、及び二重サンプリング回路を示している。いくつかの実施形態によれば、2つ以上のセグメントからの信号は、図に示されているように、ピクセルにおける共通の信号チャンネルに時分割多重化されてもよい。時分割多重化信号は、ノイズキャンセレーションのための各セグメントについてサンプリングされた背景信号を含んでいてもよい。それに加えて、2つ以上のセグメントからの信号は、共通のコラムラインに時分割多重化されてもよい。

【0243】

いくつかの実施形態によれば、励起源からの背景信号レベルを減少させ、及び／又は検体に関連する異なるエミッタからの異なる放出を判別するために、時間信号取得方式が使用されてもよい。図7-4Aは、いくつかの実施形態により、検体にタグ付けするために使用できる2つの異なるエミッタからの蛍光放出と減衰を示している。2つの放出は、明らかに異なる時間減衰特性を有する。第一のエミッタからの第一の時間減衰曲線7-410は、ローダミン等の一般的な蛍光分子に対応してもよい。第二の時間減衰曲線7-420は、第二のエミッタ、例えば量子ドット又は発光エミッタの特徴であってもよい。何れのエミッタも、エミッタの初期励起後のある時間にわたって延びる放出減衰テールを示す。いくつかの実施形態において、放出減衰テール中に適用される信号収集技術は、タイミングをとることにより、いくつかの実施形態において、励起源から背景信号を減少させ、いくつかの実施形態においてエミッタ間を区別することができる。

【0244】

いくつかの実装形態によれば、放出減衰テール中に、励起源からの放射による背景信号を減少させるために時間遅延サンプリングが使用されてもよい。図7-4B及び図7-4Cは、いくつかの実施形態による時間遅延サンプリングを示す。図7-4Bは、励起源からの励起エネルギーの励起パルス7-440と、検体ウェル内で励起された検体から続き得るその後の放出パルス7-450の経時変化を示す。励起パルス7-440は、図7-4Cに示されるように、短時間にわたり駆動信号7-442で励起源を駆動した結果であってもよい。例えば、駆動信号は第一の時間 t_1 から始まり、第二の時間 t_2 で終わってもよい。駆動信号の持続時間 $(t_2 - t_1)$ は、いくつかの実施形態によれば、約1ピコ秒～約50ナノ秒であってもよいが、いくつかの実装形態においてはより短い持続時間が使用されてもよい。

【0245】

励起源のための駆動信号が終了した後の時間 t_3 で、ピクセルのセンサ2-260（又はセンサセグメント）は、時間 t_3 から時間 t_4 までに及ぶ第二の時間間隔7-452中に電荷蓄積ノード7-311において電荷を蓄積するようにゲート制御されてもよい。第二の時間間隔は、いくつかの実施形態によれば、約1ナノ秒～約50マイクロ秒であってもよいが、いくつかの実装形態においては、他の持続時間が使用されてもよい。図7-4Bを参照するとわかるように、電荷蓄積ノードは、励起源によるものより、放出する検体による信号電荷の方を多く収集する。したがって、改善された信号対ノイズ比が得られる。

【0246】

図7-4Aを再び参照すると、エミッタの時間的放出特徴が異なることから、センサにおける対応する信号は、異なる時間にピークとなり得る。いくつかの実装形態において、放出一減衰テールで適用される信号取得技術が異なるエミッタを判別するために使用されてもよい。いくつかの実施形態において、時間検出技術は、異なるエミッタを判別するために、空間及びスペクトル方式（例えば、図7-2に関連して上述した）と共に使用されてもよい。

【0247】

図7-4D～図7-4Hは、センサ又はセンサセグメントにおいて、二重サンプリングをどのように使用して異なる時間的放出特徴を有する2つのエミッタを区別できるかを示している。図7-4Dは、それぞれ第一のエミッタと第二のエミッタに関連する放出曲線

7-470、7-475を示す。一例として、第一のエミッタはローダミン等の一般的な蛍光体であってもよく、第二のエミッタは量子ドット又は発光エミッタであってもよい。

【0248】

図7-4Eは、図7-4Dの2つの異なる放出特徴に応答して発生し得る電気蓄積ノード7-311のダイナミック電圧レベルを表す。この例において、蛍光エミッタに対応する第一の電圧曲線7-472は、放出スパンがより短いため、より急速に変化して、第一の時間 t_1 でその最大値（又はノードの極性に依じて最小値）に到達し得る。第二の電圧曲線7-477は、第二のエミッタの放出特徴がより長いため、よりゆっくりと変化し、第二の時間 t_2 でその最大値（又は最小値）に到達し得る。

【0249】

いくつかの実施形態において、電荷蓄積ノードのサンプリングは、図7-4Fに示されるように、検体励起の後の2つの時間 t_3 、 t_4 で行われてもよい。例えば、第一のリード信号7-481は、第一の時間 t_3 における電荷蓄積ノードから第一の電圧値を読み出すことに当てはまり得る。その後、第二のリード信号7-482は、第二の時間 t_4 において電荷蓄積ノードから第二の電圧値を読み出すことに当てはまり得、第一のリードと第二のリードとの間で電荷蓄積ノードはリセットされない。その後、2つのサンプリングされた信号値の解析結果を使用して、2つのエミッタのうちの何れが検出された信号レベルを提供したかを識別してもよい。

【0250】

図7-4Gは、図7-4Dに示されている放出曲線7-470を有する第一のエミッタについて得られる可能性のある第一のリードと第二のリードからの2つの信号の一例を示す。図7-4Hは、図7-4Dに示されている放出曲線7-475を有する第二のエミッタについて得られる可能性のある第一のリードと第二のリードからの2つの信号の一例を示す。例えば、第一のエミッタに関して図7-4Fに示されているサンプリングシーケンスでは曲線7-472がサンプリングされ、2つのリード時間で略同じ数値が得られる。第二のエミッタの場合、図7-4Fに示されているサンプリングシーケンスにより、2つのリード時間において曲線7-477の2つ異なる数値がサンプリングされる。その結果として得られる2つのリード時間からの信号ペアは2つのエミッタ間を区別するもので、これを解析し、各エミッタを識別できる。いくつかの実施形態によれば、背景信号成分差引のための二重サンプリングはまた、第一及び第二のリード信号から背景信号を差し引くために実行されてもよい。

【0251】

動作中、試料からのデータ集合を解析する前に、センサチップのセンサ2-260に対して波長校正手順を実行してもよい。波長校正手順は、センサに、センサチップに使用され得る蛍光体の波長に対応していてもいなくてもよい、特徴的波長を有する異なる既知のエネルギーを付与する工程を含んでいてもよい。異なるエネルギーは逐次的に付与してもよい。校正信号は各エネルギーに関してセンサから記録できる。その後、校正信号は参照信号として保存されてもよく、これは実際のデータの取得を処理し、センサにより何れの放出波長が検出されたかを判定するために使用されてもよい。

【0252】

蛍光マーカの寿命を検出するための測定には、タイムビン情報を取得できる何れの適当なセンサが使用されてもよい。センサは、各検体ウェルが検体ウェルからの発光を検出するための少なくとも1つのセンサ領域を有するように配置される。いくつかの実施形態において、内蔵されるデバイスとしては、ガイガーモードアバランシェフォトダイオードアレイ及び／又は単一光子アバランシェダイオードアレイ（SPAD：single photon avalanche diode array）が含まれていてもよい。センサとしては高IR感度CMOSセンサが含まれていてもよく、これはSi-Ge材料及び／又は「ブラックシリコン」等の改質層を含んでいてもよい。これらの材料により、センサは赤外線を放出し、及び／又はそれ以外にIR感度の低いCMOSセンサでは検出能力の低い発光マーカを検出できることになり得る。

【0253】

本明細書には、入射光子の到達タイミングを正確に測定でき、すなわち「タイムビンに分解」でき、例えば核酸配列解析（例えば、DNA配列解析）をはじめとする各種用途で使用され得る集積光検出器が記載される。いくつかの実施形態において、集積光検出器は、ナノ秒又はピコ秒の分解能で光子の到来を測定でき、これは入射光子の到来の時間ドメイン解析を容易にすることができる。

【0254】

いくつかの実施形態は、入射光子に相当して電荷キャリアを生成し、電荷キャリアが入射光子の到来により生成された、参照時間（例えば、トリガイイベント）に関するタイミングを区別できる光検出器を有する集積回路に関する。いくつかの実施形態において、電荷キャリア分離構造は、異なる時間に生成された電気キャリアを分離し、電荷キャリアを1つ又は複数の電荷キャリア保存領域（「ビン」と呼ばれる）に誘導し、これは異なる期間内に生成された電荷キャリアを集約する。各ビンは、選択された時間間隔内に生成された電荷キャリアを保存する。各ビンに保存された電荷を読み出すことによって、各時間間隔内に到来した光子の数に関する情報を提供できる。このような集積回路は、本明細書に記載されているような様々な用途の何れにおいても使用できる。

10

【0255】

光検出領域及び電荷キャリア分離構造を有する集積回路の一例を説明する。いくつかの実施形態において、集積回路はピクセルのアレイを含んでもよく、各ピクセルは、後述のように、1つ又は複数の光検出領域と、1つ又は複数の電荷キャリア分離構造とを含んでもよい。

20

【0256】

図7-5は、いくつかの実施形態によるピクセル100の概略図を示す。ピクセル100は、光子吸収／キャリア生成領域102（「光検出領域とも呼ばれる」と、キャリア移動／捕捉領域106と、1つ又は複数の電荷キャリア保存領域とを有し、本明細書では「電荷キャリア保存ビン」又は単に「ビン」とも呼ばれるキャリア保存領域108と、電荷キャリア保存ビンから信号を読み出すための読み出し回路110とを含む。光生成電荷キャリアは、本明細書において単に「電荷キャリア」と呼ばれてもよい。

【0257】

光子吸収／キャリア生成領域102は、入射光子を光生成電荷キャリアに変換できる半導体材料（例えば、シリコン）領域であってもよい。光子吸収／キャリア生成領域102は、露光されてもよく、入射光子を受け取ってもよい。光子が光子吸収／キャリア生成領域102により吸収されるとき、これは光生成電荷キャリア、例えば電子／正孔対等を生成し得る。

30

【0258】

光子吸収／キャリア生成領域102に電場が確立されてもよい。いくつかの実施形態において、電場は「静電場」であってもよく、これはキャリア移動／捕捉領域106の充電電場と対照的である。光子吸収／電荷生成領域102の電場は、横成分、縦成分、又は横及び縦成分の両方を含んでもよい。電場の横成分は、図7-5の矢印で示される下方に向いていてもよく、これは、光生成電荷キャリアに対する、これらをキャリア移動／捕捉領域106へと駆動する力を示している。電場は、様々な方法で形成されてもよい。

40

【0259】

いくつかの実施形態において、1つ又は複数の電極は、光子吸収／キャリア生成領域102の上に形成されてもよい。電極には、光子吸収／キャリア生成領域102に電場を確立させるために電圧が印加されてもよい。このような電極は「フォトゲート」と呼ばれてもよい。いくつかの実施形態において、光子吸収／キャリア生成領域102は、電荷キャリアが完全に消耗したシリコンの領域であってもよい。

【0260】

いくつかの実施形態において、光子吸収／キャリア生成領域102の電場は、PN接合等の接合によって確立されてもよい。光子吸収／キャリア生成領域102の半導体材料は

50

、ドープによって、光生成電荷キャリアに対して、それらをキャリア移動／捕捉領域 106 へと駆動する力を誘導する電場を生成するような方位及び／又は形状を有する PN 接合を形成してもよい。いくつかの実施形態において、PN 接合ダイオードの P 端子は、その電圧を設定する端子に接続されてもよい。このようなダイオードは、「埋込」フォトダイオードと呼ばれてもよい。埋込フォトダイオードは、表面のキャリア再結合を促進でき、これはその電圧を設定し、キャリアを引き付ける端子によるもので、それによって暗電流を減少させることができる。捕捉することが望まれる光生成電荷キャリアは、表面の再結合領域の下を通過してもよい。いくつかの実施形態において、横方向の電場は、半導体材料中でドープ濃度を段階的に使用することによって確立されてもよい。

【0261】

10

図 7-5 に示されるように、時間 t_1 において、光子が捕捉されてもよく、電荷キャリア 101A（例えば電子）が生成されてもよい。いくつかの実施形態において、光子吸収／キャリア生成領域 102 及びキャリア移動／捕捉領域 106 に沿って電位勾配が確立されてもよく、それによって電荷キャリア 101A は図 7-5 の下方向に（図 7-5 に示される矢印により示されている）移動する。電位勾配に応答して、電荷キャリア 101A は時間 t_1 でのその位置から時間 t_2 の第二の位置、時間 t_3 の第三の位置、時間 t_4 の第四の位置、及び時間 t_5 の第五の位置へと移動し得る。そのため、電荷キャリア 101A は電位勾配に応答してキャリア移動／捕捉領域 106 内へと移動する。

【0262】

キャリア移動／捕捉領域 106 は、半導体領域であってもよい。いくつかの実施形態において、キャリア移動／捕捉領域 106 は、光子吸収／キャリア生成領域 102 と同じ材料（例えば、シリコン）の半導体領域であってもよいが、ただし、キャリア移動／捕捉領域 106 が（例えば、金属層等の上乘せされた不透明材料によって）入射光から遮蔽されていてもよい。

20

【0263】

いくつかの実施形態において、以下に詳しく説明するように、電位勾配は、光子吸収／キャリア生成領域 102 及びキャリア移動／捕捉領域 106 内に、これらの領域の上方に位置付けられた電極により確立されてもよい。しかしながら、本明細書に記載されている技術は、電位勾配を生成するために使用される電極の特定の位置に関して限定されない。また、本明細書に記載されている技術は、電極を使った電位勾配の確立にも限定されない。いくつかの実施形態において、電位勾配は、空間的に段階のあるドーププロファイルを使用して確立されてもよい。電位キャリアを、光子吸収／キャリア生成領域 102 及びキャリア移動／捕捉領域 106 に沿って移動させる電子勾配を確立するためには、何れの適当な技術が使用されてもよい。

30

【0264】

異なる時間に生成される電荷キャリアの分離を可能にするために、電荷キャリア分離構造がピクセル内に形成されてもよい。いくつかの実施形態において、電荷キャリア分離構造の少なくとも一部は、キャリア移動／捕捉領域 106 の上に形成されてもよい。後述のように、電荷キャリア分離構造は電荷移動／捕捉領域 106 の上に形成された 1 つ又は複数の電極を含んでいてもよく、その電圧は、キャリア移動／捕捉領域 106 の電位を変化させるように、制御回路によって制御されてもよい。

40

【0265】

キャリア移動／捕捉領域 106 の電位は、電荷キャリアの補足を可能にするように変化されてもよい。電位勾配は、キャリア移動／捕捉領域 106 の上にある 1 つ又は複数の電極の電圧を変化させて、所定の空間領域内に電荷を閉じ込めることのできる電位バリアが生成されるようにすることによって変化されてもよい。例えば、図 7-5 のキャリア移動／捕捉領域 106 の破線の上にある電極の電圧は時間 t_5 において、図 7-5 のキャリア移動／捕捉領域 106 内の破線に沿って電位バリアを生じさせ、それによって電荷キャリア 101A が捕捉されるように変化されてもよい。図 7-5 に示されるように、時間 t_5 で捕捉されたキャリアは、キャリア保存領域 108 のピン「ピン 0」に移動されてもよい

50

。電荷キャリア保存ビンへのキャリアの移動は、キャリア移動／捕捉領域 106 及び／又はキャリア保存領域 108 の電位を（例えば、これらの領域の上にある電極の電圧を変化させることによって）変化させ、キャリアを電荷キャリア保存ビン内へと移動させることにより実行されてもよい。

【0266】

キャリア移動／捕捉領域 106 の所定の空間領域内のある時点での電位を変化させることにより、特定の期間内に発生した光子吸収により生成されたキャリアの捕捉が可能となり得る。異なる時間及び／又は位置で光生成電荷キャリアを捕捉することにより、電荷キャリアが光子吸収により生成された時間が区別されてもよい。この意味で、電荷キャリアは、トリガイメントの発生後、時間及び／又は空間内の特定の点において電荷キャリアを捕捉することにより「タイムビンに分解」されてもよい。特定のビン内の電荷キャリアのタイムビンへの分解によって、その光生成電荷キャリアが入射光子の吸収により生成された時間に関する情報が提供され、そのため、その光生成電荷キャリアを生成した入射光子の到来をトリガイメントに関して「タイムビンに分解」する。

【0267】

図 7-6 は、時間及び空間内の異なる点における電荷キャリアの捕捉を示している。図 7-6 に示されているように、キャリア移動／捕捉領域 106 の破線の上にある電極の電圧は、時間 t_9 において、図 7-6 のキャリア移動／捕捉領域 106 の破線に沿って電位バリアを発生させるように変化させられてもよく、それによって電荷 101B を捕捉する。図 7-6 に示されるように、時間 t_9 において捕捉されたキャリアは、キャリア捕捉領域 108 のビン「ビン 1」に移動されてもよい。電荷キャリア 101B は時間 t_9 で捕捉されるため、これは時間 t_5 で捕捉されるキャリア 101A に関する光子吸収イベント（すなわち、 t_1 における）と異なる時間（すなわち、時間 t_6 ）で発生する光子吸収イベントを表す。

【0268】

キャリア保存領域 108 の電荷キャリア保存ビン内の電荷キャリアの測定と合計を、電荷キャリアが捕捉された時間に基づいて複数回実行することにより、光子吸収／キャリア生成領域 102 内で光子が捕捉された時間に関する情報が得られる。このような情報は、上述のように、様々な用途において有益となり得る。

【0269】

いくつかの実施形態において、励起パルスの後に各タイムビンが捕捉する時間の長さは変化してもよい。例えば、より短いタイムビンは励起パルスの直後に発光を検出するために使用されてもよく、その一方で、より長いタイムビンは、励起パルスからさらに離れた時間において使用されてもよい。タイムビンの間隔を変えることによって、各タイムビンに関連する電気信号の測定の信号対ノイズ比を、あるセンサについて改善できる。光子放出イベントの確率は、励起パルスの直後の方がより高いため、この時間内のタイムビンは、より多くの光子が検出される可能性を考慮して、より短い時間間隔を有してもよい。より長い時間では、光子放出の確率はより低く、この時間内でのタイムビン検出は、光子の数がより少ない可能性を考慮して、より長くてもよい。いくつかの実施形態において、顕著に長い持続時間のタイムビンは、複数の寿命を区別するために使用されてもよい。例えば、タイムビンのほとんどは、約 0.1 ~ 0.5 ns の範囲の時間間隔を捕捉してもよいが、あるタイムビンは、約 2 ~ 5 ns の範囲の時間間隔を捕捉してもよい。タイムビンの数及び／又は各ビンの時間間隔は、検体となる物体から放出される光子を検出するために使用されるセンサに依存してもよい。各ビンの時間間隔の決定には、センサにより提供されたタイムビンの数が検体の解析に使用される発光マーカ間の区別を付けるのに必要な時間間隔を特定する工程を含んでいてもよい。記録されたヒストグラムの分布を、同様の条件とタイムビンによるマーカの既知のヒストグラムと比較することにより、検体ウェル内のマーカの種類の識別してもよい。本願の異なる実施形態は、マーカの寿命を測定するが、マーカを励起するために使用された励起エネルギー、各ピクセル内のセンサ領域の数、及び／又はセンサにより検出される波長は異なり得る。

V. 励起源

励起源 2-250 は、アッセイチップの少なくとも 1 つの検体ウェル 2-111 に励起エネルギーを送達するように構成された何れの適当な励起源であってもよい。アッセイチップ上のピクセルは、パッシブソースピクセルであってもよい。「パッシブソースピクセル」という用語は、励起エネルギーがアッセイチップのピクセル又はピクセルアレイの外の領域からピクセルに送達される、例えば励起が機器内で起こってもよいピクセルを指すために使用される。

【0270】

いくつかの実施形態によれば、励起源は、放射プロセスを介して検体を励起してもよい。例えば、励起源は、アッセイチップの少なくとも 1 つの検体ウェルの少なくとも 1 つの励起領域 3-215 に、可視放射（例えば、波長約 350 nm～約 750 nm の放射）、近赤外放射（例えば、波長約 0.75 マイクロメートル～約 1.4 マイクロメートルの放射）、及び／又は短波長赤外放射（例えば、波長約 1.4 マイクロメートル～約 3 マイクロメートルの放射）を提供してもよい。いくつかの実施形態において、放射励起源は、検体ウェルの励起領域に直に隣接する介在物（例えば、分子、量子ドット、又は選択された分子及び／又は量子ドットを含む材料の層）を励起するためにエネルギーを供給してもよい。この介在物は、非放射プロセスを通じて（例えば、FRET 又は DET を通じて）そのエネルギーを検体に移動させてもよい。

【0271】

いくつかの実施形態において、励起源は、複数の励起エネルギー源を提供してもよい。例えば、放射励起源は、2 つ以上の異なるスペクトル特徴を有する励起エネルギーを送達してもよい。一例として、多色 LED は、中心が 2 つ以上の波長にあるエネルギーを放出してもよく、これらのエネルギーが検体ウェルの励起領域に送達されてもよい。

【0272】

いくつかの実施形態の概要において、それによれば、機器は、アッセイチップの少なくとも 1 つの検体ウェルの少なくとも 1 つの励起領域、又は励起エネルギーを 1 つ又は複数の励起領域内の少なくとも 1 つの検体に変換又は結合する少なくとも 1 つの介在物に励起エネルギーを供給するための少なくとも 1 つの励起源 2-250 を含んでいてもよい。図 2-3 に示されているように、励起源 2-250 からの放射励起エネルギー 2-251 は、例えば、検体ウェル 2-211 の周囲の領域に衝突してもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルの励起領域 2-215 内に入射励起エネルギーを集束するのを支援する励起結合構造 2-223 があってもよい。

【0273】

励起源は、1 つ又は複数の異なるスペクトルバンドにより特徴付けられてもよく、その各々が特徴的波長を有する。説明のためにすぎないが、励起源からのスペクトル放出の例が図 8-1 A のスペクトルグラフに示されている。励起エネルギーは、スペクトル励起バンド 8-110 内に実質的に閉じ込められてもよい。スペクトル励起バンドのピーク波長 8-120 は、励起エネルギーを特徴付けるために使用されてもよい。励起エネルギーはまた、図面に示されているようなスペクトル分布、例えば半値全幅（FWHM）値により特徴付けられてもよい。図 8-1 A に示されるようなエネルギーを生成する励起源は、約 540 nm の波長の放射でのエネルギーを供給し、約 55 nm の FWHM 帯域幅を有するとして特徴付けることができる。

【0274】

図 8-1 B は、1 つ又は複数の検体ウェルに 2 つの励起エネルギーバンドを供給できる励起源（又は複数の励起源）のスペクトル特徴を示している。いくつかの実施形態によれば、図に示されているように、第一の励起バンド 8-112 は約 532 nm であり、第二の励起バンド 8-114 は約 638 nm である。いくつかの実施形態において、第一の励起バンドは約 638 nm であってもよく、第二の励起バンドは約 650 nm であってもよい。いくつかの実施形態において、第一の励起バンドは約 680 nm であってもよく、第二の励起バンドは約 690 nm であってもよい。いくつかの実施形態によれば、励起バン

ドのピークはこれらの数値の $\pm 5 \text{ nm}$ 以内であってもよい。

【0275】

場合により、放射励起源は、図8-1Aに示されるような広い励起バンドを生成してもよい。広い励起幅8-110のバンド幅は、いくつかの実施形態によれば、約20nmより大きくてもよい。広い励起幅は、例えば、発光ダイオード(LED: light emitting diode)により生成されてもよい。いくつかの実装形態において、放射励起源は、図8-1Bに示されるように、狭い励起バンドを生成してもよい。狭い励起バンドは、例えばレーザダイオードにより生成されてもよく、又はLEDからの出力を分光的にフィルタ処理することによって生成されてもよい。

【0276】

いくつかの実施形態において、励起源は光源であってもよい。何れの適当な光源が使用されてもよい。いくつかの実施形態は、インコヒーレント光源を使用してもよく、他の実施形態はコヒーレント光源を使用してもよい。例えば、ただし、これらに限定されないが、いくつかの実施形態によるインコヒーレント光源は、有機LED(OLED)、量子ドット(QLED)、ナノワイヤLED、及び(無機)有機半導体LED等の様々な発光ダイオード(LED)を含んでいてよい。例えば、ただし、これらに限定されないが、いくつかの実施形態によるコヒーレント光源は、有機レーザ、量子ドットレーザ、垂直キャビティ面発光レーザ(VCSEL)、エッジ発光レーザ、及び分布帰還型(DFB: distributed-feedback)レーザダイオード等の様々なレーザを含んでいてもよい。それに加えて、又はその代わりに、スラブ連結光導波路レーザ(SCOWL: slab-coupled optical waveguide laser)又はその他の非対称シングルモード導波路構造が使用されてもよい。それに加えて、又はその代わりに、レーザダイオード又はフラッシュランプにより励起されるNd:YAG又はNd:Glass等の固体レーザが使用されてもよい。それに加えて、又はその代わりに、レーザダイオード励起ファイバレーザが使用されてもよい。いくつかの実施形態において、レーザ励起源の出力は、非線形結晶、又は周期分極反転ニオブ酸リチウム(PPLN: Periodically Poled Lithium Niobate)又はその他の同様の周期的分極非線形結晶において、周波数が2倍にされ、波長が半分になってもよい。この周波数2通倍プロセスによって、効率的なレーザを使用して励起により適した波長を生成できるようになり得る。ピクセルアレイのために、複数の種類の励起源があってもよい。いくつかの実施形態において、異なる種類の励起源が組み合わせられてもよい。励起源は、選択された種類の励起源を製造するために使用される従来の技術により製造されてもよい。

【0277】

励起エネルギー源の特徴的波長は、アッセイ解析において使用される発光マーカの選択に基づいて選択されてもよい。いくつかの実装形態において、励起エネルギー源の特徴的波長は、選択された蛍光体の直接励起(例えば、単一光子励起)のために選択される。いくつかの実装形態において、励起エネルギー源の特徴的波長は、間接的励起(例えば、多光子励起又は直接励起を提供する波長への高調波変換)のために選択される。いくつかの実装形態において、励起エネルギーは、検体ウェルに印加するための特定の波長の励起エネルギーを生成するように構成された光源により生成されてもよい。いくつかの実装形態において、励起源の特徴的波長は、検体からの対応する放出物の特徴的波長より短くてもよい。いくつかの実装形態において、励起源の特徴的波長は、検体からの放出物の特徴的波長より大きくてもよく、検体の励起は多光子吸収を通じて行われてもよい。

【0278】

励起源は、バッテリー又は他の何れの電源を含んでいてもよく、これは集積生体解析装置以外の何れの箇所に位置付けられていてもよい。例えば、励起源は機器内に位置付けられてもよく、電源は導電ワイヤとコネクタとを介して集積生体解析装置に連結されてもよい。

【0279】

いくつかの実施形態によれば、1つ又は複数の励起源は集積装置の外部に位置付けられていてもよく、光のパルスを、検体ウェルを有する集積機器に供給するように配置されてもよい。光のパルスは、複数の検体ウェルに連結され、例えば、ウェル内の1つ又は複数のマーカを励起するのに使用されてもよい。1つ又は複数の励起源は、いくつかの実装形態によれば、1つ又は複数の特徴的波長で光のパルスを供給してもよい。場合により、励起源は、その中に集積装置が装填されてもよいベースとなる機器内に取り付けられるか、それに連結される交換式モジュールとしてパッケージされてもよい。励起源からのエネルギーは、少なくとも1つの検体ウェルに、又は少なくとも1つの検体ウェル内の少なくとも1つの検体に放射的に、又は非放射的に送達されてもよい。いくつかの実装形態において、制御可能強度を有する励起源は、励起エネルギーを集積装置の複数のピクセルに送達するように配置されてもよい。ピクセルは、線形アレイ（例えば、行又は列）に、又は2Dアレイ（例えば、ピクセルのアレイのサブエリア又はピクセルのアレイ全体）に配置されてもよい。

10

【0280】

励起源には、何れの適当な光源が使用されてもよい。このような実施形態はインコヒーレント光源を使用してもよく、他の実施形態はコヒーレント光源を使用してもよい。非限定的な例として、いくつかの実施形態によるインコヒーレント光源は、有機LED（OLED）、量子ドット（QLED）、ナノワイヤLED、及び（無機）有機半導体LED等の様々な種類の発光ダイオード（LED）を含んでいてもよい。限定的な例として、いくつかの実施形態によるコヒーレント光源は、半導体レーザー（例えば、垂直キャビティ面発光レーザー（VCSEL）、エッジ発光レーザー、及び分散回帰型（DFB）レーザーダイオード）等の各種のレーザーを含んでいてもよい。それに加えて、又はその代わりに、スラブ連結光導波路レーザー（SCOWL）又はその他の非対称シングルモード導波路構造が使用されてもよい。いくつかの実装形態において、コヒーレント光源は、有機レーザー、量子ドットレーザー、及び固体レーザー（例えば、レーザーダイオード又はフラッシュランプで励起されるNd:YAG又はNd:Glass層）を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、レーザーダイオード励起ファイバレーザーが使用されてもよい。コヒーレント光源は、超短パルスを生成する受動モードロック型であってもよい。集積装置上のピクセルアレイ用として、複数の種類の励起源があってもよい。いくつかの実施形態において、異なる種類の励起源が組み合わせられてよい。励起源は、選択された種類の励起源を製造するために使用される従来の技術により製造されてもよい。

20

30

【0281】

紹介のために、本発明を限定することなく、コヒーレント光源の例示的な構成が図8-2Aに示されている。図面は解析機器8-200を示しており、これは励起源として超短パルスレーザー励起源8-210を含んでいてもよい。超短パルスレーザー8-210は、利得媒体8-205（いくつかの実施形態において、固体材料であってもよい）、利得媒体を励起するためのポンプ源（図示せず）と、光レーザーキャビティの端面を画定する少なくとも2つのキャビティミラー8-202、8-204とを含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、レーザーキャビティには、ビーム整形、波長選択、及び／又はパルス形成のための1つ又は複数の追加の光学要素があってもよい。動作時に、パルスレーザー励起源8-210は超短光パルス8-220を生成してもよく、これはキャビティの端面ミラー8-202、8-204間のレーザーキャビティ内と利得媒体8-205を通して前後に循環する。キャビティミラー8-204の一方は、循環するパルスの一部を部分的に透過させてもよく、それによって光パルス8-222のトレインがパルスレーザー8-210から放出される。放出されたパルスは、ビームウェストwにより特徴付けられるビーム（破線で示される）をスweepアウトしてもよい。

40

【0282】

放出されたパルス8-222の測定された時間的強度プロファイル8-224は、図8-2Bに示されるように見え得る。いくつかの実施形態において、放出パルスのピーク強度値は略等しくてもよく、プロファイル8-224はガウス時間プロファイルを有してい

50

てもよいが、*sech* プロファイル等のその他のプロファイルもあり得る。場合により、パルスは対称の時間プロファイルを有していなくてもよく、他の時間的形狀を有していてもよい。いくつかの実施形態において、利得及び／又は損失ダイナミクスは非対称プロファイルを有するパルスを生成してもよい。各パルスの持続時間は、図 8-2 B に示されるように、半値全幅 (FWHM) 値により特徴付けられてもよい。超短光パルスの FWHM 値は 100 ピコ秒未満であってもよい。

【0283】

レーザ励起源からのパルス放出は規則的間隔 T で分離されてもよい。いくつかの実施形態において、 T は、レーザ内の能動的利得及び／又は損失変調率により決定される。モードロックレーザの場合、 T は、キャビティ端面ミラー 8-202、8-204 間の往復伝播時間により決定されてもよい。いくつかの実施形態によれば、パルス分離時間 T は約 1 ns ~ 約 100 ns であってもよい。場合により、パルス分離時間 T は、約 0.1 ns ~ 約 1 ns であってもよい。いくつかの実装形態において、パルス分離時間 T は約 100 ns ~ 約 2 μ s であってもよい。

【0284】

いくつかの実施形態において、光学システム 8-240 は、レーザ励起源 8-210 からパルス 8-222 のビームで動作してもよい。例えば、光学システムは、ビームを再整形し、及び／又はビームの発散を変化させるための 1 つ又は複数のレンズを含んでもよい。ビームを再整形する工程は、ビームウェストの数値を増減する工程、及び／又はビームの断面形状を変化させる (例えば、楕円形から円形、円形から楕円形、等) 工程を含んでもよい。ビームの発散を変化させる工程は、ビームフラックスを集束又は発散させる工程を含んでもよい。いくつかの実装形態において、光学システム 8-240 は、ビームエネルギーの量を変化させるための減衰器又は増幅器を含んでもよい。場合により、光学システムは波長フィルタ要素を含んでもよい。いくつかの実装形態において、光学システムは、パルス整形要素、例えばパルスストレッチャ及び／又はパルスコンプレッサを含んでもよい。いくつかの実施形態において、光学システムは、1 つ又は複数の非線形光学要素、例えばパルス波長を短縮するための飽和可能吸収器を含んでもよい。いくつかの実施形態によれば、光学システム 8-240 は、レーザ励起源 8-210 からのパルスの偏向を変化させるための 1 つ又は複数の要素を含んでもよい。

【0285】

いくつかの実装形態において、光学システム 8-240 は、励起源 8-210 からの出力波長を、周波数 2 通倍を介してより短い波長へ、又はパラメトリック増幅を介してより長い波長へ変換するための非線形結晶を含んでもよい。例えば、レーザの出力は、非線形結晶において (例えば、周期的分極ニオブ酸リチウム (PPLN) において)、又は他の非分極非線形結晶において周波数 2 通倍されてもよい。このような周波数 2 通倍プロセスによって、より効率的なレーザが、選択された蛍光体の励起により適した波長を生成することが可能となり得る。

【0286】

「特徴的波長」又は「波長」という語句は、励起源により形成された放射の限定的なバンド幅内の中央又は主要波長を指してもよい。場合により、これは、励起源により生成された放射のバンド幅内のピーク波長を指してもよい。励起源の特徴的波長は、例えば、生体解析装置内で使用される発光マーカ又はプローブの選択に基づいて選択されてもよい。いくつかの実装形態において、励起エネルギー源の特徴的波長は、選択された蛍光体の直接励起 (例えば、単一光子励起) のために選択される。いくつかの実装形態において、励起源の特徴的波長は、間接的励起 (例えば、多光子励起又は直接励起を提供する波長への高調波変換) のために選択されてもよい。いくつかの実施形態において、励起放射は、検体ウェルに印加するための特定の波長で励起エネルギーを生成するように構成された光源により生成されてもよい。いくつかの実施形態において、励起源の特徴的波長は、検体からの対応する放出の特徴的波長より小さくてもよい。例えば、励起源は、500 nm ~ 約 700 nm (例えば、515 nm、532 nm、563 nm、594 nm、612 nm、

10

20

30

40

50

632 nm、647 nm) の特徴的波長を有する放射を放出してもよい。いくつかの実施形態において、励起源は、例えば532 nm及び593 nm等、2つの異なる波長に中心のある励起エネルギーを提供してもよい。

【0287】

いくつかの実施形態において、パルス式励起源は、発光マーカの放出寿命を測定するために、発光マーカを励起するように使用されてもよい。これは、放出物の色又は波長ではなく、放出寿命に基づいて発光マーカを区別するために有益であり得る。一例として、パルス励起源は、発光マーカを周期的に励起することにより、その後の光子放出を生じさせ、検出してもよく、これはマーカに関する寿命の判定に使用される。発光マーカの寿命測定は、発光マーカの寿命より短い期間に、励起源からの励起パルスがピークパルスパワー又は強度から、より低い（例えば、ほとんど消失した）パワー又は強度へと推移したときに可能であり得る。励起パルスが迅速に終了し、発光マーカの寿命が評価されている励起後の段階中にそれが発光マーカを励起し直すことがなければ有利であり得る。例えば、ただし限定ではないが、パルスパワーは、250ピコ秒後にピークパワーより約20 dB、約40 dB、約80 dB、又は約120 dB低い数値まで低下し得る。いくつかの実装形態において、パルスパワーは、100ピコ秒後にピークパワーから約20 dB、約40 dB、約80 dB、又は約120 dB低い数値まで低下し得る。

10

【0288】

超短励起パルスを使用して発光マーカを励起するその他の利点は、マーカの光脱色を軽減させることである。連続的な励起エネルギーをマーカに印加すると、時間と共に発光マーカを漂白し、及び／又はそれに損傷を与え得る。励起源のピークパルスパワーが、連続的な露光されるマーカに急速に損傷を与えるレベルよりはるかに大きくても、超短パルスの使用によって、マーカが励起エネルギーにより損傷を受ける前の時間量と有益な測定の回数を増やすことができる。

20

【0289】

パルス式励起源を使用して発光マーカの寿命を判別する場合、励起エネルギーのパルス間の時間は、各励起パルス後に放出イベントを観察し、評価するために、マーカの最も長い寿命と同じか、それより長くてもよい。例えば、励起パルス間の時間間隔T（図8-2B参照）は、調査された蛍光体の何れの放出寿命より長くてもよい。この場合、後続のパルスは、先行するパルスからの励起された蛍光体が合理的時間で蛍光を発するまでは到達しない。いくつかの実施形態において、間隔Tは、蛍光体を励起する励起パルスと、励起パルスが終了してから次の励起パルスまでの間に蛍光体により放出される次の光子との間の時間を判定するのに十分な長さである必要がある。

30

【0290】

励起パルス間の間隔Tは、蛍光体の減衰特性を観察するのに十分に長くするべきであるが、Tは、短時間で多くの測定を行うのに十分に短いことも望ましい。例えば、限定ではないが、いくつかの用途で使用される蛍光体の放出寿命は、約100ピコ秒～約10ナノ秒の範囲であってもよい。したがって、このような寿命を検出し、及び／又は判別するために使用される励起パルスは、その持続時間（FWHM）が約25ピコ秒～約2ナノ秒であってもよく、約20 MHz～約1 GHzの範囲のパルス繰返し率で供給されてもよい。

40

【0291】

さらに詳しく説明すると、寿命測定のためのパルス式励起源を作るために、何れの適当な励起エネルギー変調方式が使用されてもよい。レーザ等の励起源の直接変調は、励起源の電気駆動信号を変調する工程を含んでもよい。放出されるパワーはパルスの形状となる。光学励起パワーを含む光源のための入力パワー、及び利得領域の一部からの励起状態キャリア注入及び／又はキャリア除去、利得媒体の利得に影響を与えるように変調されてもよく、それによってダイナミック利得整形を通じた励起エネルギーのパルス形成が可能になる。それに加えて、光学共振器の品質（Q）値が、Qスイッチング技術を使用してパルスを形成するための各種の手段で変調されてもよい。このようなQスイッチング技術は能動的及び／又は受動的であってもよい。レーザの共振キャビティの長手方向モー

50

ドは、モードロッキングを通じて放出光の一連のパルスを生成するために、フェーズロックされてもよい。このようなモードロッキング技術は、能動的及び／又は受動的であってもよい。レーザキャビティは、別の吸収区間を含んでいてもよく、それによってキャリア濃度の変調とその区間の吸収損失の制御が可能となり、そのため、励起パルスを整形するための追加のメカニズムが提供される。いくつかの実施形態において、連続波（CW：continuous wave）光のビームを励起エネルギーのパルスの形態となるように変調するために、光学モジュレータが使用されてもよい。他の実施形態において、励起源に連結された音響光学モジュレータ（AOM：acoustic optical modulator）に送信される信号は、パルス式励起エネルギーを生成するための出力光の偏向、強度、周波数、位相、及び／又は偏光を変化させるために使用されてもよい。AOMはまた、連続波ビームスキニング、Qスイッチング、及び／又はモードロッキングに使用されてもよい。上記の技術はパルス式励起源を作ることに関して説明されているが、発光マーカの寿命を測定するために、パルス式励起源を生成するための何れの適当な方法が使用されてもよい。

10

【0292】

いくつかの実施形態において、寿命測定に適したパルス式励起源の技術としては、光子放出を駆動する入力電気信号の変調を含んでいてもよい。いくつかの励起源（例えば、ダイオードレーザとLED）は、入力電流等の電気信号を光信号に変換する。光信号の特徴は、電気信号の特徴に依存していてもよい。パルス光信号を生成する中で、電気信号は時間と共に変化して、可変的な光信号を生成してもよい。電気信号を、特定の波長を有するように変調することにより、特定の波長を有する光信号を生成できる。電気信号は、特定の周波数の正弦波形を有していてもよく、その結果得られる光のパルスは、周波数に関連する時間間隔内で発生してもよい。例えば、周波数が500MHzの電気信号は、2ナノ秒毎に拍動する光信号を生成してもよい。相互に同様でも異なってもよい別々のパルス式励起源により生成される合成ビームは、相対的な経路の差が1mm未満であってもよい。

20

【0293】

レーザダイオード等のいくつかの励起源において、電気信号はキャリア濃度を变化させ、光子は電子正孔対を再び組み合わせることを通じて生成される。キャリア濃度は光信号に関係しており、キャリア濃度が閾値より高い場合、シミュレーションによる放出を通じて実質的な数のコヒーレント光子が生成される。レーザダイオードに供給される電流は、機器内に電子又はキャリアを注入してもよく、それによってキャリア濃度が高まる。キャリア濃度が閾値より高いと、光子は電流がキャリアに供給されるより高速で生成されてもよく、そのため、キャリアの濃度は閾値より減少し、光子の生成が減少する。光子の生成が減少すると、電流の注入と光子の吸収が続くために、キャリア濃度は再び増大し始め、最終的に再び閾値を超える。このサイクルの結果、キャリア濃度は光子生成のための閾値の周囲で変動し、振動する光信号が得られる。弛緩振動と呼ばれるこのようなダイナミクスは、キャリア濃度の変動によって、光信号内のアーチファクトの原因となり得る。電流がまずレーザに供給されると、キャリア濃度の変動により、光信号が安定下パワーに到達する前に振動があってもよい。パルス式励起源を形成する際、キャリア濃度の変動は、パルス式光信号に関するアーチファクトを導入し得る。例えば、図8-3のプロットは、キャリア濃度がどのように弛緩振動を有するか、及び利得スイッチングによる変調を通じて、変動するパワーを有する、それに対応する光信号を示す。このような弛緩信号からのアーチファクトは、パルス式光信号の幅を広げ、及び／又は光信号のテールを生じさせ得、それによって、励起信号が発光マーカにより放出された光子と重なる可能性があるため、このようなパルス光源により検出可能な寿命が限定される。

30

40

【0294】

いくつかの実施形態において、発光マーカを検出するために必要な励起エネルギーを減少させ、それによって発光マーカの漂白及びその他の損傷を減少させ、又は遅延させるために、励起パルスの持続時間を短縮するための技術が使用されてもよい。励起パルスの最

50

大値、すなわちピークの後に励起エネルギーのパワー及び／又は強度を低下させ、それによってより短い寿命の検出を可能にするために、励起パルスの持続時間を短縮する技術が使用されてもよい。このような技術は、ピークパワーの後の励起パワーを低下させるために、励起源を電氣的に駆動してもよい。これは、図8-4のプロット8-401に示されるようなパルスのテールを抑制し得る。電気駆動信号は、励起エネルギーのパルスの強度を、ピークパルス後できるだけ早くゼロにするように調整されてもよい。調整された電気駆動信号を利用スイッチングと組み合わせた例が、図8-4のプロット8-402に示されている。このような技術は、ピークパワーが生成された後に電気駆動信号の符号を反転させる工程を含んでいてもよい。このような調整された電気駆動信号は、図8-4のプロット8-403に示される光出力を生成してよい。電気信号は、光信号の第一の弛緩振動又は第一の変動の後にキャリア濃度を迅速に減少させるように調整されてもよい。第一の変動の後にキャリア濃度を減少させることによって、第一の変動のみの光パルスを生成できる。電気信号は、信号のピーク後に放出される光子の数を減らすことによって、光信号を迅速にオフにする短いパルスを生成するように構成されていてもよく、これはこのような電気信号の光出力を示す図8-5のプロットにより示されている。ピコ秒のレーザダイオードシステムは、いくつかの実施形態によれば、光パルスを放出するように設計されてもよい。図8-6は、ピーク985 mW、幅84.3ピコ秒の例示的な光パルスと、ピークの約250ピコ秒後に約24.3 dBだけ減少した信号のプロットを示す。いくつかの実施形態において、半導体可飽和吸収ミラー（SESAM: semiconductor saturable absorber）を含む可飽和吸収手段が光学的テールを抑制するために使用されてもよい。このような実施形態において、可飽和吸収手段の使用は、光学的テールを3~5 dBだけ、又はいくつかの例では5 dBより大きく抑制できる。励起パルス内のテールの影響を小さくすることによって、励起エネルギーをさらにフィルタ処理する必要性が低下し、及び／又はなくなり、測定可能な寿命の範囲が広がり、及び／又はパルス速度をより高速にできる可能性がある。励起パルス速度を高めることにより、ある時間内により多くの実験をできることになりえ、これによって検体物質に標識するマーカのための寿命を識別するのに十分な統計を得るために必要な時間も短縮し得る。

【0295】

それに加えて、これらの技術の2つ以上を一緒に使用して、パルス式励起エネルギーを生成してもよい。例えば、直接変調される励起源から放出されるパルス式励起エネルギーは、光変調技術を使用してさらに変調されてもよい。励起パルスを変調し、電気パルス駆動信号をカスタム化するための技術は、寿命測定を実行するためのパルス式励起エネルギーを最適化するために、どのような方法で組み合わせられてもよい。カスタム化された電気駆動信号は、直接変調励起源からのパルス式励起エネルギーに印加されてもよい。

【0296】

いくつかの実施形態において、特定の数のワイヤボンドを有するレーザダイオードがパルス式励起源として使用されてもよい。より多くのワイヤボンドを有するレーザダイオードは、励起源のインダクタンスを低下させることができる。よりインダクタンスの低いレーザダイオード（図8-7のインダクタ8-701により表される）によって、レーザ内への電流がより高周波数で動作できることになる。図8-7に示されているように、50オームの伝送線で18 Vパルスにより駆動されると、3オームの直列抵抗成分（抵抗器8-702により表される）と36のワイヤボンドを有するオクラロ（Oclaro）レーザ源8-700は、より少ないワイヤボンドのレーザ源より高周波数で高電流を有する。インダクタンスを最小化するパッケージング方法を選択することによって、より高い周波数で励起源に供給されるパワーを改善してもよく、それによって励起パルスの短縮、ピーク後の光パワー減衰の高速化、及び／又は発光マーカ検出のパルス反復率増大が可能となる。

【0297】

いくつかの実施形態において、伝送線が励起源と共に光パルス生成のために使用されてもよい。伝送線は、光パルスの性能及び／又は品質を改善するために、レーザダイオード

のインピーダンスとマッチしてもよい。いくつかの実施形態において、伝送線のインピーダンス 50 オームであってもよい。いくつかの例において、終端抵抗は、反射を防止するために線の抵抗と同様であってもよい。その代わりに、又はそれに加えて、終端インピーダンスは、反射防止のために、線インピーダンスと同様であってもよい。終端インピーダンスは、負のパルスを反射するために、線インピーダンスより小さくてもよい。他の実施形態において、終端インピーダンスは、負の反射パルスの形状を制御するために、容量又はインダクタンス成分を有していてもよい。他の実施形態において、伝送線により高周波数のパルスが可能となる。図 8-8 A は、伝送線パルスの例示的プロトタイプを示し、図 8-8 B は、このような伝送線で得られる光パルスの例示的な時間プロファイルを示す。伝送線の使用により、40 MHz ~ 500 MHz の範囲の周波数を有する電気パルスが生成されてもよい。伝送線は、特定の持続時間と具体的な時間間隔を有する光パルスでパルス式光源を生成するために、上述のようなカスタム電気信号と共に使用されてもよい。

10

【0298】

電気信号をカスタム化して、光パルスの生成を改善するための技術は、励起源を負のバイアス能力を有する回路に接続する工程を含んでいてもよい。いくつかの実施形態において、光パルス放出の後に励起源に負のバイアスがかけられて、光パルスのテールの放出を減少させてもよい。図 8-9 は例示的回路 8-900 を示し、これは、電流源 8-901 と、ダイオードレーザ 8-902 と、抵抗器 8-903 と、コンデンサ 8-904 と、スイッチ 8-905 とを含み、これらは光パルスのテールの存在を減少させるために実装されていてもよい。このような回路 8-900 は、スイッチ 8-905 が閉じているとき、すなわち導電状態のときに、ダイオードレーザ 8-902 をバイパスする定電流を生じさせてもよい。スイッチ 8-905 が開いているとき、スイッチ 8-905 は高抵抗を有していてもよく、電流はダイオードレーザ 8-902 を通って流れることができる。光パルスは、スイッチ 8-905 を開閉してダイオードレーザ 8-902 に間欠的電流を供給することによって生成されてもよい。いくつかの例において、抵抗器 8-903 は十分に高く、コンデンサ 8-904 は十分に小さくてもよく、それによってスイッチ 8-905 が開くとコンデンサ 8-904 に電圧が生じ、ダイオードレーザ 8-902 が光を放出する。スイッチ 8-905 が閉じていると、コンデンサ 8-904 の電圧がダイオードレーザ 8-902 を逆バイアスする。このような逆バイアスは、光パルス内のテールの存在を減少させ、又は除去できる。このような例では、スイッチ 8-905 は、光パルスのピークの後に閉じて、ピーク光パルスの直後のレーザパワーを減少させるように構成されてもよい。回路 8-900 内の抵抗器 8-903 の値は、スイッチがその後開き、及び／又はその後の光パルスがレーザダイオード 8-902 により生成される前に、コンデンサ 8-904 の電荷が放出されるように選択されてもよい。

20

30

【0299】

レーザダイオードの電気信号をカスタム化して、光パルスを生成するために、追加の回路構成要素が提供されてもよい。いくつかの実施形態において、複数のコンデンサ、抵抗器、及び電圧をネットワーク回路として接続して、レーザダイオードに供給される電気信号の波形を制御してもよい。制御される波形は、N 個のコンデンサ分岐回路があるとき、対応する信号 S1、S2、...、SN で様々な電圧 V1、V2、...、VN を切り換えることによって生成してもよい。4 つのコンデンサ分岐回路の例示的なネットワーク回路が図 8-10 に示されており、制御される電気波形は、それぞれ信号 S1、S2、S3、及び S4 で電圧 V1、V2、V3、及び V4 を切り換えることによって生成されてもよい。いくつかの実施形態において、電圧 V1、V2、V3、V4 は可変であってもよい。図 8-10 に示される例において、V4 はレーザに対して負であり、信号 S4 に応じて逆バイアスを生じさせてもよい。レーザにより放出される光パルスの周波数のタイミング、各光パルスの持続時間、及び各光パルスの特徴は、信号入力 S1、S2、S3、及び S4 で調整されてもよい。いくつかの実施形態において、別の抵抗を追加してピーク電流を低下させてもよい。このような例において、スイッチ S1、S2、S3、S4 の 1 つ又は複数の後に抵抗が追加されてもよい。図 8-10 は 4 つのコンデンサと 4 つの電圧を有する

40

50

1つの構成を示しているが、レーザダイオードへのカスタム電気信号を生成して、寿命測定のための光パルスを生成するために、何れの適当な構成と、何れの適当な数の追加の回路構成要素が提供されてもよい。

【0300】

いくつかの実施形態において、光パルスを生成するための電気信号は、無線周波数（RF：radio frequency）及び／又はマイクロ波構成要素をはじめとする個別構成要素を有する回路を使用してよい。このような回路に含めることのできる個別部品は、DCブロック、アダプタ、ロジックゲート、ターミネータ、位相シフタ、遅延回路、減衰器、コンバイナ、及び／又はRF増幅器である。このような部品は、特定の振幅を有する正の電気信号と、それに続く別の振幅の負の電気信号を生成するために使用されてもよい。正及び負の電気信号間には遅延があってもよい。図8-11Aは、1つのRF増幅器を有する例示的な回路を示しており、これは、光パルスを放出するためのレーザダイオード等の励起源に供給できる、例えば図8-11Bに示されるパルスプロファイルのカスタム電気信号を出力パルスとして生成するために使用できる。このような回路は、光パルスのパワーを増大させるために使用可能な異なる出力を生成してもよい。回路の個別部品を調整することによって、電気出力信号は、寿命測定に適した光パルスを生成するために調整されてもよい。図8-12Aに示される例においては、2つのRF増幅器が使用され、図8-12Bに示されるプロファイルを有する出力パルス信号を生成し、これは、正の電気信号パルスとそれに対応する負の電気信号パルスからなり、正及び負の電気信号パルスが重複して同様の幅を有する。

【0301】

いくつかの実施形態において、励起源を組み合わせて、寿命測定のための光パルスを生成してもよい。同期させたパルス源を特定の距離にわたり、回路又は負荷に接続してもよい。いくつかの実施形態において、励起源を回路に並列に接続してもよい。励起源は、同じソースからでも、複数のソースからでもよい。複数のソースを有するいくつかの実施形態において、複数のソースは異なる種類の励起源であってもよい。ソースを組み合わせる場合、回路と励起源のインピーダンスを考えて、十分なパワーが励起源に供給されるようにすることが重要であり得る。ソースの組合せは、パルス式励起源を生成するための上述の技術の1つ又は複数を使用して実現してもよい。図8-13Aは、1つ又は複数のインピーダンス値を有する4つの異なるソースを組み合わせる場合の概略図を示す。図8-13Bは、インピーダンスに関する電流、パワー効率、及び電圧のプロットを示す。この例示的な実施形態は、50オームの伝送線上でパワーを供給する4つのソースを示し、負荷のインピーダンスが個々の線のインピーダンスとソースの数との比と等しいときに最適なパワー供給が行われることを示している。

【0302】

励起源は、励起源に電源を供給するように配置されたバッテリー又は他の何れの電源を含んでいてもよい。例えば、励起源はベースとなる機器内に配置されてもよくその動作電力は、それが（例えば、導電電源リードを介して）集積生体解析装置を通じて受け取られてもよい。励起源は、集積生体解析装置の制御とは独立して制御されても、又はそれと連動していてもよい。一例にすぎないが、励起源のための制御信号は、無線で、又はパーソナルコンピュータ及び／又は集積生体解析装置との有線相互接続（例えば、USB相互接続）を介して、励起源に供給されてもよい。

【0303】

いくつかの実施形態において、励起源は、集積装置の1つ又は複数のセンサとタイムゲート方式及び／又は同期方式で動作してもよい。例えば、励起源をオンにして発光マーカを励起し、その後、オフにしてもよい。センサは、励起源がオンであるときにオフにされてもよく、その後、励起源がオフにされた後のサンプリング間隔中にオンにされてもよい。いくつかの実施形態において、センサは、サンプリング間隔中にオンにされてもよく、その一方で励起源はオンにされる。

【0304】

いくつかの実施形態において、520nmの励起光を提供するために、例えばオスラム（Osram）PL 50mWレーザが使用される。あるいは、530nm又は532nmの励起光が使用される。その代わりに、及び／又はそれに加えて、637nmの励起光を供給するために、例えばソーラボ（Thorlabs）LP637-SF70 70mWレーザが使用される。別の例は、638nmで励起するオクラロ（Oclaro）HL63133レーザダイオードである。これらのレーザ源又はその他の適当なレーザ源は、単独でも組み合わせても使用してよい。1つ又は複数のレーザ源が使用され、各ソースからの励起光がビームコンバイナで結合され、その後、アッセイチップに誘導される。各光源は、光ファイバに連結されてもよく、その後、その合計がバンドル状にされてもよい。光ファイバからの射出光の光学的特徴は、光学整形素子（OSE: optical shaping element）を使用して制御されてもよい。任意選択により、マルチプレクサが使用されてもよく、この場合、複数の光源からのレーザ光が偏光、波形、及び／又は空間パラメータによって多重化され、1本の光ファイバで送信される。異なる波長をスペクトル分離して、これらが4つのサブセンサの1つに向かって誘導されるようにするために、回折光学素子（DOE）が使用されてもよい。

10

A. 複数の励起源

複数の励起源が、異なるエネルギー又は波長を有する光を複数の検体ウェルに供給してもよい。複数の励起源の各々は、異なる特徴波長又はエネルギーを有する光を供給してもよい。1つ又は複数のマークは、励起源からの光がマークを励起して、マークが光子を放出するようにするか否かに基づいて識別されてもよい。このようにして、異なる励起源からの光で検体を照明した後、検体の応答を測定することによって、マークがその吸収スペクトルに基づいて識別されてもよい。例えば、マークを有する検体は、第一の励起源からの光、及びそれに続いて第二の励起源からの光で照明されてもよい。マークが第一の励起源からの光で照明されたことに応答して発光した場合、マークは第一の励起源の特徴波長と重複する吸収スペクトルを有していてもよい。

20

【0305】

いくつかの実施形態において、励起エネルギーのために複数の励起源を使用することが可能である。複数の励起源は、例えば複数のダイオードレーザエミッタを含むダイオードレーザバーとして実装されてもよい。レーザダイオードの製造において複数のエミッタが1枚の基板の上にリソグラフィによって共通に製造され、その後、シングルエミッタ部品へとダイシングされ、個々にパッケージングされる。しかし、複数のエミッタを有する基板にダイシングすることも可能である。いくつかの実施形態において、エミッタはほとんど同じであり、相互にリソグラフィ許容度に合わせて相互から均等に離間されていてもよく、これは典型的には0.1マイクロメートルのオーダーである。

30

VI. 使用方法、機器の動作、及びユーザインタフェース

機器2-120は、ソフトウェア及び／又はハードウェアを使用して制御されてもよい。例えば、機器はASIC、FPGA、及び／又は汎用プロセッサ実行ソフトウェア等の処理装置2-123を使用して制御されてもよい。

【0306】

図9-1は、いくつかの実施形態による機器2-120の動作のフローチャートを示す。使用者が解析する試料を取得した後、使用者は動作9-101で新たな解析を開始する。これは、例えばボタンを押すことにより、ユーザインタフェース2-125を通じて機器2-120に指標を提供することにより行われてもよい。動作9-103で、機器2-120は、アッセイチップ2-110が以前に実行された解析から依然として機器2-120内に挿入されたままであるか否かをチェックする。古いアッセイチップが存在すると判断されたら、動作9-105で励起源への電源がオフにされてもよく、使用者は動作9-107で、ユーザインタフェース2-125のインディケータを使用して前のアッセイチップを取り取り出すように促され、機器2-120は、動作9-109で古いアッセイチップが取り出されるのを待つ。

40

【0307】

50

前のアッセイチップが使用者により取り出されると、又は機器 2-120 が動作 9-103 で前のアッセイチップがすでに取り出されたと判断すると、使用者は動作 9-111 で新たな解析のための新たなアッセイチップ 2-110 を挿入するように促される。したがって、機器 2-120 は、動作 9-113 で新しいアッセイチップ 2-110 が挿入されるのを待つ。使用者が新しいアッセイチップを挿入すると、使用者は動作 9-115 で、ユーザインタフェース 2-125 のインディケータにより、解析すべき試料をアッセイチップ 2-110 の露出された上面に載せるように促され、また機器 2-120 の蓋を閉めるように促される。次に、機器 2-120 は動作 9-117 で蓋が閉められるのを待つ。使用者により蓋が閉められると、動作 9-119 で、励起源が駆動されて、例えばアッセイチップ 2-110 の検体ウェル内にある試料の検体部分を励起するための励起エネルギーを生成してもよい。動作 9-121 で、検体からの放出エネルギーがセンサ 2-122 により検出され、センサ 2-122 からのデータが解析のために処理装置 2-123 へと供給される。いくつかの実施形態において、データは外部のコンピューティングデバイス 2-130 に供給されてもよい。動作 2-123 で、機器 2-120 はデータ取得が完了したか否かをチェックする。データ取得は、特定の長さの時間、励起源からの特定の数の励起パルス、又は 1 つの特定の標的が特定された後に完了してもよい。データ取得が完了すると、9-125 でデータ解析が終了する。

【0308】

図 9-2 は、いくつかの実施形態によるある例示的な自己校正を示す。校正ルーチンは、試料の解析の前の何れの適当な時間に実行されてもよい。例えば、これは各機器が最終使用者に出荷される前に製造者により 1 回行われてもよい。その代わりに、最終使用者が何れの適当な時間に校正を実行してもよい。前述のように、機器 2-120 は異なる検体から放出される異なる波長を有する放出エネルギーを区別できる。機器 2-120 及び／又はコンピューティングデバイス 2-130 は、例えば解析対象の試料の分子にタグ付けするために使用される発光タグに関連する光の特定の色の各々に関連付けられる校正で校正されてもよい。このようにして、特定の色に関連付けられる正確な出力信号が判定されてもよい。

【0309】

装置を校正するために、1 つの発光タグに関連する校正試料が 1 度に 1 つずつ機器 2-120 に提供される。自己校正は、動作 9-201 で、使用者が単一波長の放出エネルギーを放出する発光タグを含む試料をアッセイチップ 2-110 に載せ、このアッセイチップ 2-110 を機器 2-120 に挿入したときに始まる。使用者は、ユーザインタフェース 2-125 を使用して、機器 2-120 に対し、自己校正を開始するように指示する。これに応答して、動作 9-203 で、機器 2-120 はアッセイチップ 2-110 を励起エネルギーで照明し、校正試料からの単一波長放出エネルギーを測定することによって校正解析を実行する。その後、動作 9-205 で、機器 2-120 はセンサアレイの各ピクセルに関するセンサ 2-122 のサブセンサのアレイ上で測定された検出パターンを保存する。各発光タグの検出パターンは、発光タグに関連付けられる検出署名と考えられてもよい。このようにして、署名は訓練データとして使用されてもよく、これは後の解析の実行において解析される未知の検体から受け取ったデータの解析に使用される。

【0310】

上述の校正ルーチンがその後、1 つの発光タグに関連する個々の校正試料について実行されてもよい。このようにして、ピクセルアレイの各センサ 2-122 は校正データに関連付けられ、これは校正ルーチンの完了後、動作 9-207 で実行されるその後の解析中に検体ウェル内にある発光タグを判定するために使用されてもよい。

【0311】

図 9-3 は、いくつかの実施形態により、校正データがどのように取得され、使用されてデータが解析されるかをさらに示している。動作 9-301 で、校正データがセンサから得られる。これは、上述の自己校正ルーチンを使用して実行されてもよい。動作 9-303 で、校正データに基づいて変換マトリクスが生成される。変換マトリクスはセンサデ

ータを検体の放出波長にマッピングし、 $m \times n$ のマトリクスであり、 m は異なる放出波長の発光タグの数であり、 n は1ピクセルあたりの校正エネルギー検出に使用されサブセンサの数である。そのため、変換マトリクスの各列は、センサに関する校正値を表す。例えば、1ピクセルあたり4つのサブセンサと5つの異なる蛍光タグがある場合、変換マトリクスは 4×5 のマトリクス（すなわち、4つの行と5つの欄）であり、各欄が異なる発光タグに関連付けられ、欄内の数値は自己校正ルーチン中にサブセンサから得られた測定値に対応する。いくつかの実施形態において、各ピクセルはそれ自体の変換マトリクスを有していてもよい。他の実施形態において、ピクセルの少なくともいくつかからの校正データが平均化されてもよく、したがって、全てのピクセルが平均データに基づく同じ変換マトリクスを使用してもよい。

10

【0312】

動作9-305で、バイオアッセイに関連する解析データがセンサから得られる。これは上述の何れの方法で行われてもよい。動作9-307で、放出エネルギーの波長及び／又は発光タグの識別は、変換マトリクスと解析データを使用して判定されてもよい。これは、何れの適当な方法で行われてもよい。いくつかの実施形態において、解析データに変換マトリクスの擬似逆行列を乗じ、その結果、 $m \times 1$ ベクトルとなる。したがって、その行列値を有するベクトル成分に関連付けられる蛍光タグが、検体ウェル内にある発光タグとして識別されてもよい。実施形態は、この技術に限定されない。いくつかの実施形態において、小さい数値のマトリクスの逆数をとると生じ得る異常を防止するために、最小二乗法又は最尤度法等の条件付最適化ルーチンを実行して、検体ウェル内に存在する発光タグを判定してもよい。

20

【0313】

校正データを使用してセンサからのデータを解析する上述の方法は、何れの適当なプロセッサにより実施されてもよい。例えば、機器2-120の処理装置2-123が解析を実行してもよく、又はコンピューティングデバイス2-130が解析を実行してもよい。

VII. アッセイチップと機器による測定例

検体中の分子を検出、解析、及び／又は探索するための測定値は、本願に記載されているアッセイチップと機器の何れかとの組合せを使用して得られてもよい。励起源は、パルス式励起源であっても、いくつかの例では連続波源であってもよい。特定の検体にタグ付けされた発光マーカは、その検体の存在を示してもよい。発光マーカは、励起エネルギー、放出エネルギー、及び／又はマーカにより放出される放出エネルギーの寿命により区別されてもよい。同様の発光放出波長を有するマーカは、各マーカに関する寿命を判定することによって識別されてもよい。それに加えて、同様の寿命のマーカは、各マーカの発光放出波長により識別されてもよい。マーカを使用することによって、マーカが放出される発光の時間的及び／又はスペクトル特性の組合せによって識別される場合、マーカとそれに関連する検体の定量的解析及び／又は識別を実行できる。

30

【0314】

寿命測定は、マーカが検体ウェル内に存在することを判定するために使用されてもよい。発光マーカの寿命は、発光マーカが励起状態へと励起され、その後、光子が放出された時間が測定される実験を何度も実行することによって識別されてもよい。励起源は励起エネルギーのパルスを生成するためにパルス式とされ、マーカへと向けられる。励起パルスとその後の発光マーカからの光子放出イベントまでの時間が測定される。このような実験を複数の励起パルスについて繰り返すことによって、特定の時間間隔内に光子が放出された回数が測定されてもよい。このような結果は、一連の個別の時間間隔又はタイムビン内で発生する光子放出イベントの数を表すヒストグラムをポピュレートしてもよい。タイムビンの数及び／又は各ビンの時間間隔は、特定の寿命及び／又はマーカの集合を識別するために調整されてよい。

40

【0315】

次に、いくつかの実施形態において発光マーカを識別するために行われる測定の例を説明する。具体的には、発光寿命測定のみ、スペクトルと発光寿命との合同測定、及び発光

50

寿命測定のみであるが、使用する励起エネルギーが2種類であるものを使用して発光マーカを識別する例を説明する。実施形態は後述の例に限定されない。例えば、いくつかの実施形態は、スペクトル測定のみを使用して発光マーカを識別してもよい。

【0316】

何れの適当な発光マーカが使用されてもよい。いくつかの実施形態において、市販の蛍光体を使用されてもよい。例として、ただし限定ではなく、以下の蛍光体を使用されてもよい：アットロー (A t t o R h o) 14 (「A T R h o 14」)、ディライト (D y l i g h t) 650 (「D 650」)、セタタウ (S e t a T a u) 647 (「S T 647」)、C F 633 (「C 633」)、C F 647 (「C 647」)、アレクサフルー (A l e x a f l u o r) 647 (「A F 647」)、ボディパイ (B O D I P Y) 630/650 (「B 630」)、C F 640R (「C 640R」)、及び／又はアット (A t t o) 647N (「A T 647N」)。

10

【0317】

それに加えて、及び／又は任意選択により、発光マーカは、検体解析プロセスの速度と精度を高めるために、何れの適当な方法で変更されてもよい。例えば、フォトスタビライザを発光マーカの共役としてもよい。フォトスタビライザの例としては、脱酸素剤又は三重項状態クエンチャが含まれるが、これらに限定されない。フォトスタビライザを発光マーカの共役とすることにより、放出される光子の速度が増大し得、また、発光マーカが光子を放出しない「明滅」効果を低減させ得る。いくつかの実施形態において、生物学的イベントがミリ秒スケールで発生すると、光子放出速度が増し、その生物学的イベントの検出確率が高まり得る。光子イベントの発生率の増加により、その後、発光信号の信号対ノイズ比が増大し、寿命測定が行われる速度も高まり、それが高速でより正確な検体解析につながる。

20

【0318】

さらに、集積装置の検体ウェル内の環境が、必要に応じてマーカの寿命を操作するように調整されてもよい。これは、マーカの寿命が、環境を使用して調整可能なマーカの状態の密度により影響を受ける点を認識することによって実現できる。例えば、マーカが検体ウェルの下側金属層から遠いほど寿命は長くなる。したがって、マーカの寿命を延ばすために、検体ウェルの底面、例えば窪みの深さを金属層から特定の距離だけ延ばしてもよい。また、検体ウェルを形成するために使用される材料は、マーカの寿命に影響を与える可能性がある。異なるマーカは典型的に、それぞれの寿命が同じ方向に（例えば、より長い、より短い）シフトするが、影響の大きさはマーカの違いによって異なり得る。したがって、自由空間内の寿命測定では区別不能な2つのマーカは、各種のマーカの寿命を調整するように検体ウェル環境を製造することにより、区別可能となるように操作してもよい。

30

A. 単一分子検出と配列解析

本願のある態様によれば、単一分子は、複数の別々の光パルスにさらされたときに分子から放出される一連の光子の1つ又は複数の特性に基づいて識別（例えば、反応検体内の他のあり得る分子から区別）できる。いくつかの実施形態において、分子に発光マーカで標識する。いくつかの実施形態において、発光マーカは蛍光体である。いくつかの実施形態において、発光マーカは発光マーカの特性に基づいて識別又は区別可能である。発光ラベル（例えば、蛍光体）の特性としては、発光寿命、吸収スペクトル、放出スペクトル、発光量子収量、発光強度、及びこれらの2つ以上の組合せが含まれるが、これらに限定されない。

40

【0319】

生物検体は、検出（例えば配列解析）のための処理中に加工されてもよい。このような加工は、生物検体からの生体分子（例えば、核酸分子）の分離及び／又は精製、及びその生体分子のより多くのコピーの生成を含むことができる。いくつかの例において、1つ又は複数の核酸分子は被験者の体液又は組織から分離、精製され、ポリメラーゼ連鎖反応（PCR：p o l y m e r a s e c h a i n r e a c t i o n）等の核酸増幅を通じて

50

増幅される。その後、1つ又は複数の核酸分子又はそのサブユニットを、例えば配列解析を通じて識別できる。しかしながら、いくつかの実施形態において、核酸検体は、増幅を必要とせずに、本願に記載されているように評価できる（例えば、配列解析）。

【0320】

配列解析は、鋳型生体分子（例えば、核酸分子）の個々のサブユニットを、その鋳型と相補的又は相似である他の生体分子を合成し、例えば鋳型核酸分子と相補的な核酸分子を合成し、時間に伴うヌクレオチドの組込みを特定することによる判定を含むことができる。代替案として、配列解析は、生体分子の個々のサブユニットの直接的識別を含むことができる。

【0321】

配列解析中、高分子合成酵素が標的核酸分子のプライミング位置に結合（例えば、付着）してもよい。プライミング位置は、標的核酸分子と相補的なプライマとすることができる。代替案として、プライミング位置は標的核酸分子の二本鎖セグメント内に提供されるギャップ又はニックである。ギャップ又はニックの長さは、0～少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、20、30、又は40ヌクレオチドとするができる。ニックは、二本鎖配列の1本の切れ目を提供でき、これは、例えば鎖置換ポリメラーゼ酵素等の高分子合成酵素のためのプライミング位置を提供できる。

【0322】

場合により、配列解析プライマは、検体ウェル等の固体サポートに固定されてもされなくともよい標的核酸分子にアニールすることができる。いくつかの実施形態において、配列解析プライマは、固体サポートに固定されていてもよく、標的過酢酸分子のハイブリダイゼーションも標的核酸分子を固体サポートに固定する。ヌクレオチドをプライマに追加し、又は組み込むことのできる酵素（例えば、ポリメラーゼ）の作用を通じて、ヌクレオチドはプライマに5'－3'鋳型結合方式でプライマに追加できる。このようにヌクレオチドをプライマに（例えば、ポリメラーゼの作用を介して）組み込むことは一般に、プライマ伸長反応と呼ぶことができる。各ヌクレオチドは、検出可能タグに関連付けることができ、これを検出し、プライマに組み込まれた各ヌクレオチドを判定するため、したがって新規に合成された核酸分子の配列解析に使用できる。新規に合成された核酸分子の配列相補性を介して、標的核酸分子の配列も判定できる。場合により、配列解析プライマの標的核酸分子へのアニーリングとヌクレオチドの配列解析プライマへの組込みは、同様の反応条件（例えば、同じ又は同様の反応温度）でも、異なる反応条件（例えば、異なる反応温度）でも起こり得る。さらに、合成方法による配列解析には、標的核酸分子の集団（例えば、標的核酸のコピー）の存在及び／又は標的核酸を増幅して標的核酸の集団を実現する工程を含むことができるものもある。

【0323】

実施形態は、高精度とロングリード長で単一核酸分子の配列解析を行うことができる。いくつかの実施形態において、単一分子配列解析において使用される標的核酸分子は、一本鎖標的核酸（例えば、デオキシリボ核酸（DNA）、DNA誘導体、リボ核酸（RNA）、RNA誘導体）鋳型であり、これを、検体ウェルの底部等の固体サポートに固定又は付着された配列解析反応の少なくとも1つの追加成分（例えば、DNAポリメラーゼ等のポリメラーゼ、配列解析プライマ）を含む検体ウェルに追加又は固定される。標的核酸分子又はポリメラーゼは、検体ウェル、例えば検体ウェルの底部に直接又はリンカーを通じて取り付けることができる。検体ウェルはまた、プライマ伸長反応を介した核酸合成に必要な他の何れの試薬、例えば、適当な緩衝液、余因子、酵素（例えば、ポリメラーゼ）、及び蛍光体等の発光タグを含む、デオキシアデノシン三リン酸（dATP）、デオキシチジン三リン酸（dCTP）、デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）、デオキシユリジン三リン酸（dUTP）及びデオキシチミジン三リン酸（dTTP）dNTPをはじめとするデオキシリボヌクレオシド三リン酸等のデオキシヌクレオシドリン酸も含むことができる。dNTPの各クラス（例えば、アデニン含有dNTP（例えば、dATP）、シトシン含有dNTP（例えば、dCTP）、グアニン含有dNTP（例えば、dGTP）

、ウラシル含有d N T P（例えば、d U T P）、及びチミン含有d N T P（例えば、d T T P））が異なる発光タグの共役とされ、タグから放出される光の検出は新規に合成された核酸に組み込まれたd N T Pの識別を示す。発光タグからの放出光は、例えば本明細書の他の箇所に記載されている検出装置と方法を含む何れの適当な装置及び／又は方法を介して検出し、その適当な発光タグ（及びしたがって、関連するd N T P）への属性を特定することができる。発光タグは、何れの適当なd N T Pの共役とされてもよく、それによって発光タグの存在は新規に合成された核酸分子鎖へのd N T Pの組込み又はポリメラーゼの活動を阻止しない。いくつかの実施形態において、発光タグはd N T Pの末端リン酸（ガンマリン酸）の共役とされる。

【0324】

10

一本鎖標的核酸鋳型は、配列解析プライマ、d N T P、ポリメラーゼ、及び核酸合成に必要なその他の試薬と接触させることができる。いくつかの実施形態において、全ての適当なd N T Pを一本鎖標的核酸鋳型と同時に接触させることができ（例えば、全てのd N T Pが同時に存在する）、それによってd N T Pの組込みを連続的に起こすことができる。他の実施形態において、d N T Pを一本鎖標的核酸鋳型に逐次的に接触させることができ、この場合、一本鎖標的核酸鋳型は適当なd N T Pの各々と別々に接触させられ、一本鎖標的核酸鋳型と異なるd N T Pとの接触間に洗浄工程がある。一本鎖標的核酸鋳型と各d N T Pとの別々の接触と、その後の洗浄というこのようなサイクルは、識別されるべき一本鎖標的核酸鋳型の連続する各塩基位置について繰り返すことができる。

【0325】

20

配列解析プライマは、一本鎖標的核酸鋳型にアニールされ、その結果、ポリメラーゼがd N T P（又はその他のデオキシリボヌクレオシドポリリン酸）を、一本鎖標的核酸鋳型を介してプライマに組み込む。組み込まれた各d N T Pに関連付けられる固有の発光タグは、d N T Pをプライマに組み込んでいる間又はその後に適当な励起光で励起することができ、その放出はその後、本明細書の他の箇所に記載されている検出装置及び方法を含む何れの適当な装置及び／又は方法でも検出できる。光の特定の放出の検出は、組み込まれた特定のd N T Pへの属性を識別できる。その後、検出された発光タグの集合から得られた配列を使用して、配列相補性を介して一本鎖標的核酸鋳型の配列を判断できる。

【0326】

本開示はd N T Pについて述べているが、本明細書で提供されるシステムと方法は、各種のヌクレオチド、例えばリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド（例えば、少なくとも4、5、6、7、8、9、又は10のリン酸基を有するデオキシリボヌクレオシドポリリン酸）に使用されてもよい。このようなリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドは、各種のタグ（又はマーカ）とリンカーを含むことができる。

30

【0327】

ヌクレオシドが組み込まれると放出される信号は、メモリに保存し、後の時点で処理して、標的核酸鋳型の配列を判定できる。これには、その信号を参照信号と比較して、組み込まれたヌクレオシドの時間に関する識別を判定する工程を含んでもよい。その代わりに、又はそれに加えて、ヌクレオシドの組込み時に放出される信号を実時間で（すなわち、ヌクレオシドの組込み時に）収集、処理し、標的核酸鋳型の配列を判定することもできる。

40

【0328】

複数の一本鎖標的核酸鋳型の核酸配列解析は、本明細書の他の箇所に記載されている装置の場合のように、複数の検体ウェルが利用できれば完全となり得る。各検体ウェルには、一本鎖標的核酸鋳型を提供でき、配列解析反応を各検体ウェル内で完了できる。検体ウェルの各々は、プライマ伸長反応中に核酸合成に必要な適当な試薬（例えば、d N T P、配列解析プライマ、ポリメラーゼ、余因子、適当な緩衝液その他）と接触させてもよく、配列解析反応を各検体ウェル内で進めることができる。いくつかの実施形態において、複数の検体ウェルが全ての適当なd N T Pと同時に接触させられる。他の実施形態において、複数の検体ウェルを各々の適当なd N T Pと別々に接触させ、異なるd N T Pとの接触

50

間で各々洗浄される。d N T Pの組込みは、各検体ウェル内で検出でき、前述のように、各検体ウェル内の一本鎖標的核酸に関する配列が判定される。

【0329】

単一分子RNA配列解析に関する実施形態は、RNA鋳型から相補的DNA (cDNA) を合成できる何れの逆転写酵素を使用してもよい。このような実施形態において、逆転写酵素は、d N T PをRNA鋳型にアニールされた逆転写プライマに組み込むことを介してRNA鋳型からcDNAを合成できるという点で、ポリメラーゼと同様の方法で機能できる。したがって、cDNAは配列解析反応に関与でき、その配列が上述のように判定される。その後、判定されたcDNAの配列を、配列相補性を介して使用し、当初のRNA鋳型の配列を判定することができる。逆転写酵素の例には、マウス白血病ウイルス (M o l l e n r y M u r i n e L e u k e m i a V i r u s) 逆転写酵素 (M-MLV)、トリ骨髄芽球症ウイルス (AMV: a v i a n m y e l o b l a s t o s i s v i r u s) 逆転写酵素、ヒト免疫不全ウイルス逆転写酵素 (H I V-1)、及びテロメラーゼ逆転写酵素が含まれる。

10

【0330】

配列リードは、被験者のゲノムのより長い領域を再構成するために (例えば、アラインメントによる) 使用できる。リードは、染色体領域、染色体全体、又はゲノム全体を再構成するために使用できる。配列リード又はこのようなリードから生成されるより大きい配列は、被験者のゲノムを解析するため、例えば多様体又は遺伝子多型を特定するために使用できる。多様体の例としては、タンデムSNPを含む単一ヌクレオチド多型 (SNP)、Indel、すなわち欠失挿入多型 (DIP: d e l i t i o n i n s e r t i o n p o l m o r p h i s m) と呼ばれる小規模複数塩基欠失又は挿入、多塩基多型 (MNP: M u l t i - N u c l e o t i d e P o l y m o r p h i s m)、短反復配列 (STR: S h o r t T a n d e m R e p e a t)、マイクロインサクションを含む挿入、複製、逆転、転座、重複、複雑なマルチサイト多様体、コピー型多型 (CNV: c o p y n u m b e r v a r i a t i o n) が含まれるが、これらに限定されない。ゲノム配列は、多様体の組合せを含むことができる。例えば、ゲノム配列は、1つ又は複数のSNPと1つ又は複数のCNVとの組合せを包含できる。

20

【0331】

いくつかの実施形態において、分子は発光寿命に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において分子は、発光強度に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は、放出された光子の観察に必要な供給励起エネルギーの波長に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は、放出された光子の波長に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は発光寿命及び放出された光子を観察するのに必要な供給励起エネルギーの波長に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は、発光寿命、発光強度、及び放出された光子を観察するのに必要な供給励起エネルギーの波長に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は、発光寿命と放出された光子の波長との両方に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は、発光強度と放出された光子の波長との両方に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は、発光強度及び放出された光子の波長の両方に基づいて識別又は区別される。いくつかの実施形態において、分子は、発光寿命、発光強度、及び放出された光子の波長に基づいて識別又は区別される。

30

40

【0332】

特定の実施形態において、反応混合又は実験中の異なる種類の分子は、異なる発光マーカで標識される。いくつかの実施形態において、異なるマーカは区別可能な異なる発光特性を有する。いくつかの実施形態において、異なるマーカは、異なる発光寿命、異なる発光強度、放出光子の異なる波長、又はその組合せを有することにより区別される。異なる発光マーカを有する複数の種類の分子の存在によって、複雑な反応の異なる工程をモニタすることができ、又は複雑な反応生成物の異なる成分を識別できる。いくつかの実施形態

50

において、異なる種類の分子が反応又は相互作用する順序を決定できる。

【0333】

特定の実施形態において、異なる発光マーカを有する複数の種類の分子の発光特性を使用して、核酸又はタンパク質等の生体分子の配列を識別する。いくつかの実施形態において、異なる発光マーカを有する複数の分子の発光特性を使用して、生体分子の合成中に組み込まれる単一分子を識別する。いくつかの実施形態において、異なる発光マーカを有する複数の種類のヌクレオチドの放出エネルギーを使用して、シーケンシング反応中に組み込まれる単一ヌクレオチドを識別する。いくつかの実施形態において、本願中に記載の方法、組成物、及び装置を使用して、ポリメラーゼ酵素により合成される鋳型依存の核酸シーケンシング反応生成物に組み込まれる一連のヌクレオチドを識別できる。

10

【0334】

特定の実施形態において、鋳型依存核酸シーケンシング生成は、自然起源の核酸ポリメラーゼによって実行される。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは自然起源のポリメラーゼの変異体又は修飾された多様体である。いくつかの実施形態において、鋳型依存核酸シーケンス生成は、鋳型核酸分子鎖と相補的な1つ又は複数のヌクレオチドセグメントを含む。1つの態様において、本願は、鋳型（又は標的）の配列を判定する方法を提供する。

【0335】

他の態様において、本願は、複数の核酸フラグメントの配列解析を行うことによって標的核酸の配列を解析する方法を提供し、標的核酸はそのフラグメントを含む。特定実施形態において、方法は、複数のフラグメント配列を組み合わせて、親の標的核酸のための配列又は部分的配列を提供する工程を含む。いくつかの実施形態において、組み合わせる工程は、コンピュータハードウェアとソフトウェアにより実行される。本明細書に記載される方法により、配列識別すべき染色体又はゲノム全体等、関係する標的核酸集合が得られる。

20

【0336】

「ゲノム」という用語は一般に、有機体の遺伝情報全体を指す。ゲノムは、DNA又はRNAの何れかで符号化できる。ゲノムは、タンパク質を符号化する符号化領域と非符号化領域を含むことができる。ゲノムには、有機体中の全ての染色体の配列を一緒に含めることができる。例えば、ヒトゲノムは、合計46の染色体を有する。これら全ての配列が一緒にヒトゲノムを構成する。いくつかの実施形態において、ゲノム全体の配列が判定される。しかしながら、いくつかの実施形態において、ゲノムのサブセット（例えば、1つ又は少数の染色体、又はその領域）に関する、又は1つ又は少数の遺伝子（又はそのフラグメント）に関する配列情報があれば、診断、予後、及び／又は治療の用途にとって十分である。

30

【0337】

場合により、配列解析プライマは、検体ウェル（例えば、ナノアパーチャ）等の固体サポートに固定されていても、されていなくてもよい標的核酸分子にアニールできる。いくつかの実施形態において、配列解析プライマは、固体サポートに固定されてもよく、標的核酸分子のハイブリダイゼーションも標的核酸分子を固体サポートに固定する。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは固体サポートに固定され、可溶性プライマ及び標的核酸がポリメラーゼと接触する。しかしながら、いくつかの実施形態において、ポリメラーゼ、標的核酸、及びプライマを含む複合体が溶液中で形成され、この複合体が固体サポートに（例えば、ポリメラーゼ、プライマ及び／又は標的核酸の固定を介して）固定される。

40

【0338】

適当な条件下で、アニールされたプライマ／標的核酸に接触するポリメラーゼ酵素は、1つ又は複数のヌクレオチドをプライマに追加し、又は組み込むことができ、ヌクレオチドは5' - 3' の鋳型結合方式でプライマに追加できる。このようにヌクレオチドをプライマに（例えば、ポリメラーゼの作用を介して）組み込むことを一般に、プライマ伸長反

50

応と呼ぶことができる。各ヌクレオチドは検出可能なタグに関連付けることができ、これを検出して、（例えば発光寿命、放出スペクトル、吸収スペクトル、及び／又はその他の特徴に基づいて）識別し、プライマ中に組み込まれた各ヌクレオチドと、したがって、新規に合成された核酸分子の配列を判定するために使用できる。新規に合成された核酸分子の配列相補性を介して、標的核酸分子の配列も判定できる。いくつかの実施形態において、合成方法による配列解析は、標的核酸分子の集合（例えば、標的核酸のコピー）の存在及び／又は標的核酸を増幅して標的核酸の集合を実現する工程を含むことができる。しかしながら、いくつかの実施形態において、合成による配列解析は、評価中の各反応における単一分子の配列を判定するために使用され（、配列解析のための標的鋳型を準備するための核酸増幅が不要となる）。いくつかの実施形態において、本願の態様により、複数の単一分子シーケンシング反応が平行して（例えば、1台の集積装置又はチップ上で）実行される。

10

【0339】

実施形態は、高精度でロングリード長の、例えば少なくとも約50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%、99.99%、99.999%、又は99.9999%の精度及び／又は約10塩基対（bp）、50bp、100bp、200bp、300bp、400bp、500bp、1000bp、10,000bp、20,000bp、30,000bp、40,000bp、50,000bp、又は100,000bpより大きいか、又はそれと等しいリード長さでの単一核酸分子配列解析が可能である。

20

【0340】

標的核酸分子又はポリメラーゼを検体ウェル、例えば検体ウェルの底部に直接又はリンカーを通じて取り付けることができる。検体ウェル（例えば、ナノアパーチャ）はまた、プライマ伸長反応を介した核酸合成に必要な他の何れの試薬、例えば、適当な緩衝液、余因子、酵素（例えば、ポリメラーゼ）、及び蛍光体等の発光タグを含む、デオキシアデノシン三リン酸（dATP）、デオキシシチジン三リン酸（dCTP）、デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）、デオキシユリジン三リン酸（dUTP）及びデオキシチミジン三リン酸（dTTP）dNTPをはじめとするデオキシリボヌクレオシド三リン酸等のデオキシヌクレオシドリノ酸も含むことができる。いくつかの実施形態において、dNTPの各クラス（例えば、アデニン含有dNTP（例えば、dATP）、シトシン含有dNTP（例えば、dCTP）、グアニン含有dNTP（例えば、dGTP）、ウラシル含有dNTP（例えば、dUTP）、及びチミン含有dNTP（例えば、dTTP））が異なる発光タグの共役とされ、タグから放出される光の検出は新規に合成された核酸に組み込まれたdNTPの識別を示す。発光タグからの放出光は、例えば本明細書の他の箇所に記載されている検出装置と方法を含む何れの適当な装置及び／又は方法を介して検出し、その適当な発光タグ（及びしたがって、関連するdNTP）への属性を特定することができる。発光タグは、何れの適当なdNTPの共役とされてもよく、それによって発光タグの存在は新規に合成された核酸分子鎖へのdNTPの組み込み又はポリメラーゼの活動を阻止しない。いくつかの実施形態において、発光タグはdNTPの末端リン酸（ガンマリノ酸）の共役とされる。

30

40

【0341】

いくつかの実施形態において、配列解析プライマは、一本鎖標的核酸鋳型にアニールされ、ポリメラーゼは連続的にdNTP（又はその他のデオキシリボヌクレオシドポリリン酸）を、一本鎖標的核酸鋳型を介してプライマに組み込む。組み込まれた各dNTPに関連付けられた固有の発光タグは、dNTPをプライマに組み込んでいる間又はその後に適当な励起光で励起され、その後、本明細書の他の箇所に記載されている検出装置及び方法を含む何れの適当な装置及び／又は方法でもその放出を検出できる。特定の光の放出（例えば、特定の放出寿命、強度、及び／又はその組合せを有する）の検出は、組み込まれた特定のdNTPへの属性を識別できる。したがって、検出された発光タグの集合から得られる配列を使用して、一本鎖標的核酸鋳型の配列を、配列相補性を介して判定できる。

50

【0342】

本開示はdNTPに関するものであるが、本明細書で提供される装置、システム、及び方法は、リボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチド（例えば、少なくとも4、5、6、7、8、9、又は10リン酸基を有するデオキシリボヌクレオチドポリリン酸）等の各種のヌクレオチドに使用されてもよい。このようなリボヌクレオチド及びデオキシリボヌクレオチドは各種のタグ（又はマーカ）とリンカーを含むことができる。

【0343】

一例として、図10-1は、単一分子核酸配列解析方法の工程を概略的に示す。この例は、決して本発明を限定しようとするものではない。610は、核酸ポリメラーゼ601と、配列解析対象の標的核酸602と、ポリマー604とを含む単一の複合体を収容する
10
ように構成された検体ウェル（例えば、ナノアパーチャ）である。この例において、検体ウェル610の底領域は、標的空間620として描かれている。図10-1において、ポリメラーゼ601を含む複合体は、標的空間620内に閉じ込められる。複合体は任意選択により、検体ウェルの表面への付着によって固定されてもよい。この例において、複合体は、リンカーをポリメラーゼ601に付着させるのに適した1つ又は複数の生体分子（例えばビオチン）を含むリンカー603によって固定される。

【0344】

検体ウェルの空間はまた、ポリメラーゼ複合体が核酸分子鎖を合成するのに必要な、適当な溶媒、緩衝液、及びその他の添加物との反応混合物を収容する。反応混合物はまた、
20
複数の種類の発光標識されたヌクレオチドを含む。各種のヌクレオチドは、記号* - A、@ - T、\$ - G、# - Cにより表され、A、T、G、及びCは、ヌクレオチド塩基を表し、記号*、@、\$、及び#は、リンカーを通じて、各ヌクレオチドに付着された固有の発光ラベルを表す。図10-1において、# - Cヌクレオチドが現在、相補的分子鎖602に組み込まれている。組み込まれたヌクレオチドは標的空間620内にある。

【0345】

図10-1はまた、矢印で、標的空間の付近に供給されている励起エネルギーと、検出器に向かって放出されている発光の概念を示している。矢印は概略的であり、励起エネルギーの供給又は発光の特定の方位を示そうとしていない。一部の発光は、検出器に向か
30
っていない（例えば、検体ウェルの側壁に向かう）ベクトル上で放出され得るか、又は検出されないことがあり得る。

【0346】

図10-2は、1つの検体ウェル内の時間の経過に伴う配列解析プロセスを概略的に示す。ステージA～Dは、図10-1に示されるようなポリメラーゼ複合体を収容した検体ウェルを示している。ステージAは、何れかのヌクレオチドがプライマに添加される前の初期状態を示す。ステージBは、発光標識されたヌクレオチド（# - C）の組込みイベントを示す。ステージCは、連続する組込みイベント間の期間を示す。この例において、ヌクレオチドCがプライマに追加されており、発光標識されたヌクレオチド（# - C）に以
40
前に付着されたラベルとリンカーは開裂されている。ステージDは、発光標識されたヌクレオチド（* - A）の第二の組込みイベントを示す。ステージD以後の相補的分子鎖はプライマと、Cヌクレオチドと、Aヌクレオチドからなる。

【0347】

ステージA及びCは、何れも組込みイベントの前又は連続するイベント間の期間を示しており、これはこの例においては、約10ミリ秒間続くように示されている。ステージA及びCでは、ヌクレオチドが組み込まれていないため、標的空間（図10-2では図示せず）内に発光標識されたヌクレオチドはないが、組み込まれていない発光標識されたヌクレオチドからの背景発光又はスプリアス発光が検出され得る。ステージB及びDは、異なるヌクレオチド（それぞれ、# - C及び* - A）の組込みイベントを示す。この例において、これらのイベントも約10ミリ秒間継続することが示されている。

【0348】

「未処理ビンデータ」と名付けられた行は、各ステージ中に生成されたデータを示す。

10

20

30

40

50

例示的実験を通じて、複数の光パルスは標的空間の付近に供給される。各パルスに関して、検出器は検出器により受け取られた全ての放出光子を記録し、検出された光子を、励起エネルギーの最終パルス以降の時間に基づいてタイムビンに割り当てるように構成される。この例では、3つのビンがあり、「未処理ビンデータ」は、1（最短のバー）、2（中間のバー）、又は3（最長のバー）の数値を記録し、これはそれぞれ最短、中間、及び最長ビンに対応する。各バーは放出光子の検出を示す。

【0349】

ステージA又はCについては標的空間内に発光標識されたヌクレオチドがないため、格子は検出されない。ステージB及びDの各々について、組込みステージ中に複数の発光が検出される。発光ラベル#は発光ラベル*より短い発光寿命を有する。ステージBのデータは、そのため、ビンの数値がより高いステージDより低いビン平均値を記録したように示されている。

10

【0350】

「処理データ」と名付けられた行は、未処理データを、各パルスに関する時間の放出光子の数（カウント）を示すように処理したものを示している。この例において、データは発光寿命を判定するためにのみ処理されているが、データはまた、他の発光特性、例えば発光強度又は吸収又は放出された光子の波長について評価されてもよい。例示的な処理データは、標的空間内の発光マーカの発光寿命についての指数関数的減衰曲線の特徴を概算している。発光ラベル#は発光ラベル*より短い発光寿命を有するため、ステージBに関する処理データは、より長い時間にわたり、より少ないカウントを有し、その一方で、ステージDに関する処理データは、より長時間にわたり、比較的より多いカウントを有する。

20

【0351】

図10-2の例示的実験では、相補的分子鎖に追加された最初の2つのヌクレオチドがCAとして示される。DNAに関して、プライマにアニールされた領域の直後の標的分子鎖の配列は、そのため、GTとして示される。この例において、ヌクレオチドC及びAは、発光寿命のみに基づいて、複数のC、G、T、及びAから区別できる。いくつかの実施形態において、蛍光強度又は吸収もしくは放出された光子の波長等が、1つ又は複数の特定のヌクレオチドを区別するために必要である。

B. 発光特性

30

本明細書に記載されているように、発光分子は1つ又は複数の光子を吸収する分子であり、その後、1つ又は複数の期間が経過すると1つ又は複数の光子を放出し得る。分子の発光は、いくつかのパラメータにより説明され、これには、発光寿命、吸収及び／又は放出スペクトル、発光量子収量、及び発光強度が含まれるが、これらに限定されない。

【0352】

発光放出イベントからの放出光子は、あり得る波長のスペクトル範囲内の波長で放出される。典型的には、放出光子は、励起光子の波長と比較して、より長い波長を有する（例えば、エネルギーがより低いか、赤方偏移されている）。特定の実施形態において、分子は放出光子の波長を測定することによって識別される。特定の実施形態において、分子は、複数の放出光子の波長を測定することによって識別される。特定の実施形態において、分子は放出スペクトルを測定することによって識別される。

40

【0353】

発光寿命は、励起イベント及び放出イベントに関連付けられる持続時間（例えば、放出減衰時間）を指す。いくつかの実施形態において、発光寿命は、指数関数的減衰方程式の定数として表現される。励起エネルギーを供給する1つ又は複数のパルスイベントがあるいくつかの実施形態において、持続時間はパルスとその後の放出イベントとの間の時間である。

【0354】

発光量子収量とは、放出イベントを導くある波長の、又はあるスペクトル範囲内の励起イベントの一部を指し、典型的には1未満である。いくつかの実施形態において、本明細

50

書に記載されている分子の発光量子収量は、0～約0.001、約0.001～約0.01、約0.01～約0.1、約0.1～約0.5、約0.5～0.9、又は約0.9～1である。いくつかの実施形態において、分子は、発光量子収量を判定又は推定することによって識別される。

【0355】

本明細書において単一分子について使用されるかぎり、発光強度とは、パルス式励起エネルギーの供給より励起される分子より放出される単位時間あたりの放出光子の数を指す。いくつかの実施形態において、発光強度はパルス式励起エネルギーの供給によって励起されている分子により放出され、特定のセンサ又はセンサの集合により検出される単位時間あたりの放出光子の検出数を指す。

10

【0356】

1つの態様において、本願は、単一発光分子の発光寿命を判定する方法を提供し、これは、標的空間内に発光分子を提供する工程と、励起エネルギーの複数のパルスを標的空間の付近に送達する工程と、発光分子からの複数の発光を検出する工程とを含む。いくつかの実施形態において、方法は、パルスと発光の各ペア間の複数の持続時間を記録する工程と、パルスと発光の各ペア間の複数の持続時間の分布を評価する工程とをさらに含む。

C. 発光標識されたヌクレオチド

1つの態様において、本明細書に記載されている方法と組成物は1つ又は複数の発光標識されたヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、1つ又は複数のヌクレオチドはデオキシリボヌクレオシドを含む。特定の実施形態において、1つ又は複数のヌクレオチドは、リボースヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、全てのヌクレオシドはリボースヌクレオシドを含む。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のヌクレオチドは修飾されたリボース糖又はリボース類似体（例えば、ロックド核酸）を含む。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のヌクレオチドは、自然起源の塩基（例えば、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、ウラシル）を含む。いくつかの実施形態において、1つ又は複数のヌクレオチドは、シトシン、グアニン、アデニン、チミン、又はウラシルの誘導体又は類似体を含む。

20

【0357】

特定の実施形態において、方法は、ポリメラーゼ複合体を複数の発光標識ヌクレオチドにさらす工程を含む。特定の実施形態において、組成物又は装置は、複数の発光標識されたヌクレオチドを含む反応混合物を含む。いくつかの実施形態において、複数のヌクレオチドは4つの異なるヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、4つの異なるヌクレオチドは各々、シトシン、グアニン、アデニン、及びチミンの1つを含む。いくつかの実施形態において、4つの異なるヌクレオシドは各々、シトシン、グアニン、アデニン、及びウラシルの1つを含む。

30

【0358】

「核酸」という用語は、本明細書で使用されるかぎり、一般に1つ又は複数の核酸サブユニットを含む分子を指す。核酸は、アデノシン（A）、シトシン（C）、グアニン（G）、チミン（T）、及びウラシル（U）、又はその多様体から選択された1つ又は複数のサブユニットを含んでもよい。いくつかの例において、核酸はデオキシリボ核酸（DNA）、又はリボ核酸（RNA）、又はその誘導体である。核酸は、一本鎖でも二本鎖でもよい。核酸は環状であってもよい。

40

【0359】

「ヌクレオチド」という用語は、本明細書で使用されるかぎり、一般に、核酸サブユニットを指し、これはA、C、G、T、又はU、あるいはその多様体又は類似体を含むことができる。ヌクレオチドは、成長する核酸分子鎖内に組み込むことのできるあらゆるサブユニットを含むことができる。このようなサブユニットは、A、C、G、T、もしくはU、又は1つ又は複数の相補的A、C、G、T、もしくはUに特定の、又はプリン（すなわち、AもしくはG、又はその多様体もしくは類似体）又はピリミジン（すなわち、C、T、もしくはU、又はその多様体又は類似体）に対して相補的な他のあらゆるサブユニットと

50

することができる。サブユニットにより、個々の核酸塩基又は塩基群（例えば、A A、T A、A T、G C、C G、C T、T C、G T、T G、A C、C A、又はそのウラシル版）を分解することができる。

【0360】

ヌクレオチドは一般に、ヌクレオシドと少なくとも1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、又はそれを超えるリン酸（PO₃）基を含む。ヌクレオチドは、ヌクレオ塩基と、五炭糖（リボース又はデオキシリボースの何れか）、及び1つ又は複数のリン酸基を含むことができる。リボヌクレオチドは、糖がリボースであるヌクレオチドである。デオキシリボヌクレオチドは、糖がデオキシリボースであるヌクレオチドである。ヌクレオチドは、ヌクレオシドーリン酸又はヌクレオシドポリリン酸とすることができる。ヌクレオチドは、デオキリボヌクレオシドポリリン酸、例えば、デオキシリボヌクレオシド三リン酸とすることができ、これは検出可能なタグ、例えば発光タグ又はマーカ（例えば、蛍光体）を含むデオキシアデノシン三リン酸（dATP）、デオキシシチジン三リン酸（dCTP）、デオキシグアノシン三リン酸（dGTP）、デオキシウリジン三リン酸（dUTP）、及びデオキシチミジン三リン酸（dTTP）dNTPから選択できる。

【0361】

ヌクレオシドポリリン酸は、「n」個のリン酸基を有することができ、「n」は2、3、4、5、6、7、8、9、又は10より大きいか、これと等しい数である。ヌクレオシドポリリン酸の例には、ヌクレオシド二リン酸及びヌクレオシド三リン酸が含まれる。ヌクレオチドは、末端リン酸標識ヌクレオシド、例えば末端リン酸標識ヌクレオシドポリリン酸とすることができる。このようなラベルは発光（例えば、蛍光又は化学発光）ラベル、蛍光発生ラベル、着色ラベル、色素生成ラベル、質量タグ、静電ラベル、又は電気化学ラベルとすることができる。ラベル（又はマーカ）は、リンカーを通じて末端リン酸に結合できる。リンカーは、例えば、少なくとも1つの又は複数のヒドロキシル基、スルフィドリル基、アミノ基、又はハロアルキル基を含むことができ、これらは、天然又は修飾ヌクレオチドの末端リン酸において、例えばリン酸エステル、チオエステル、アミド垂リン酸エステル、又はアルキルリン酸を形成するに適していてもよい。リンカーは、例えば重合酵素の支援により、末端リン酸からラベルを分離するように開裂可能である。ヌクレオシドとリンカーの例は、米国特許第7,041,812号明細書において提供されており、その全体が参照によって本願に援用される。

D. ラベル

特定実施形態において、組み込まれる分子は発光分子であり、例えば、明確な発光マーカが取り付けられていない。典型的なヌクレオチドとアミノ酸は発光せず、又は適当な励起及び放出エネルギー範囲内で発光しない。特定の実施形態において、組み込まれる分子は発光マーカを含む。特定の実施形態において、組み込まれる分子は発光標識されたヌクレオチドである。特定の実施形態において、組み込まれる分子は発光標識されたアミノ酸又は発光標識されたtRNAである。いくつかの実施形態において、発光標識されたヌクレオチドは、ヌクレオチドと発光マーカを含む。いくつかの実施形態において、発光標識されたヌクレオチドは、ヌクレオチド、発光マーカ、及びリンカーを含む。いくつかの実施形態において、発光マーカは蛍光体である。

【0362】

ヌクレオチド配列解析に関して、発光標識されたヌクレオチドの特定の組合せが好ましいことができる。いくつかの実施形態において、発光標識されたヌクレオチドの少なくとも1つは、シアニン色素又はその類似体を含む。いくつかの実施形態において、少なくとも1つの発光標識されたヌクレオチドは、ローダミン色素、又はその類似体を含む。いくつかの実施形態において、発光標識されたヌクレオチドの少なくとも1つは、シアニン色素、又はその類似体を含み、少なくとも1つの発光標識されたヌクレオチドはローダミン色素又はその類似体を含む。

【0363】

特定の実施形態において、発光マーカは、表FL-1から選択される色素である。表F

L-1 に記載の色素は非限定的であり、本願の発光マーカは、表 F L-1 に記載されていない色素を含んでいてもよい。特定の実施形態において、1 つ又は複数の発光標識されたヌクレオチドの発光マーカは、表 F L-1 から選択される。特定の実施形態において、4 つ以上の発光標識されたヌクレオチドの発光マーカは、表 F L-1 から選択される。

【0 3 6 4】

【表 1】

表 FL-1. 蛍光体の例.

蛍光体			
5/6-カルボキシローダミン (Carboxirhodamine) 6G	CF532	DyLight (商標) 747-B3	ダイオミクス (Dyomics (商標))-781
5-カルボキシローダミン 6G	CF543	DyLight (商標) 747-B4	Dyomics-782
6-カルボキシローダミン 6G	CF546	DyLight (商標) 755	Dyomics-800
6-TAMRA	CF555	DyLight (商標) 766Q	Dyomics-831
Abberior 社 STAR (商標) 440SXP	CF568	DyLight (商標) 775-B2	eFluor 450
Abberior 社 STAR 470SXP	CF594	DyLight (商標) 775-B3	エオシン(Eosin)
Abberior 社 STAR 488	CF620R	DyLight (商標) 775-B4	FITC
Abberior 社 STAR 512	CF633	DyLight (商標) 780-B1	フルオロセイン (Fluorescein)
Abberior 社 STAR 520SXP	CF633-V1	DyLight (商標) 780-B2	ハイライト (HiLyte、商標)フル ルー(Fluor、商標) 405
Abberior 社 STAR 580	CF640R	DyLight (商標) 780-B3	HiLyte Fluor 488
Abberior 社 STAR 600	CF640R-V1	DyLight (商標) 800	HiLyte Fluor 532
Abberior 社 STAR 635	CF640R-V2	DyLight (商標) 830-B2	HiLyte Fluor 555
Abberior 社 STAR 635P	CF660C	ダイオミクス (Dyomics)-350	HiLyte Fluor 594
Abberior 社 STAR RED	CF660R	Dyomics-350XL	HiLyte Fluor 647
アレクサフルー(Alexa Fluor、商標) 350	CF680	Dyomics-360XL	HiLyte Fluor 680
アレクサフルー(Alexa Fluor) 405	CF680R	Dyomics-370XL	HiLyte Fluor 750
Alexa Fluor 430	CF680R-V1	Dyomics-375XL	IRDye 680LT
Alexa Fluor 480	CF750	Dyomics-380XL	IRDye 750
Alexa Fluor 488	CF770	Dyomics-390XL	IRDye 800CW
Alexa Fluor 514	CF790	Dyomics-405	ジョー(JOE)
Alexa Fluor 532	クロメオ (Chromo) 642	Dyomics-415	ライトサイクラー (LightCycler、商標) 640R
Alexa Fluor 546	クロミス (CHROMIS、商 標) 425N	Dyomics-430	ライトサイクラーレ ッド Red 610

蛍光体			
Alexa Fluor 555	CHROMIS500N	Dyomics-431	ライトサイクラーレ ッド 640
Alexa Fluor 568	CHROMIS515N	Dyomics-478	ライトサイクラーレ ッド 670
Alexa Fluor 594	CHROMIS530N	Dyomics-480XL	ライトサイクラーレ ッド 705
Alexa Fluor 610-X	CHROMIS550A	Dyomics-481XL	リサミンローダミン (Lissamine Rhodamine) B
Alexa Fluor 633	CHROMIS550C	Dyomics-485XL	ナプトフロオロセイン (Naphthofluorescein)
Alexa Fluor 647	CHROMIS550Z	Dyomics-490	オレゴングリーン (Oregon Green) 488
Alexa Fluor 660	CHROMIS560N	Dyomics-495	オレゴングリーン (Oregon Green) 514
Alexa Fluor 680	CHROMIS570N	Dyomics-505	パシフィックブルー (Pacific Blue)
Alexa Fluor 700	CHROMIS577N	Dyomics-510XL	パシフィックグリーン (Pacific Green)
Alexa Fluor 750	CHROMIS600N	Dyomics-511XL	パシフィックオレンジ (Pacific Orange)
Alexa Fluor 790	CHROMIS630N	Dyomics-520XL	PET
AMCA	CHROMIS645A	Dyomics-521XL	PF350
アット(ATTO) 390	CHROMIS645C	Dyomics-530	PF405
アット(ATTO) 425	CHROMIS645Z	Dyomics-547	PF415
アット(ATTO) 465	CHROMIS678A	Dyomics-547P1	PF488
アット(ATTO) 488	CHROMIS678C	Dyomics-548	PF505
アット(ATTO) 495	CHROMIS678Z	Dyomics-549	PF532
アット(ATTO) 514	CHROMIS770A	Dyomics-549P1	PF546
アット(ATTO) 520	CHROMIS770C	Dyomics-550	PF555P
アット(ATTO) 532	CHROMIS800A	Dyomics-554	PF568
アット(ATTO) 542	CHROMIS800C	Dyomics-555	PF594
アット(ATTO) 550	CHROMIS830A	Dyomics-556	PF610
アット(ATTO) 565	CHROMIS830C	Dyomics-560	PF633P
アット(ATTO) 590	Cy3	Dyomics-590	PF647P
アット(ATTO) 610	Cy3.5	Dyomics-591	クエーサ (Quasar) 570
アット(ATTO) 620	Cy3B	Dyomics-594	クエーサ 670
アット(ATTO) 633	Cy5	Dyomics-601XL	クエーサ 705
アット(ATTO) 647	DyLight (商標) 350	Dyomics-605	ローダミン (Rhoadmine) 123
アット(ATTO) 647N	DyLight (商標) 405	Dyomics-610	ローダミン 6G

蛍光体			
アット(ATTO) 655	DyLight (商標) 415-Co1	Dyomics-615	ローダミン B
アット(ATTO) 665	DyLight (商標) 425Q	Dyomics-630	ローダミングリーン (Rhodamine Green)
アット(ATTO) 680	DyLight (商標) 485-LS	Dyomics-631	ローダミングリーン (Rhodamine Green)-X
アット(ATTO) 700	DyLight (商標) 488	Dyomics-632	ローダミンレッド (Rhodamine Red)
アット(ATTO) 725	DyLight (商標) 504Q	Dyomics-633	ROX
アット(ATTO) 740	DyLight (商標) 510-LS	Dyomics-634	セタ(Seta) 375
アットオクサ 12 (ATTO Oxa12)	DyLight (商標) 515-LS	Dyomics-635	セタ(Seta) 470
アットロー101 (ATTO Rho101)	DyLight (商標) 521-LS	Dyomics-636	セタ(Seta) 555
アットロー11 (ATTO Rho11)	DyLight (商標) 530-R2	Dyomics-647	セタ(Seta) 632
アットロー12 (ATTO Rho12)	DyLight (商標) 543Q	Dyomics-647P1	セタ(Seta) 633
アットロー13 (ATTO Rho13)	DyLight (商標) 550	Dyomics-648	セタ(Seta) 650
アットロー14 (ATTO Rho14)	DyLight (商標) 554-R0	Dyomics-648P1	セタ(Seta) 660
アットロー3B (ATTO Rho3B)	DyLight (商標) 554-R1	Dyomics-649	セタ(Seta) 670
アットロー6G (ATTO Rho6G)	DyLight (商標) 590-R2	Dyomics-649P1	セタ(Seta) 680
アットチオ 12 (ATTO Thio12)	DyLight (商標) 594	Dyomics-650	セタ(Seta) 700
BD ホライズン (Horizon) V450	DyLight (商標) 610-B1	Dyomics-651	セタ(Seta) 750
ボディパイ(BODIPY) 493/501	DyLight (商標) 615-B2	Dyomics-652	セタ(Seta) 780
ボディパイ(BODIPY) 530/550	DyLight (商標) 633	Dyomics-654	セタ(Seta) APC-780
ボディパイ(BODIPY) 558/568	DyLight (商標) 633-B1	Dyomics-675	セタ(Seta) PerCP-680
ボディパイ(BODIPY) 564/570	DyLight (商標) 633-B2	Dyomics-676	セタ(Seta) R-PE-670
ボディパイ(BODIPY) 576/589	DyLight (商標) 650	Dyomics-677	セタ(Seta)646
ボディパイ(BODIPY) 581/591	DyLight (商標) 655-B1	Dyomics-678	セタウ(SeTau) 380
ボディパイ(BODIPY) 630/650	DyLight (商標) 655-B2	Dyomics-679P1	セタウ(SeTau) 405

10

20

30

40

蛍光体			
ボディパイ (BODIPY) 650/665	DyLight (商標) 655-B3	Dyomics-680	セタウ(SeTau) 425
ボディパイ (BODIPY) FL	DyLight (商標) 655-B4	Dyomics-681	セタウ(SeTau) 647
ボディパイ (BODIPY) FL-X	DyLight (商標) 662Q	Dyomics-682	スクエア (Square) 635
ボディパイ (BODIPY) R6G	DyLight (商標) 675-B1	Dyomics-700	スクエア (Square) 650
ボディパイ (BODIPY) TMR	DyLight (商標) 675-B2	Dyomics-701	スクエア (Square) 660
ボディパイ (BODIPY) TR	DyLight (商標) 675-B3	Dyomics-703	スクエア (Square) 672
C5.5	DyLight (商標) 675-B4	Dyomics-704	スクエア (Square) 680
C7	DyLight (商標) 679-C5	Dyomics-730	スルホローダミン (Sulforhodamine) 101
CAL フルーゴールド (Fluor Gold) 540	DyLight (商標) 680	Dyomics-731	TAMRA
CAL フルーグリーン (Fluor Green) 510	DyLight (商標) 683Q	Dyomics-732	TET
CAL フルーオレンジ (Fluor Orange) 560	DyLight (商標) 690-B1	Dyomics-734	テキサスレッド (Texas Red)
CAL フルーレッド (Fluor Red) 590	DyLight (商標) 690-B2	Dyomics-749	TMR
CAL フルーレッド (Fluor Red) 610	DyLight (商標) 696Q	Dyomics-749P1	TRITC
CAL フルーレッド (Fluor Red) 615	DyLight (商標) 700-B1	Dyomics-750	ヤキマイエロー (Yakima Yellow)
CAL フルーレッド (Fluor Red) 635	DyLight (商標) 730-B1	Dyomics-751	Zenon
カスケードブルー (Cascade Blue)	DyLight (商標) 730-B2	Dyomics-752	Zy3
CF350	DyLight (商標) 730-B3	Dyomics-754	Zy5
CF405M	DyLight (商標) 730-B4	Dyomics-776	Zy5.5
CF405S	DyLight (商標) 747	Dyomics-777	Zy7
CF488A	DyLight (商標) 747-B1	Dyomics-778	
CF514	DyLight (商標) 747-B2	Dyomics-780	

10

20

30

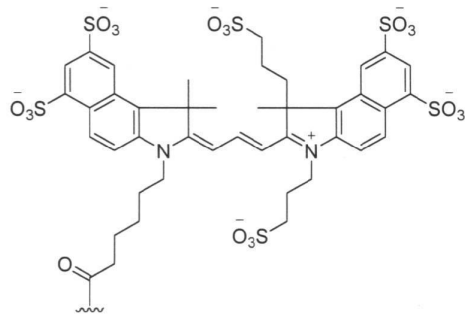
40

【 0 3 6 8 】

特定の実施形態において、発光マーカは化学式

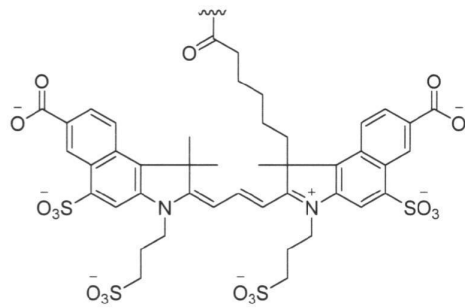
【 0 3 6 9 】

【化 1】



(色素 101),

10



(色素 102)

20

【0370】

の(色素101)又は(色素102)又はその類似体であってもよい。いくつかの実施形態において、各スルホン酸塩又はカルボン酸塩は個別に、任意選択によりプロトン化されてもよい。いくつかの実施形態において、上記の色素はリンカー又はヌクレオチドに、指示された結合点におけるアミド結合の形成により結合される。

【0371】

いくつかの実施形態において、少なくとも1種類、少なくとも2種類、少なくとも3種類、又は少なくとも4つの異なる発光標識されたヌクレオチドは、6-TAMRA、5/6-カルボキシローダミン6G、アレクサフルー(Alexa Fluor) 546、アレクサフルー(Alexa Fluor) 555、アレクサフルー(Alexa Fluor) 568、アレクサフルー(Alexa Fluor) 610、アレクサフルー(Alexa Fluor) 647、アベリアスター(Aberrior Star) 635、アット(ATTO) 647N、アットロー(ATTO Rho) 14、クロミス(Chromis) 630、クロミス(Chromis) 654A、クロメオ(Chromeo) 642、CF514、CF532、CF543、CF546、CF546、CF555、CF568、CF633、CF640R、CF660C、CF660R、CF680R、Cy3、Cy3B、Cy3.5、Cy5、Cy5.5、ディオミクス(Dyomics)-530、ディオミクス(Dyomics)-547P1、ディオミクス(Dyomics)-549P1、ディオミクス(Dyomics)-550、ディオミクス(Dyomics)-554、ディオミクス(Dyomics)-555、ディオミクス(Dyomics)-556、ディオミクス(Dyomics)-560、ディオミクス(Dyomics)-650、ディオミクス(Dyomics)-680、ディライト(DyLight) 554-R1、ディライト(DyLight) 530-R2、ディライト(DyLight) 594、ディライト(DyLight) 635-B2、ディライト(DyLight) 650、ディライト(DyLight) 655-B4、ディライト(DyLight) 675-B2、ディライト(DyLight) 675-B4、ディライト(DyLight) 680、ハイライトフルー(HiLyte Fluor) 532、ハイライトフルー(HiLyte Fluor) 555、ハイライトフルー(HiLyte Fluor) 594、ハイライトサイクラー(LightCycler) 640R、セタ(Seta) 555、セタ(Seta) 670、セタ(Seta) 700、セタウ(Seta

30

40

50

u) 647、及びセタウ (SeTau) 665、又は本明細書に記載されている化学式 (色素101) 又は (色素102) によるものからなる群から選択される発光マーカを含む。

【0372】

いくつかの実施形態において、少なくとも1種類、少なくとも2種類、少なくとも3種類、又は少なくとも4つの異なる発光標識されたヌクレオチドは、アレクサフルー (Alexa Fluor) 532、アレクサフルー (Alexa Fluor) 546、アレクサフルー (Alexa Fluor) 555、アレクサフルー (Alexa Fluor) 594、アレクサフルー (Alexa Fluor) 610、CF532、CF543、CF555、CF594、Cy3、ディライト (DyLight) 530-R2、ディライト (DyLight) 554-R1、ディライト (DyLight) 590-R2、ディライト (DyLight) 594、及びディライト (DyLight) 610-B1、又は化学式 (色素101) 又は (色素102) によるものからなる群から選択される発光マーカを含む。

10

【0373】

いくつかの実施形態において、第一及び第二の種類の発光標識されたヌクレオチドは、アレクサフルー (Alexa Fluor) 532、アレクサフルー (Alexa Fluor) 546、アレクサフルー (Alexa Fluor) 555、CF532、CF543、CF555、Cy3、ディライト (DyLight) 530-R2、及びディライト (DyLight) 554-R1からなる群から選択された発光マーカを含み、第三及び第四の種類の発光標識されたヌクレオチドは、アレクサフルー (Alexa Fluor) 594、アレクサフルー (Alexa Fluor) 610、CF594、ディライト (DyLight) 590-R2、ディライト (DyLight) 594、及びディライト (DyLight) 610-B1、又は化学式 (色素101) 又は (色素102) によるものからなる群から選択される発光マーカを含む。

20

E. リンカー

発光マーカは分子に、例えば結合によって直接付着されても、又はリンカーを介して付着されてもよい。特定の実施形態において、リンカーは1つ又は複数のリン酸を含む。いくつかの実施形態において、ヌクレオシドは発光マーカに、1つ又は複数のリン酸を含むリンカーによって接続される。いくつかの実施形態において、ヌクレオシドは発光マーカに、3つ以上のリン酸を含むリンカーによって接続される。いくつかの実施形態において、ヌクレオシドは、4つ以上のリン酸を含むリンカーにより接続される。

30

【0374】

特定の実施形態において、リンカーは脂肪族鎖を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは $-(CH_2)_n-$ を含み、 n は1~20 (両端値を含む) の整数である。いくつかの実施形態において、 n は1~10 (両端値を含む) の整数である。特定の実施形態において、リンカーはヘテロ脂肪族鎖を含む。いくつかの実施形態において、リンカーはポリエチレングリコール部分を含む。いくつかの実施形態において、リンカーはポリプロピレングリコール部分を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含み、 n は1~20 (両端値を含む) の整数である。いくつかの実施形態において、リンカーは $-(CH_2CH_2O)_n-$ を含み、 n は1~10 (両端値を含む) の整数である。特定の実施形態において、リンカーは $-(CH_2CH_2O)_4$ を含む。いくつかの実施形態において、リンカーは1つ以上のアリーレンを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは1つ又は複数のフェニレン (例えば、パラ置換フェニレン) を含む。特定の実施形態において、リンカーはキラル中心を含む。いくつかの実施形態において、リンカーはプロリン又はその誘導体を含む。いくつかの実施形態において、リンカーはプロリンヘキサマ又はその誘導体を含む。いくつかの実施形態において、リンカーはクマリン又はその誘導体を含む。いくつかの実施形態において、リンカーはアンテラセン又はその誘導体を含む。いくつかの実施形態において、リンカーはクロマノン又はその誘導体を含む。

40

50

含む。いくつかの実施形態において、リンカーは4アミノプアルギル-L-フェニルアラニン又はその誘導体を含む。特定の実施形態において、リンカーはポリペプチドを含む。

【0375】

いくつかの実施形態において、リンカーはオリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、リンカーは2本鎖オリゴヌクレオチドを含む。いくつかの実施形態において、オリゴヌクレオチドはデオキシリボースヌクレオチド、リボースヌクレオチド、又はロックドリボースヌクレオチドを含む。特定の実施形態において、リンカーはフォスタビライザを含む。

F. 検体ウェル表面処理

特定の実施形態において、1つ又は発光標識された分子を検出する方法は、標的空間内に分子が閉じ込められた状態で実行される。いくつかの実施形態において、標的空間は検体ウェル（例えば、ナノアパーチャ）内の領域である。特定の実施形態において、検体ウェルは、第一の材料を含む底面と複数の金属又は酸化金属層により形成された側壁を含む。いくつかの実施形態において、第一の材料は透明材料又はガラスである。いくつかの実施形態において、底面は平坦である。いくつかの実施形態において、底面は湾曲したウェルである。いくつかの実施形態において、底面は側壁のうち、複数の金属又は酸化金属層により形成された側壁の下の部分を含む。いくつかの実施形態において、第一の材料は溶融シリカ又は二酸化シリコンである。いくつかの実施形態において、複数の層の各々は金属（例えば、Al、Ti）又は酸化金属（例えば、 Al_2O_3 、 TiO_2 、 TiN ）を含む。

G. 保護膜

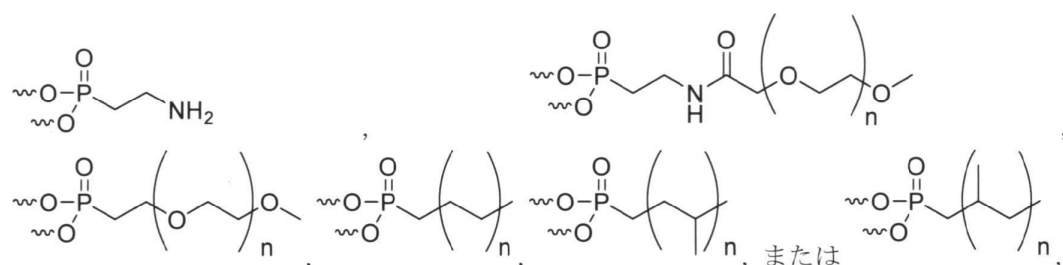
1つ又は複数の分子又は複合体が表面に固定される場合、機器の他の表面を保護して、望ましくない位置での固定化を防止することが望ましい。いくつかの実施形態において、分子又は複合体は検体ウェルの底面に固定され、検体ウェルの側壁が保護される。いくつかの実施形態において、側壁は、金属又は酸化金属バリア層を側壁表面上に堆積させる工程と、コーティングをバリア層に塗布する工程によって保護される。いくつかの実施形態において、酸化金属バリア層は酸化アルミニウムを含む。いくつかの実施形態において、堆積させる工程は、側壁面と底面上に金属又は酸化金属バリア層を堆積させる工程を含む。いくつかの実施形態において、堆積させる工程は、底面から金属又は酸化金属層をエッチングする工程をさらに含む。

【0376】

いくつかの実施形態において、バリア層コーティングはホスホン酸基を含む。いくつかの実施形態において、バリア層コーティングは、アルキル鎖を有するホスホン酸基を含む。いくつかの実施形態において、バリア層コーティングは高分子ホスホン酸を含む。いくつかの実施形態において、バリア層コーティングはポリビニルホスホン酸（PVPA）を含む。いくつかの実施形態において、バリア層コーティングは置換アルキル鎖を有するホスホン酸基を含む。いくつかの実施形態において、アルキル鎖は1つ又は複数のアミドを含む。いくつかの実施形態において、アルキル鎖は1つ又は複数のポリ（エチレングリコール）鎖を含む。いくつかの実施形態において、コーティングは化学式

【0377】

【化2】



10

20

30

40

50

【0378】

のホスホン酸基を含み、 n は10～100（両端値を含む）の整数であり、

【0379】

【化3】



【0380】

は水素又は表面との付着点である。いくつかの実施形態において、 n は3～20（両端値を含む）の整数である。いくつかの実施形態において、バリア層コーティングは異なる種類のホスホン酸基の混合物を含む。いくつかの実施形態において、バリア層コーティングは、PEG重量の異なるポリ（エチレングリコール）鎖を含むホスホン酸基の混合物を含む。

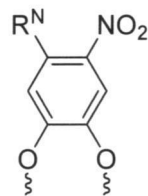
10

【0381】

特定の実施形態において、バリア層はニトロドーパ基を含む。特定の実施形態において、バリア層コーティングは化学式

【0382】

【化4】



20

【0383】

の基を含み、 R^N は任意の置換アルキル鎖であり、

【0384】

【化5】

30



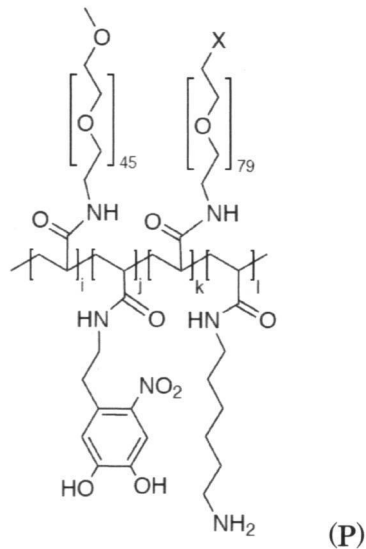
【0385】

は水素又は表面との付着点である。いくつかの実施形態において、 R^N はポリマーを含む。いくつかの実施形態において、 R^N はポリ（リジン）又はポリ（エチレングリコール）を含む。いくつかの実施形態において、バリア層は、リジンモノマーを含むポリ（リジン）のコポリマーを含み、リジンモノマーは独立してPEG、ニトロドーパ基、ホスホン酸基、又は一級アミンを含む。特定の実施形態において、バリア層は化学式（P）

40

【0386】

【化 6】



10

【0387】

のポリマーを含む。

いくつかの実施形態において、Xは—OMe、ビオチン基、ホスホン酸、又はシランである。いくつかの実施形態において、i、j、k、及びlの各々は独立して0～100（両端値を含む）の整数である。

20

H. ポリメラーゼ固定

いくつかの実施形態において、1つ又は複数の分子又は複合体が表面に固定される場合、この表面は機能化され、分子又は複合体の1つ又は複数を付着させることができる。いくつかの実施形態において、機能化表面は検体ウェルの底面である。特定の実施形態において、機能化表面は透明ガラスを含む。特定の実施形態において、機能化表面は溶融シリカ又は二酸化シリコンを含む。いくつかの実施形態において、機能化表面はシランで機能化される。いくつかの実施形態において、機能化表面はイオンのに帯電したポリマーで機能化される。いくつかの実施形態において、イオンのに帯電したポリマーはポリ（リジン）を含む。いくつかの実施形態において、機能化表面は、ポリ（リジン）ーグラフトーポリ（エチレングリコール）で機能化される。いくつかの実施形態において、機能化表面はビオチン化ウシ血清アルブミン（BSA）で機能化される。

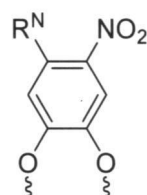
30

【0388】

特定の実施形態において、機能化表面はニトロドーパ基を含むコーティングで機能化される。特定の実施形態において、コーティングは化学式

【0389】

【化 7】



40

【0390】

の基を含み、R^Nは任意の置換アルキル鎖であり、

【0391】

【化 8】



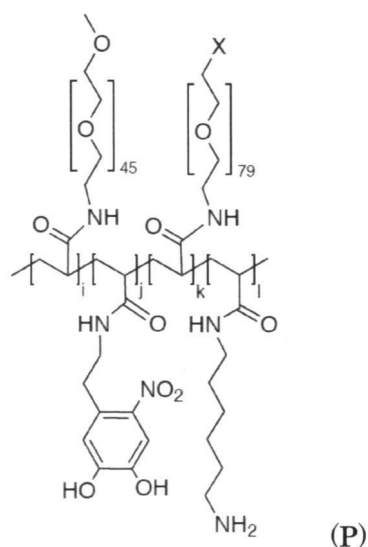
【0392】

は水素又は表面との付着点である。いくつかの実施形態において、 R^N はポリマーを含む。いくつかの実施形態において、 R^N はポリ（リジン）又はポリ（エチレングリコール）を含む。いくつかの実施形態において、 R^N はビオチン化ポリ（エチレングリコール）を含む。いくつかの実施形態において、コーティングは、リジンモノマーを含むポリ（リジン）のコポリマーを含み、リジンモノマーは独立したPEG、ビオチン化PEG、ニトロドーパ基、ホスホン酸基、又はシランを含む。特定の実施形態において、コーティングは化学式（P）

10

【0393】

【化 9】



20

30

【0394】

のポリマーを含む。

いくつかの実施形態において、Xは—OMe、ビオチン基、ホスホン酸、又はシランである。いくつかの実施形態において、i、j、k、及びlの各々は独立して0～100（両端値を含む）の整数である。

【0395】

いくつかの実施形態において、機能化表面は、アルキル鎖を含むシリコンで機能化される。いくつかの実施形態において、機能化表面は、任意の置換アルキル鎖を含むシリコンで機能化される。いくつかの実施形態において、表面は、ポリ（エチレングリコール）鎖を含むシランで機能化される。いくつかの実施形態において、機能化表面は、カップリング基を含むシランで機能化される。例えば、カップリング基は化学物質残基、例えばアミン基、カルボキシル基、ヒドロキシル基、スルフィドリル基、金属、キレート、及びその他を含んでいてもよい。あるいは、これらは特定の結合元素、例えばビオチン、アビジン、ストレプトアビジン、ニュートラビジン、レクチン、SNAPタグ（SNAP-tag）（商標）、又はそのための基質、会合性又は結合ペプチドもしくはたんぱく質、抗体もしくは抗体フラグメント、核酸もしくは核酸類似体、又はその他を含んでいてもよい。それに加えて、又はその代わりに、カップリング基は関心対象の分子とカップリング又は結合するために使用されるその他の基をカップリングするために使用されてもよく、これは、場合により、化学的官能基及び特定結合の要素の両方を含む。例えば、カップリング基、

40

50

例えばビオチンは、基質表面に堆積され、ある領域において選択的に活性化されてもよい。したがって、中間結合剤、例えばストレプトアビジンは第一のカップリング基にカップリングされてもよい。したがって、この特定の例においてはビオチン化される関心対象の分子はストレプトアビジンに連結される。

【0396】

いくつかの実施形態において、機能化表面は、ビオチンを含むシラン、又はその類似体で機能化される。いくつかの実施形態において、表面はポリ（エチレン）グリコール鎖を含むシリンド機能化され、ポリ（エチレングリコール）鎖はビオチンを含む。特定の実施形態において、機能化面はシリンの混合物で機能化され、少なくとも1種類のシランはビオチンを含み、少なくとも1種類のシランはビオチンを含まない。いくつかの実施形態において、混合物は、ビオチンを含まないシランより、約10倍少ない、約25倍少ない、約50倍少ない、約100倍少ない、約250倍少ない、約500倍少ない、又は約1000倍少ないビオチン化シランを含む。

【0397】

図10-3は、シーケンシング反応を開始するために、製造されたチップ（例えば、集積装置）から検体ウェル表面を処理する非限定的な例示のプロセスを示している。検体ウェルは底面（影付きのない長方形）と側壁（影付きの縦長の長方形）で表される。側壁は、複数の層（例えば、 Al 、 Al_2O_3 、 Ti 、 TiO_2 、 TiN ）からなってもよい。工程（a）で、側壁に Al_2O_3 のバリア層を堆積させる。次に、工程（b）で、 Al_2O_3 バリア層をPEGホスホン酸基でコーティングし、これは、例えば表面を1種又は複数のPEGリン酸で処理することによる。工程（c）で、底面を、例えばPEGシランとビオチン化PEGシランの混合物で機能化する。楕円形は個々のビオチン基を表し、これは単一分子又は複合体、例えばポリメラーゼ複合体の付着のための部位を提供してもよい。工程（d）で、ポリメラーゼ複合体を底面のビオチン基に付着させる。ポリメラーゼは、結合剤、例えばストレプトアビジンとビオチンタグによってポリメラーゼ複合体に付着されてもよい。ポリメラーゼ複合体は、鋳型核酸及びプライマ（図示せず）をさらに含んでいてもよい。工程（e）は、固定されたポリメラーゼ複合体を発光標識されたヌクレオチドにさらすことによるシーケンシング反応の開始を示している。

I. ポリメラーゼ

「ポリメラーゼ」という用語は、本明細書で使用されるかぎり、一般に重合反応の触媒として作用できる任意の酵素（又は重合化酵素）を指す。ポリメラーゼの例は、限定せずに、核酸ポリメラーゼ、転写酵素、又はリガーゼを含む。ポリメラーゼは、重合化酵素とすることができる。

【0398】

単一分子核酸伸長（例えば、核酸配列解析のため）に関する実施形態は、標的核酸分子と相補的な核酸を合成することのできる何れのポリメラーゼを使用してもよい。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼはDNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写、及び／又はその1つもしくは複数の変異体もしくは変質形であってもよい。

【0399】

単一分子核酸配列解析に関する実施形態は、標的核酸分子と相補的な核酸を合成することのできる何れのポリメラーゼを使用してもよい。ポリメラーゼの例には、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、熱安定ポリメラーゼ、野生型ポリメラーゼ、変質ポリメラーゼ、大腸菌（*E. coli*）DNAポリメラーゼI、T7 DNAポリメラーゼ、バクテリオファージT4 DNAポリメラーゼ ψ 29（プサイ29）DNAポリメラーゼ、Taqポリメラーゼ、Tthポリメラーゼ、Tliポリメラーゼ、Pfuポリメラーゼ、Pwoポリメラーゼ、VENTポリメラーゼ、DEEPVENTポリメラーゼ、EX-Taqポリメラーゼ、LA-Taqポリメラーゼ、Ssoポリメラーゼ、Pocポリメラーゼ、Pabポリメラーゼ、Mthポリメラーゼ、ES4ポリメラーゼ、Truポリメラーゼ、Tacポリメラーゼ、Tneポリメラーゼ、Tmaポリメラーゼ、Tcaポリメラーゼ、Tihポリメラーゼ、Tfiポリメラーゼ、プラチナTaqポリメラーゼ、Tbrポリ

メラーゼ、T f l ポリメラーゼ、T t h ポリメラーゼ、P f u t u b o ポリメラーゼ、P y r o b e s t ポリメラーゼ、P w o ポリメラーゼ、K O D ポリメラーゼ、B s t ポリメラーゼ、S a c ポリメラーゼ、クレノウ断片、3' - 5' エクソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼ、及びその変異体、変質生成物、及び誘導体が含まれるが、これらに限定されない。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは単一のサブユニットポリメラーゼである。DNA ポリメラーゼの非限定的な例とその特性は、コーンバーグ (K o r n b e r g) 及びベーカ (B a k e r) 著、「DNA 複製 (DNA R e p l i c a t i o n)」、第二版、W. H. フリーマン・アンド・カンパニー (W. H. F r e e m a n)、ニューヨーク、ニューヨーク (1991年) 及びその他に詳しく記載されている。

【0400】

10

標的核酸のヌクレオ塩基と相補的 d N T P との間で塩基対合が起こると、ポリメラーゼは d N T P を新たに合成される核酸鎖内に、新規に合成された鎖の 3' ヒドロキシル端と d N T P のアルファリン酸との間にホスホジエステル結合を形成することによって組み込む。d N T P と共役の発光タグが蛍光体である例において、その存在は励起により信号化され、組み込み工程中又はその後、放出パルスが検出される。d N T P の末端 (ガンマ) リン酸と共役の検出ラベルに関して、新規に合成された鎖に d N T P を組み込むことにより、ベータ及びガンマリリン酸と検出ラベルが放出され、これは検体ウェル内に自由に拡散し、その結果、蛍光体から検出される放出が減少する。

【0401】

20

いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは処理能力の高いポリメラーゼである。しかしながら、いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは処理能力の低下したポリメラーゼである。ポリメラーゼ処理能力は一般に、核酸鋳型を放出せずに、d N T P を核酸鋳型に連続的に組み込むポリメラーゼの能力を指す。

【0402】

いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは 5' - 3' エクソヌクレアーゼ活性の低下した、及び／又は 3' - 5' エクソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼである。いくつかの実施形態において、ポリメラーゼは (例えばアミノ酸置換により) 改質され、5' - 3' エクソヌクレアーゼ活性及び／又は 3' - 5' 活性がそれに対応する野生型ポリメラーゼと比較して低下されてもよい。DNA ポリメラーゼの別の非限定的例には、9 ° N m (商標) DNA ポリメラーゼ (N e w E n g l a n d B i o l a b s)、及び K l e n o w エクソポリメラーゼの P 6 8 0 G 変異体 (タスキーラ (T u s k e e t a l.) (2000年) J B C 2 7 5 (31): 2 3 7 5 9 - 2 3 7 6 8) が含まれる。いくつかの実施形態において、処理能力が低下したポリメラーゼにより、ヌクレオチドの繰返しの 1 つ又は複数の伸長 (例えば、同じ型の 2 つ以上の連続する塩基) を含む配列解析鋳型の精度が高まる。

30

【0403】

単一分子 RNA 伸長 (例えば、RNA 配列解析のため) に関する実施形態は、RNA 鋳型から相補的 DNA (c D N A) を合成可能な何れの逆転写酵素を使用してもよい。このような実施形態において、逆転写酵素は、RNA 鋳型にアニールされた逆転写プライマに d N T P を組み込むことを介して、RNA 鋳型から c D N A を合成できるという点で、ポリメラーゼと似た方法で機能できる。したがって、c D N A は、上述し、及び本明細書の他の箇所に記載したように決定されるシーケンシング反応とそのシーケンスに関与できる。その後、決定された c D N A の配列を、配列相補性を介して使用し、当初の RNA 鋳型の配列を判定できる。逆転写酵素の例には、マウス白血病ウイルス (M o l o n e y M u r i n e L e u k e m i a V i r u s) (M - M L V) 逆転写酵素、トリ骨髄芽球症ウイルス (A M V) 逆転写酵素、ヒト免疫不全ウイルス逆転写酵素 (H I V - 1) 及びテロメラーゼ逆転写酵素が含まれる。

40

【0404】

処理能力、エクソヌクレアーゼ活性、異なる種類の核酸に対する相対親和度、又は核酸ポリメラーゼのその他の特性は、当業者により、対応する野生型ポリメラーゼに関する変

50

異又はその他の修飾によって増減できる。

J. 寿命測定

寿命測定は、1つの励起エネルギー波長を使用して検体ウェル内のマーカを励起して実行される。異なる寿命を有するマーカの組合せは、寿命測定に基づいて個々のマーカを区別するために選択される。それに加えて、マーカの組合せは、使用される励起源によって照明されたときに励起状態に到達できる。区別可能な寿命を有する適当なマーカのどのような集合又は数を使用してもよい。例えば、3種類、4種類、又は6つの異なるマーカが使用されてもよい。発光マーカは、同じ励起波長で、又は2種類もしくは4つの異なる励起波長で励起されてもよい。

【0405】

パルス式励起源は、前述の技術を使ったパルス式励起源の1つであってもよい。いくつかの例において、パルス式励起源は、レーザダイオードの直接変調電気ポンピングを通じてパルスを放出するように構成された半導体レーザダイオードであってもよい。パルスのパワーはピーク後約250ピコ秒でパルスピークパワーの20dBより小さくなる。各励起パルスの時間間隔は2~200ピコ秒の範囲内である。各励起パルス間の持続時間は1~50ナノ秒の範囲である。例示的な測定がどのように行われたかの概略図が図10-4に示されており、これは定期的に生成される励起パルス10-401のタイミングを示す。図10-4の下の段は、励起パルス10-401が到達したときに何のラベルが存在するかを示す。時々、ラベルが存在しない。さらに、図10-4の中央の段は、存在するラベルに関する放出確率分布10-402を示す。中央の段にはまた、長方形10-403が示され、ラベルからの光子の検出を示している。図10-4に示されるように、光子が放出されない場合、又は放出された光子が損失又は検出器の非効率性によって検出されない場合がある。

【0406】

各ピクセルのためのセンサは、1ピクセルにつき少なくとも1つの感光領域を有する。いくつかの実施形態において、センサチップはピクセルごとにセンサ領域を含んでいてもよい。感光領域の寸法は、5マイクロメートル×5マイクロメートルであってもよい。光子はセンサ到達時の時間間隔内で検出される。タイムビンの数を増やすと、一連のタイムビンにわたって収集される光子の記録ヒストグラムの分解能が改善され、異なる発光マーカ間の差別化を改善できる。いくつかの実施形態において、集光要素は、関連する検体ウェル内のマーカが放出する光子の収集を改善するために、集光要素をセンサに組み込んでもよい。このような集光要素は、図10-5に示されるように、フレネルレンズ10-500を含んでいてもよい。センサが特定の波長を検出するように構成されているとき、4つの発光マーカは、その特定の波長と同様の光を放出してもよい。あるいは、4つの発光マーカが異なる波長の光を放出してもよい。

【0407】

いくつかの実施形態において、検体物は、複数の異なる種類のマーカの1つで標識してもよく、その各々が相互に排他的な検体物の集合に関連付けられる。複数のマーカの各々は、異なる寿命の放出エネルギーを放出する。センサが特定の波長を検出するように構成されている場合、複数のマーカはその特定の波長と同様の放出エネルギーを放出してもよい。あるいは、複数のマーカは、異なる波長の放出エネルギーを放出してもよい。本明細書に記載されているマーカの寿命の判定方法が使用されてもよい。励起源からの励起エネルギーのパルスに応答して、検体にタグ付けされた複数のマーカの1つは、光子を放出してもよい。励起パルスの後の光子の時間が記録される。励起エネルギーの繰り返しパルスは複数の光子放出イベントを生成してもよく、したがって、これらはマーカの寿命を判定するために使用される。その後、判定された寿命は検体ウェル内のマーカを複数のマーカのなかから識別するために使用されてもよい。

【0408】

寿命測定に基づいて区別可能な4つの発光マーカの集合の一例は、図10-6のプロットで示されるようにアットロー(ATRho)14、Cy5、AT647N、及びCF6

10

20

30

40

50

33である。これら4つのマーカは、異なる寿命を有し、少なくとも4つのタイムビンが使用されるとき、区別可能なヒストグラムを生成する。図10-7は、16のタイムビンにわたるこれらのマーカの各々の信号プロファイルの概要を示す。信号プロファイルは各マーカについて正規化されている。タイムビンは時間間隔が異なり、マーカの各々について固有の信号プロファイルを提供する。図10-7に示されているように、可変的な間隔の時間境界で画定される16のタイムビンを有するセンサが、この16のタイムビンの1つ又は複数にわたる光子カウントの分布によってアットロー (A T T O R h o) 14、C y 5、アット (A T T O) 647 N、及びC F 633を区別するために使用できる。例えば、センサは、時間境界0.692 ns~0.792 nsでマーカアットロー (A T T O R h o) 14により検出された光全体の11%を検出する。他の例では、センサは、時間境界1.991 ns~2.507 nsでマーカC F 633から検出された光全体の10%を検出する。このようにして、各マーカは、1つ又は複数のタイムビンでの光の総量により区別されてもよい。図10-8及び10-9は、寿命測定に基づいて区別可能な他の例示的なマーカの集合、アットロー (A T T O R h o) 14、D 650、S T 647、及びC F 633の、それぞれ連続及び離散した信号プロファイルを示している。他のマーカの集合には、アットロー (A T T O R h o) 14、C 647、S T 647、C F 633；アレクサフルー (A l e x a F l u o r) 647、B 630、C 640 R、C F 633；及びアットロー (A T T O R h o) 14、アット (A T T O) 647 N、アレクサフルー (A l e x a F l u o r) 647、C F 633が含まれる。

10

K. スペクトル寿命測定

20

寿命測定は、1つ又は複数の発光マーカのスペクトル測定と組み合わせてもよい。スペクトル測定は、個々のマーカに関する放出エネルギーの波長に依存してもよく、ピクセルあたり少なくとも2つのセンサ領域を使用して捕捉される。センサは、検体ウェルから放出される放出エネルギーのスペクトル特性を検出するように構成される。集積装置の例示的構造はピクセルを含み、各々が2つの異なる領域を備えるセンサを有し、各領域が異なる波長を検出するように構成される。いくつかのマーカは、実質的に重複するスペクトルを有し、及び／又は差が例えば約5 nm以下だけ異なるピーク放出波長を有していてもよく、スペクトル検出法のみに基づいたのでは区別が難しい。しかしながら、これらのマーカは寿命が異なり、寿命測定を行う他の技術を使用して、マーカ間を区別してもよい。

【0409】

30

寿命測定とスペクトル測定との両方の組合せは、1つの励起エネルギー波長を使用して検体ウェル内のマーカを励起することによって実施されてもよいが、いくつかの実施形態において、複数の励起エネルギー波長が使用されてもよい。マーカの組合せは、少なくとも2つの異なる放出波長を有するように選択され、ある波長で放出するマーカは異なる寿命を有し、寿命及びスペクトル測定に基づいて個々のマーカを区別するように選択される。それに加えて、マーカの組合せは、使用される励起源により照明されると励起状態に到達できるように選択される。異なる放出波長及び／又は異なる寿命を有する、何れの適当なマーカの集合又は数が使用されてもよい。

【0410】

励起源はパルス式励起源であり、上述の技術を使用する励起源の1つであってもよい。いくつかの例において、パルス式励起源は、レーザダイオードの直接変調電気ポンピングを通じてパルスを放出するように構成された半導体レーザダイオードであってもよい。パルスのパワーは、ピーク後の250ピコ秒後にピークパワーより20 dB低下する。各励起パルスの持続時間は20~200ピコ秒の範囲である。各励起パルス間の時間間隔は1~50ナノ秒の範囲である。例示的測定がどのように行われ得るかの概略が、図10-10に示される。いくつかの実施形態において、励起源は、約640 nmの波長の励起エネルギーを提供する。いくつかの実施形態において、励起源は、波長が約515 nm~535 nmの励起エネルギーを提供する。

40

【0411】

センサは、複数のマーカからの放出エネルギーの時間及びスペクトル特性の両方を検出

50

するように構成される。各ピクセルのセンサは、ピクセルごとに少なくとも2つの感光領域を有する。いくつかの実施形態において、ピクセルごとに2つの感光領域がある。他の実施形態において、ピクセルごとに4つの感光領域がある。各感光領域は、異なる波長又は波長範囲を検出するように構成される。光子は、これらがセンサに到達したときの時間間隔内で検出される。タイムビン数を増やすと、一連のタイムビンにわたり収集された光子の記録ヒストグラムの分解能を改善して、それらの個々の寿命による異なる発光マーカ間の差別化を改善できる。いくつかの実施形態において、センサの各領域につき2つのタイムビンがある。他の実施形態において、センサの各領域につき4つのタイムビンがある。

【0412】

10

いくつかの実施形態において、センサは4つの異なるマーカを検出するために使用される2つのサブセンサを含む。第一のサブセンサは、マーカの2つにより放出される第一の放出波長に関連付けられる。第一のサブセンサはまた、第一の放出波長を放出する2つのマーカからの2つの異なる寿命にも関連付けられてよい。第二のサブセンサは残り2つのマーカにより放出される第二の波長に関連付けられてもよい。第二のサブセンサはまた、第二の放出波長で放出する2つのマーカからの2つの異なる寿命にも関連付けられてよい。4つの発光マーカ間の区別は、検出された波長と検出された寿命との組合せに基づいて行われてもよい。2つのサブセンサの各々は、マーカにより放出される放出エネルギーの単一光子を検出してよい。

【0413】

20

寿命測定に基づいて区別可能な4つの発光マーカの集合の一例は、アットロー (ATTO Rho) 14、AS635、アレクサフルー (Alexa Fluor) 647、及びアット (ATTO) 647Nである。これら4つのマーカのうちの2つずつが、1つの同様の波長と他の同様の波長で放出する。同様の波長で放出する各マーカペア内で、マーカペアは異なる寿命を有し、少なくとも4つのタイムビンが使用されるときに区別可能なヒストグラムを生成する。この例において、アットロー (ATTO Rho) 14及びAS635は同様の発光波長を放出し、異なる寿命を有する。アレクサフルー (Alexa Fluor) 647とアット (ATTO) 647Nは、アットロー (ATTO Rho) 14及びAS635により放出される波長と異なる、同様の発光波長を放出し、異なる寿命を有する。図10-11は、このマーカの集合のための放出波長に関する寿命のプロットを示し、これらのマーカの各々が、寿命と放出波長との組合せに基づいてどのように区別可能であるかを示している。図10-11に示されるように、アットロー (ATTO Rho) 14は645nm付近を放出してもよく、AS635は653nm付近を放出してもよく、アレクサフルー (Alexa Fluor) 647は665nm付近を放出してもよく、アットフルー (ATTO Fluor) 647Nは669nm付近を放出してもよい。AS635とアット (ATTO) 647Nは、約1.2nsと同様の寿命を有し、アットロー (ATTO Rho) 14とアレクサフルー (Alexa Fluor) 647はAS635とATTO 647との両方よりも短い寿命を有する。これらのマーカは、その特徴的放出波長と放出寿命に基づいて区別可能である。例えば、アット (ATTO) 647Nとアレクサフルー (Alexa Fluor) 647は同様のピーク放出波長を有するが、それらの寿命は区別可能である。AS635とアット (ATTO) 647Nは同様の寿命を有するが、そのピーク放出波長は実質的に異なる。

30

40

【0414】

マーカは、同じ励起波長又は2つ以上の異なる励起波長で励起してもよい。センサが放出エネルギーの2つの波長を検出するように構成されている場合、4つのマーカのうちの2つは第一の波長で放出してもよく、一方、残りの2つのマーカは第二の波長で放出してもよい。あるいは、センサが4つの放出波長を検出するように構成されている場合、各マーカは異なる波長を放出してもよく、及び／又は異なる放出確率密度と寿命を有してもよい。図10-12は、アットロー (ATTO Rho) 14、アレクサフルー (Alexa Fluor) 647、及びアット (ATTO) 647Nの波長に関するパワーのプ

50

ロットを示す。

【0415】

図10-13は、直径135nmの検体ウェル内に存在するときのこれらのマーカのそれぞれ1つに関する時間に伴う蛍光信号をプロットしたもので、これらのマーカに関する異なる時間減衰、したがって寿命を示している。

【0416】

図10-14は、4つのセンサ領域にわたってこれらのマーカの信号プロファイルを示しており、各領域が4つのタイムビンを捕捉する。信号プロファイルは正規化され、4つのタイムビンの各々において感光領域により捕捉される光子の相対数により、異なるマーカ間で区別するために使用される。第一のマーカ（アレクサフルー（Alexa Fluor）647）から放出される第一の放出波長の光は第一のセンサ領域に向けられる。しかしながら、光の指向性は完全ではなく、光の一部は第二のセンサ領域、第三のセンサ領域、及び第四のセンサ領域により検出される。そのため、第一のマーカから放出された光は第一のセンサ検出器信号に関連付けられ、これは図10-14の中央の概略図で、4つのセンサ領域が4つのタイムビンで検出する光全体のパーセンテージに関する統計で示されている。1. 184ns～2. 069nsの第二のタイムビンにおいて、第一のセンサ領域は第一のマーカからの検出光全体の4. 2%を検出し、第二のセンサ領域は第一のマーカからの検出光全体の11. 7%を検出し、第三のセンサ領域は第一のマーカからの検出光全体の18. 6%を検出し、第四のセンサ領域は第一のマーカからの検出光全体の14. 6%を検出する。1つ又は複数のタイムビンについてのこの検出センサパターンは、第一のマーカに関連する第一の検出信号を構成する。図10-14は、アットロー（ATRhο）14及びアット（ATTO）647Nマーカに関するセンサ及びタイムビンパターンを示し、その結果、少なくともこれら3つのマーカ間の区別可能な検出信号が得られる。例えば、第二のセンサは、0. 25ns～1. 184nsの第一のタイムビンにおいてマーカアットロー（ATTORhο）14からの光全体の12. 3%を検出する。このようにして、各マーカはその放出スペクトルと寿命に基づいて区別される。

【0417】

このようなスペクトル-寿命測定のための4つの他の蛍光体の集合は、アットロー（ATRhο）14、D650、ST647、CF633；アットロー（ATTO Rhο）14、C647、ST647、CF633；アレクサフルー（Alexa Fluor）647、B630、C640R、CF633；及びアットロー（ATTO Rhο）14、アット（ATTO）647N、アレクサフルー（Alexa Fluor）647、CF633である。図10-15は、アットロー（ATRhο）14、D650、ST647、及びC633に関する時間に伴う信号の強度プロファイルのプロットを示している。図10-16は、アットロー（ATRhο）14の信号プロファイルを示す。

L. 寿命-励起エネルギー測定

寿命測定と少なくとも2つの励起エネルギー波長の使用との組合せが、複数のマーカの区別に使用されてもよい。いくつかのマーカは、1つの励起波長が使用され、他の波長は使用されないときに励起されてもよい。異なる寿命を有するマーカの組合せは、各励起波長に関して、寿命測定に基づいて個々のマーカ間で区別するように選択される。この実施形態において、センサチップは、1つの領域を有するセンサを有する各ピクセルを有するように構成されてもよく、機器は、例えば時間的インタリーブ方式で電氣的に変調されたパルス式ダイオードレーザにより、少なくとも2つの励起エネルギー波長を提供するように構成されてもよい。

【0418】

マーカは、異なる励起波長で励起してもよい。光源が励起エネルギーの2つの波長を供給するように構成されている場合、いくつかのマーカは第一の励起波長で励起し、第二の励起波長では励起しなくてもよく、その一方で、他のマーカは第二の励起波長で励起し、第一の励起波長では実質的に励起しない。いくつかの実施形態において、2つのマーカは第一の励起波長で励起し、第二の励起波長では実質的に励起しないが、異なる放出確率密

度と寿命で放出する。2つの異なるマーカは、第二の励起波長で励起し、第一の励起波長では実質的に励起しないが、異なる放出確率密度と寿命を有する。

【0419】

励起源は、少なくとも2つの励起エネルギーの組合せである。励起源はパルス式励起源であり、上述の技術を使った励起源の1つ又は複数であってもよい。いくつかの例において、パルス式励起源は、レーザダイオードの直接変調電気ポンピングを通じてパルスを放出するように構成された2つの半導体レーザダイオードであってもよい。パルスのパワーは、ピークの250ピコ秒後にパルスピークパワーから20dB低下する。各励起パルスの時間間隔は20~200ピコ秒の範囲であってもよい。各励起パルス間の時間間隔は、1~50ナノ秒の範囲である。1つの励起波長は、パルスごとに放出され、励起波長を知ることにより、異なる寿命のマーカのサブセットが一意的に識別される。いくつかの実施形態において、異なる波長のなかで励起のパルスが交互になる。例えば、2つの励起波長が使用される場合、その後のパルスは1つの波長ともう一方の波長との間で交互になる。例示的測定がどのように行われるかの概略図が図10-17に示されている。複数の励起源を組合せ、異なる波長を有するパースをインタリーブするために、何れの適当な技術が使用されてもよい。

10

【0420】

各ピクセルのセンサは、ピクセルごとに少なくとも1つの感光領域を有する。感光領域の寸法は5マイクロメートル×5マイクロメートルであってもよい。光子はそれらがセンサに到達する時間間隔内に検出される。タイムビンの数を増やすことにより、一連のタイムビンにわたり収集された光子の記録ヒストグラムの分解能を改善し、異なる発光マーカ間での差別化を改善できる。センサは少なくとも2つのタイムビンを有する。いくつかの実施形態において、センサはマーカからの放出エネルギーの寿命を特定するために4つのタイムビンを有していてもよい。

20

【0421】

寿命測定に基づいて区別可能な4つの発光マーカの集合の一例は、アレクサフルー (Alexa Fluor) 546、Cy3B、アレクサフルー (Alexa Fluor) 647、及びアット (ATTO) 647Nである。図10-18に示されるように、アレクサフルー (Alexa Fluor) 546及びCy3Bは、1つの波長、例えば532nmで励起し、異なる寿命を有する。図10-19に示されるように、アレクサフルー (Alexa Fluor) 647及びアット (ATTO) 647Nは、他の波長、640nmで励起し、異なる寿命を有する。例えば、アット (ATTO) 647N及びアレクサフルー (Alex Fluor) 647に関する曲線が、異なる寿命を有するこれら2つのマーカを示す図10-19に示されている。640nmで何れも励起されるアット (ATTO) 647N及びCF633に関する16のタイムビンにわたる区別可能な正規化された信号プロファイルが図10-20に示されている。例えば、センサは時間境界0.629ns~0.997nsでマーカアット (ATTO) 647Nから検出される光全体の12%を検出する。既知の励起波長の後に光子を検出することによって、これら2つのマーカペアの一方は、前の励起波長に基づいて判定されてもよく、あるペアの各マーカは寿命測定に基づいて識別される。

30

40

M. スペクトル測定

1つ又は複数のセンサは、波長を、それらがセンサに到達する前に選別するように構成されたアッセイチップ又はセンサチップの1つ又は複数の層を含めることによって、スペクトル特性を検出するように構成される。1つ又は複数の層は、検体ウェルから放出される放出エネルギーをスペクトルにより選別するように構成された少なくとも1つの構造部品を含んでいてもよい。この少なくとも1つの構造部品は、オフセットフレネルレンズ、ブレード位相回折格子、又はスペクトル分布放出エネルギーのための所望の指向性を提供するように構成された他のあらゆる適当な構造を含んでいてもよい。

【0422】

センサチップのピクセルは、アッセイチップ上の対応する検体ウェルから誘導された放

50

出エネルギーのスペクトル分布を検出するように構成された複数のサブセンサを含んでもよい。センサチップとセンサチップ上の複数のサブセンサの構成は、検体に標識するために使用された異なるマーカ間を十分に区別できる大きさ、形状、及び配置であってもよい。

【0423】

発光マーカ間の区別は、検出された波長に基づいて行われてもよい。

いくつかの実施形態において、センサは4つのサブセンサに分割されて、4つの異なる発光マーカを検出してもよい。センサの大きさと位置は、検体ウェルから放出された放出エネルギーを捕捉するために、何れの適当な方法で決定されてもよい。

【0424】

いくつかの実施形態において、各サブセンサは異なる発光波長に関連付けられる。第一の発光マーカ（例えば、アレクサフルー（Alexa Fluor）555）から放出される第一の発光波長の光は、第一のサブセンサに向かって誘導される。しかしながら、光の指向性は完全ではなく、光の一部は第二のサブセンサ、第三のサブセンサ、及び第四のサブセンサにより検出される。そのため、第一の発光マーカから放出される光は、図10-21に示されるように、第一のセンサ検出器信号に関連付けられる。センサのインテグレーションタイム中に光子が収集される場合、第一のサブセンサは第一の発光マーカから検出された光全体の42%を検出し、第二のサブセンサは第一の発光マーカから検出された光全体の39%を検出し、第三のサブセンサは第一の発光マーカから検出された光全体の15%を検出し、第四のサブセンサは第一の発光マーカから検出された光全体の4%を検出する。この検出されたサブセンサパターンは、第一の発光マーカに関連付けられる第一の検出信号を構成する。異なるサブセンサパターンは、異なる発光マーカからの異なる発光波長に関連付けられ、その結果、図10-21に示されるように、区別可能な検出信号が得られる。

【0425】

同様に、第二のサブセンサは第二の発光波長に関連付けられ、第三のサブセンサは第三の発光波長に関連付けられ、第四のサブセンサは第四の発光波長に関連付けられる。このようにして、放出エネルギーに基づいて区別可能な例示的のマーカはアレクサフルー（Alexa Fluor）555、アレクサフルー（Alexa Fluor）568、アレクサフルー（Alexa Fluor）647、及びアレクサフルー（Alexa Fluor）660であり、これらは図10-22に示される発光スペクトルを有する。

VII. コンピューティングデバイス

図10-23は、実施形態を実装できる適当なコンピューティングシステム環境1000の一例を示す。例えば、図2-1のコンピューティングデバイス2-130は、コンピューティングシステム環境1000により実装されてもよい。それに加えて、コンピューティングシステム環境1000は、アッセイを実行するための機器を制御するようにプログラムされた制御システムとして機能してもよい。例えば、制御システムは光を放出し、アッセイチップの検体ウェルに向かって誘導するように励起源を制御し、検体ウェル内の1つ又は複数の検体からの放出光の検出を可能にするようにセンサを制御し、センサからの信号を解析して、例えば放出エネルギーの空間的分布を解析することによって、検体ウェル内にある検体を識別してもよい。コンピューティングシステム環境1000は、適当なコンピューティング環境の一例にすぎず、本発明の用途又は機能範囲に関していかなる限定も提案しようとしていない。コンピューティング環境1000が、例示的な動作環境1000に示されている構成部品の何れかの1つ又は組合せに関してもいかなる依存性又は要求事項も有すると解釈するべきではない。

【0426】

実施形態は、他の多数の汎用又は特定用途コンピューティングシステム環境又は構成で動作する。本発明で使用するために好適であり得る公知のコンピューティングシステム、環境、及び／又は構成の例としては、上記のシステム又はデバイスの何れかを含まるパーソナルコンピュータ、サーバコンピュータ、ハンドヘルドもしくはラップトップデバイス、

10

20

30

40

50

マルチプロセッサシステム、マイクロプロセッサに基づくシステム、セットトップボックス、プログラム可能な民生用電子機器、ネットワークPC、マイクロコンピュータ、メインフレームコンピュータ、分散型コンピュータ環境、及びその他が含まれる。

【0427】

コンピューティング環境は、プログラムモジュール等、コンピュータ実行可能命令を実行してよい。一般に、プログラムモジュールは、特定のタスクを実行し、又は特定の抽象データタイプを実施するルーチン、プログラム、オブジェクト、コンポーネント、データ構造その他を含む。本発明はまた、通信ネットワークを通じてリンクされる遠隔処理機器によってタスクが実行される分散型コンピューティング環境で実施されてもよい。分散型コンピューティング環境では、プログラムモジュールはメモリ記憶装置を含むローカル及びリモートコンピュータ記憶媒体の両方内にあり得る。

10

【0428】

図10-23に関して、本発明を実施するための例示的システムは、コンピュータ1010の形態での汎用コンピューティングデバイスを含む。コンピュータ1010の構成要素は、処理ユニット1020と、システムメモリ1030と、処理ユニット1020にシステムメモリを含む各種のシステム構成要素を連結するシステムバス1021とを含んでもよいが、これらに限定されない。システムバス1021は、各種のバスアーキテクチャの何れかを使用するメモリバス又はメモリコントローラ、周辺バス、及びローカルバスを含むいくつかのバス構造の何れであってもよい。例えば、このようなアーキテクチャには業界標準アーキテクチャ（ISA：Industry Standard Architecture）バス、マイクロチャネルアーキテクチャ（MCA：Micro Channel Architecture）バス、エンハンスドISA（EISA：Enhanced ISA）バス、ビデオエレクトロニクススタンダードアソシエーション（VESA：Video Electronics Standards Association）ローカルバス、及びメザニン（Mezzanine）バスとしても知られるペリフェラルコンポーネントインターコネクト（PCT：Peripheral Component Interconnect）バスも含まれるが、これらに限定されない。

20

【0429】

コンピュータ1010は典型的に、各種のコンピュータ読取可能媒体を含む。コンピュータ読取可能媒体は、コンピュータ1010によりアクセス可能な何れの入手可能な媒体とすることもでき、揮発性及び不揮発性の取外可能及び取外不能媒体の両方を含む。例えば、コンピュータ読取可能媒体には、コンピュータ記憶媒体と通信媒体が含まれるが、これらに限定されない。コンピュータ記憶媒体は、コンピュータ読取可能命令、データ構造、プログラムモジュール又はその他のデータ等の情報を保存するためのあらゆる方法又は技術で実装される揮発性及び不揮発性の取外可能及び取外不能媒体を含む。コンピュータ記憶媒体には、RAM、ROM、EEPROM、フラッシュメモリ又はその他のメモリ技術、CD-ROM、デジタルバーサタイルディスク（DVD：digital versatile disk）又は他の光ディスクストレージ、磁気カセット、磁気テープ、磁気ディスクストレージもしくは他の磁気記憶装置、又は所望の情報を保存するために使用でき、コンピュータ1010によりアクセス可能な他のあらゆる媒体が含まれるが、それらに限定されない。通信媒体は典型的に、コンピュータ読取可能命令、データ構造、プログラムモジュール又はその他のデータを、搬送波又はその他の搬送機構等の変調データ信号で具現化し、あらゆる情報送達媒体を含む。「変調データ信号」という用語は、その特徴の1つ又は複数が情報を信号内で符号化するような方法で設定又は変更されている信号を意味する。例えば、通信媒体には、有線ネットワーク又は直接有線接続等の有線媒体、及び音響、RF、赤外線及び他の無線媒体等の無線媒体が含まれるが、これらに限定されない。上述の何れの組合せも、コンピュータ読取可能媒体の範囲内に含められるべきである。

30

40

【0430】

システムメモリ1030は、リードオンリーメモリ（ROM）1031及びランダムア

50

クセスメモリ（RAM）１０３２等の揮発性及び／又は不揮発性メモリの形態のコンピュータ記憶媒体を含む。起動時等にコンピュータ１０１０内の要素間での情報伝達を促進する基本ルーチンを含む基本的な入力／出力システム１０３３（BIOS）が典型的にROM １０３１に記憶される。RAM １０３２には典型的に、処理ユニット１０２０により即時にアクセス可能な、及び／又は現在動作中のデータ及び／又はプログラムモジュールが収められている。例えば、図１０－２３は、オペレーティングシステム１０３４、アプリケーションプログラム１０３５、その他のプログラムモジュール１０３６、及びプログラムデータ１０３７を示しているが、これらに限定されない。

【０４３１】

コンピュータ１０１０はまた、他の取外可能／取外不能の揮発性／不揮発性コンピュータ記憶媒体も含んでいてよい。あくまでも例として、図１０－２３は、取外不能の不揮発性磁気媒体から読み取り、又はそれに書き込むハードディスクドライブ１０４１と、取外可能の不揮発性磁気媒体１０５２から読み取り、又はそれに書き込む磁気ディスクドライブ１０５１と、CD ROM又はその他の光ディスク等の取外可能の不揮発性光ディスク１０５６の読み取り又はそれへの書き込みを行うような光ディスクドライブ１０５５を示している。例示的な動作環境内で使用可能なその他の取外可能／取外不能の揮発性／不揮発性コンピュータ記憶媒体としては、磁気テープカセット、フラッシュメモリカード、デジタルバーサタイルディスク、デジタルビデオテープ、ソリッドステートRAM、ソリッドステートROM、及びその他が含まれるが、これらに限定されない。ハードディスクドライブ１０４１は典型的に、取外不能メモリインタフェース、例えばインタフェース１０４０を通じてシステムバス１０２１に接続され、磁気ディスクドライブ１０５１と光ディスクドライブ１０５５は典型的に、取外可能メモリインタフェース、例えばインタフェース１０５０によってシステムバス１０２１に接続される。

【０４３２】

上述し、図１０に示したドライブ及びその関連するコンピュータ記憶媒体は、コンピュータ１０１０のためのコンピュータ読取可能命令、データ構造、プログラムモジュール、及びその他のデータを記憶する。例えば、図１０－２３において、ハードディスクドライブ１０４１は、オペレーティングシステム１０４４、アプリケーションプログラム１０４５、その他のプログラムモジュール１０４６、及びプログラムデータ１０４７を記憶するものとして示されている。これらの構成部品は、オペレーティングシステム１０３４、アプリケーションプログラム１０３５、その他のプログラムモジュール１０３６、及びプログラムデータ１０３７と同じ又は異なるものとして行うことができる点に留意されたい。オペレーティングシステム１０４４、アプリケーションプログラム１０４５、その他のプログラムモジュール１０４６、及びプログラムデータ１０４７には、少なくとも、これらが異なるコピーであることを示すために、ここでは異なる番号が付与されている。使用者は、キーボード１０６２、及び一般的にマウス、トラックボール、又はタッチパッドと呼ばれるポインティングデバイス１０６１等の入力装置を通じてコンピュータ１０１０に命令と情報を入力してもよい。その他の入力装置（図示せず）は、マイクロフォン、ジョイスティック、ゲームパッド、衛星用パラボラアンテナ、スキャナ、又はその他を含んでいてもよい。これら及びその他の入力装置はしばしば、システムバスに連結されたユーザ入力インタフェース１０６０を通じて処理ユニット１０２０に接続されているが、他のインタフェース及びバス構造、例えばパラレルポート、ゲームポート、又はユニバーサルシリアルバス（USB）等によって接続されてもよい。モニタ１０９１又はその他の種類の表示装置もインタフェース、例えばビデオインタフェース１０９０を介してシステムバス１０２１に接続される。モニタに加えて、コンピュータはまた、他の周辺出力装置、例えばスピーカ１０９７及びプリンタ１０９６を含んでいてもよく、これらは出力周辺インタフェース１０９５を通じて接続されてもよい。

【０４３３】

コンピュータ１０１０は、１つ又は複数のリモートコンピュータ、例えばリモートコンピュータ１０８０との論理接続を使用してネットワーク環境で動作してもよい。リモート

10

20

30

40

50

コンピュータ 1080 は、パーソナルコンピュータ、サーバ、ルータ、ネットワーク PC、ピアデバイス、又はその他の一般的なネットワークノードであってもよく、典型的には、コンピュータ 1010 に関して上述した要素の多く又は全部を含むが、メモリ記憶装置 1081 のみが図 10-23 に示されている。図 10-23 に示されている論理接続は、ローカルエリアネットワーク (LAN) 1071 及びワイドエリアネットワーク (WAN) 1073 を含むが、他のネットワークも含んでいてよい。このようなネットワーキング環境は、オフィス、企業内コンピュータネットワーク、イントラネット、及びインターネットにおいて一般的である。

【0434】

LAN ネットワーキング環境で使用される場合、コンピュータ 1010 はネットワークインタフェース又はアダプタ 1070 を通じて LAN 1071 に接続される。WAN ネットワーキング環境で使用される場合、コンピュータ 1010 は典型的に、モデム 1072、又はインターネット等の WAN 1073 上での通信を確立するためのその他の手段を含む。内蔵でも外付けでもよいモデム 1072 は、ユーザ入力インタフェース 1060、又は他の適当なメカニズムを介して、システムバス 1021 に接続されてもよい。ネットワーク環境において、コンピュータ 1010 に関して説明したプログラムモジュール又はその一部が、リモートメモリ記憶装置に保存されてもよい。例えば、図 10-23 はリモートアプリケーションプログラム 1085 をメモリ装置 1081 にあるように示されているが、これに限定されない。図のネットワーク接続は例示的であり、コンピュータ間の通信リンクを確立するための他の手段が使用されてもよいことがわかるであろう。

IX. 製造工程

上述の集積装置は、何れの適当な方法で製造されてもよい。以下に、適当な集積装置を作るための、当技術分野で知られている技術とどのようにでも組み合わせられてもよい集積装置の各種の構成要素の製造について説明する。

A. ナノアパーチャ製造プロセス

検体ウェル (例えば、ナノアパーチャ) は、何れの適当な方法で製造されてもよい。いくつかの実施形態において、検体ウェルは、標準的なフォトリソグラフィプロセスとエッチング方式を使用して製造されてもよい。検体ウェルは、金属 (例えば、Al、TiN)、又はフォトリソグラフィプロセスと適合するあらゆる適当な材料を有する層で形成されてもよい。図 11-1 は、集積装置の検体ウェルの例示的な製造方法を示す。層 11-112 は検体ウェルを形成し、Al 又は TiN 等の金属を含んでいてもよい。層 11-110 は、誘電層として機能してもよく、SiO₂ 又は窒化シリコン等の何れの適当な誘電基板から形成されてもよい。方法の 1 つの工程は、基板 11-110 に層 11-112 を直接堆積させる工程を含む。いくつかの実施形態において、層 11-112 と層 11-110 との間に追加の層を堆積させてもよい。層 11-112 は、何れの適当な厚さで堆積させてもよく、いくつかの実施形態において、厚さは結果として得られる検体ウェルの高さを決定してもよい。層 11-112 の厚さは約 50 nm、約 100 nm、又は約 150 nm であってもよい。次に、反射防止コーティング (ARC) 11-122 を層 11-112 の上に堆積させる。エッチマスク 11-120 (例えば、フォレジストエッチマスク) を ARC 11-122 の上に堆積させる。従来のフォトリソグラフィ技術を使用して、エッチマスク 11-120 と ARC 11-122 に穴をパターンニングする。エッチマスク 11-120 によりパターンニングされる穴は、直径が約 50 nm、約 100 nm、又は約 150 nm であってもよい。次に、エッチング、例えば反応イオン法を使用して穴パターンを下層 11-112 に転写し、検体ウェルを形成する。エッチングは層 11-110 の表面で停止してもよく、又はエッチングで層 11-112 の穴の下層 11-110 に窪みを形成してもよい。従来の方法を使用して、層 11-112 からエッチマスク 11-120 及び ARC 11-122 を剥離する。検体ウェルの寸法は約 50 nm、約 100 nm、又は約 150 nm であってもよい。

【0435】

あるいは、検体ウェルは標準的なフォトリソグラフィプロセスとリフトオフ法を使用し

て製造してもよい。図11-2は、リフトオフ法を使用して検体ウェルを形成する例示的方法を示している。金属（例えば、Al、Au、Cr）を含んでいてもよい層11-212内に検体ウェルを形成する。何れの適当な材料、例えば誘電材料（例えば、SiO₂）を含んでいてもよい基板層11-210の上に層11-212を形成する。層11-212の堆積は、フォトリソグラフィプロセスとは別に、その後に行ってもよい。図11-2に示されるリフトオフ製造プロセスの第一の工程は、基板11-210の上に反射防止コーティング（ARC）11-222を、その後、基板11-210の上に直接フォトレジストエッチマスク11-220を堆積させる工程を含んでいてもよい。従来のフォトリソグラフィ方式を使用して、レジストのピラー11-230が残されるようにフォトレジストをパターンニングする。ピラーは、結果として得られる検体ウェルに対応する何れの適当な大きさ及び形状であってもよい。ピラーの直径は、約50nm、約100nm、又は約150nmであってもよい。このような技術は、基板のピラーの周辺から、レジストとARC層を溶解させる工程を含んでいてもよい。以下の工程はレジストのピラーと基板の上に直接層11-212を堆積させ、キャップ付ピラーを形成する工程を含んでいてもよい。他の実施形態において、層11-212の堆積の前又は後に、追加の層を堆積させてもよい。非限定的な例として、TiNはAlで形成される層11-212の上に堆積させてもよく、任意選択によりその後、Al₂O₃を堆積させる。層11-212は、何れの適当な厚さで堆積させてもよく、いくつかの実施形態において、その厚さは約50nm、約100nm、又は約150nmであってもよい。検体ウェルを形成するために、キャップ付ピラーを、フォトレジストが使用された場合は溶剤により、又は二酸化シリコン又は窒化シリコンのハードエッチマスクが使用された場合は選択的エッチングによって剥離してもよい。検体ウェルの直径は、約50nm、約100nm、又は約150nmであってもよい。

【0436】

あるいは、検体ウェルは、標準フォトリソグラフィプロセス及び代替的なリフトオフ法を使用して製造してもよい。図11-3は、集積装置の検体ウェル形成の例示的实施形態を示している。ハードエッチマスク層11-314を基板11-310の上に堆積させる。ハードエッチマスク層11-314は、Ti又は他の何れの適当な材料を含んでいてもよい。基板11-310は、誘電材料（例えば、SiO₂）又は他の何れの適当な材料を含んでいてもよい。次に、ARC層11-322をハードエッチマスク層11-314の上に堆積させてもよく、その後、フォトレジスト層11-320を堆積させる。従来のフォトリソグラフィ法を使用して、フォトレジストをパターンニングし、レジストのピラー11-320を形成する。このフォトレジストピラーパターンは、ARC層11-322とハードエッチマスク層11-314をエッチングするためのエッチマスクとして使用される。次に、フォトレジスト層11-320とARC 11-322を剥離して、ハードエッチマスクのピラー11-330を残す。従来の技術を使用して、残りのフォトレジストとARC層をピラーから溶解させてもよい。次の工程は、層11-312をピラー11-330の上に直接堆積させて、キャップ付ピラーを形成する工程を含んでいてもよい。検体ウェルを形成するために、層11-314を腐食させる過酸化水素エッチング又は他の適当なエッチングによりキャップ付ピラーを剥離し、キャップを「リフトオフ」し、その結果、層11-312内に検体ウェルが形成される。

【0437】

いくつかの実施形態において、検体ウェルは、何れの適当な方法で検体ウェルを通るプラズモン透過を減衰させるために製造されてもよい。例えば、検体ウェルは多層積層体で製造されてもよい。多層積層体は、基板に堆積される金属層、吸収層、及び／又は表面層を含んでいてもよいが、これに限定されない。表面層は、保護層であってもよい。多層積層体は、何れの適当な方法で製造されてもよい。従来のパターンニング及びエッチング法が使用されてもよい。金属層は基板上に堆積されてもよい。あるいは、吸収層は金属層の上に堆積されてもよい。あるいは、表面保護層は吸収層／金属層積層体の上に堆積されてもよい。フォトレジスト及び反射防止層が多層積層体の最上層の上に堆積されてもよい。フ

10

20

30

40

50

ォトレジスト層は、検体ウェルの寸法でパターンニングされてもよい。多層積層体を直接エッチングして、検体ウェルを形成してもよい。

【0438】

吸収層は、何れの適当な吸収材料を含んでいてもよい。非限定的な例としては、窒化シリコン、 TiN 、 aSi 、 TaN 、 Ge 及び／又は Cr が含まれる。名前が挙げられた材料の多層体、例えば Si_3N_4 も使用可能である。金属層と表面層は、何れの適当な材料で製作されてもよい。例えば、 Al 、 $AlSi$ 、又は $AlCu$ が金属層に使用されてもよい。表面層は、例えば Al 又は Al_2O_3 で製作されてもよい。多層積層体の検体ウェルは、上述のプロセスを使用して製造されてもよい。

【0439】

それに加えて、及び／又はその代わりに、反射層を基板の上に直接堆積させてから、多層積層体を堆積させて、フォトリソグラフィ中の光ビームの焦点を制御してもよい。反射層は、基板の上に直接堆積させ、検体ウェルの寸法でパターンニングしてもよい。任意選択により、反射防止コーティングの層とそれに続くフォトレジスト層をパターンニングされた反射コーティング層の上に堆積させ、 ARC とフォトレジストのピラーが基板上のある位置に残されるようにパターンニングしてもよい。次に、多層積層体をピラー、反射層、及び基板の上に堆積させてもよい。上述のようにリフトオフプロセスを使用してキャップ付ピラーを除去してもよく、基板のピラーがあった箇所に検体ウェルが形成される。

【0440】

同様に、 Ti ピラーは検体ウェルを形成するために使用されてもよい。第一の工程は、基板上に Ti 層を堆積させ、その後、反射防止コーティングの層とフォトレジストの層が続いてもよい。 Ti 層をパターンニングし、エッチングして、 Ti ピラーを形成してもよい。 Ti ピラーと基板の上に多層積層体を堆積させてもよい。最後に、 Ti ピラーを除去してもよく、基板の、 Ti ピラーがあった場所に対応する箇所に検体ウェルが形成される。

【0441】

何れの適当な堆積方法が使用されてもよい。例えば、 PVD 、 CVD 、スパッタリング、 ALD 、 e ビーム堆積及び／又は熱蒸着が、1つ又は複数の層の堆積に使用されてもよい。堆積環境は、堆積間の層の酸化を防止するように制御されてもよい。例えば、環境は1つ又は複数の層の堆積中及び堆積間に高真空及び／又は低酸素状態に保持されてもよい。

B. 同心円回折格子（ブルズアイ）製造プロセス

同心円回折格子又はブルズアイは、何れの適当な方法で製造してもよい。いくつかの実施形態において、同心円回折格子は、標準的なリソグラフィプロセスとエッチング法を使用して製造してもよい。何れの適当な誘電材料、例えば SiO_2 又は窒化シリコンを同心円回折格子の形成に使用してもよい。図11-4に示される実施形態において、 SiO_2 層11-1010は、同心円回折格子の製造に使用される。製造プロセス内の第一の工程は、ハードエッチマスク11-1014を SiO_2 層の上に直接堆積させる工程を含んでいてもよい。製造プロセスの次の工程（動作11-1001）は、反射防止コーティング層11-1022の直接上にあるフォトレジスト層11-1020をハードエッチマスクの上に堆積させる工程を含んでいてもよい。従来のフォトリソグラフィ法を使用して、ハードエッチマスク内にブルズアイパターンを作る（動作11-1003及び動作11-1005）。ブルズアイパターンをその後、エッチング、例えば反応イオンエッチング法を使用して、下の SiO_2 層に転写し、同心円回折格子を形成する。同心円回折格子の厚さは、何れの適当な厚さとすることもできる。図11-4に示される実施形態において、エッチングの深さは約80nmである。従来の技術を使用して、レジストとエッチマスク残留物を剥離し（動作11-1009）、同心円回折格子の表面を洗浄する。層11-1012のナノアパーチャは、リフトオフ又はエッチプロセスを使用して同心円回折格子の上に直接製造してもよい（動作11-1011）。他の実施形態において、同心円回折格子とナノアパーチャとの間にその他の層を堆積させてもよい。

【0442】

あるいは、いくつかの実施形態において、ナノアパーチャは同心円回折格子の中央に位置付けてもよい。このようなナノアパーチャの正確な配列は、何れの適当な方法で実現してもよい。図11-5に示されている実施形態において、ナノアパーチャの位置決めは、セルフアライン式製造プロセスを使用して実現される。第一の工程は、上述の技術にしたがって同心円回折格子を形成する工程を含んでもよい。しかしながら、図11-5においては、Tiハードエッチマスク11-1114がSiO₂基板11-1110の上に堆積される（動作11-1101）。エッチング、例えば反応イオンエッチングを使用してブルズアイパターンをTi層に転写する（動作11-1103及び動作11-1105）。レジスト層11-1120と反射防止コーティング層11-1122をTi層内の2つの中心ギャップの上に堆積させて、ギャップと中央Tiピラーを被覆する。その後、従来のエッチング法を使用してブルズアイパターンをSiO₂基板に転写し、同心円回折格子を形成する（動作11-1107）。次に、例えば過酸化水素を使った異方性ウェットエッチングを使用してTi層を除去する（動作11-1109）が、中央Tiピラー11-1116は所定の場所に残す。その後、従来の方法を使用してレジスト層を剥離する。次に、同心円回折格子とTiピラーの上に金属ナノアパーチャ層を堆積させる（動作11-1111）。最後に、リフトオフプロセスを使用して金属キャップされたTiピラーを除去し、同心円回折格子に関して正確に中心に置かれたナノアパーチャを残す。

【0443】

ナノアパーチャの正確な配列は、その他の様々な方法で実現されてもよい。図11-6に示される実施形態において、ナノアパーチャの位置決めは、代替的なセルフアライン製造プロセスを使用して実現される。第一の工程（11-1201）は、Alナノアパーチャ層11-1212をSiO₂同心円回折格子の基板11-1210の上に直接堆積させる工程を含んでもよい。次に、ハードエッチマスク11-1214をAl層の上に堆積させてもよい。図11-6に示される実施形態において、Tiが使用されているが、フォトリソグラフィプロセスと適合可能な何れの材料が使用されてもよい。従来のエッチング法を使用してブルズアイパターンをTi及びAl層に転写する（動作11-1203及び11-1205）。レジスト層11-1220と反射防止コーティング層11-1222をTi及びAl層内の中心のギャップの上に堆積させて、ナノアパーチャが形成される位置を被覆する。その後、従来のエッチング法を使用してSiO₂基板にブルズアイパターンを転写し（動作11-1207）、同心円回折格子を形成する。Ti及び第一のAl層の上に追加の金属層を堆積させ（動作11-1209）、それによって金属がSiO₂層の空洞を埋め、Ti層とレジスト層を被覆する。図11-6に示される実施形態において、Alは追加の金属層として使用されているが、フォトリソグラフィプロセスと適合可能な他の金属が使用されてもよい。最後に、リフトオフプロセスを使用して金属でキャップされたレジストピラー11-1230を除去し（動作11-1211）、同心円回折格子に関して正確に中心に置かれたナノアパーチャを残す。

C. レンズ製造プロセス：屈折レンズ

屈折レンズアレイは、ナノアパーチャに励起を集中させ、それからの放出光を収集する効率を改善するために、何れの適当な方法で作られてもよい。いくつかの実施形態において、屈折レンズアレイは、レンズアレイ上の「デッドゾーン」を最小限にするための「ギャップレス」アレイであってもよい。図11-7に示される実施形態において、屈折マイクロレンズアレイが、個々のレンズ間にギャップがないように示されている。いくつかの実施形態において、「ギャップレス」アレイを製造する工程は2つのエッチング工程を含んでもよい。第一のエッチング（動作11-1801）は、マイクロレンズトポグラフィの深さを決定してもよい。第二のエッチング（動作11-1803）は、第一のエッチングをたどり、個々のマイクロレンズ間の平坦なギャップを除去してもよく、それによって1つのレンズは端で終了し、そこから別のレンズが始まる。第一及び第二のエッチングの合計は、焦点距離を画定する。図11-8に示される実施形態において、マイクロレンズアレイの、第一のHFエッチングの後（1）、第二のHFエッチングの後（2）、マイクロレンズがより高屈折率の材料である窒化シリコンでコーティングされた後（3）、

10

20

30

40

50

及び高屈折率の材料が研磨され、平坦化された後（４）の上面図が示される。

【０４４４】

屈折レンズアレイ内の各屈折レンズは、何れの適当な方法で製造してもよい。ある例示的な屈折レンズアレイが図１１－９に示されており、ナノアパーチャ層１１－２００７は、基板１１－２００５の上にある誘電レンズ層１１－２００３の上にある透明スペーサ層１１－２００１の上に製造される。いくつかの実施形態において、屈折レンズは、標準的なフォトリソグラフィプロセス及びエッチング法を使用して製造してもよい。 SiO_2 又は窒化シリコン等、何れの適当な誘電材料を屈折レンズの形成に使用してもよい。図１１－１０に示される実施形態において、窒化シリコンは SiO_2 基板トポグラフィに充填するために使用される。製造プロセス内の第一の工程１１－２１０１は、ハードエッチマスクを SiO_2 基板１１－２１１０の上に直接堆積させる工程を含んでいてもよい。 SiO_2 層に使用されるものと同じエッチングプロセス中に溶解しない、何れの適当な金属をハードエッチマスク１１－２１１４に使用してもよい。例えば、図１１－１０にはCrが示されているが、他の金属も使用可能である。次の工程は、フォトレジスト層１１－２１２０をCrハードエッチマスクの上に形成する工程を含んでいてもよい。従来のフォトリソグラフィ法を使用してハードエッチマスクに円形パターンを作る。その後、従来のエッチング法、例えば反応イオンエッチング法を使用して下のCr層に円形パターンを転写する。 SiO_2 層は、 SiO_2 はエッチングできるがハードエッチマスクはエッチングできない何れかの適当な選択的エッチング法を使用してエッチングされる。例えば、HFを用いる等方性ウェットエッチングを使用して、 SiO_2 層に凹面を作る。その後、従来のエッチング法を使用してCr層を除去する。任意選択により、HFを使用する第二のウェットエッチングを実行して、レンズ間のギャップを除去する。屈折レンズを作るために、 SiO_2 層のキャビティを高屈折率材料層１１－２１１８、例えば窒化シリコンで埋める。最後に、レンズの上面を、例えば化学機械的研磨等の従来の方法を使用して平坦化する。スペーサ層１１－２１２４を窒化シリコン層の上に堆積させてもよい。例えば、オルモサー（ORMOCER）（商標）のスペーサ層を窒化シリコン層の上にスピコートしてもよい。あるいは、 SiO_2 層を堆積させてもよい。ナノアパーチャを、屈折レンズの上に直接製造してもよい。他の実施形態において、屈折レンズとナノアパーチャとの間に他の層を堆積させてもよい。

【０４４５】

あるいは、各屈折レンズは反射防止層を含んで、光学的効率がさらに改善されるようにしてもよい。いくつかの実施形態において、反射防止層はレンズの底面、上面、又は全ての側面を被覆してもよい。まず、 SiO_2 キャビティ１１－２２１０を SiO_2 層にエッチングする（動作１１－２２０１）。図１１－１１に示される実施形態において、反射防止層１１－２２２２をエッチングされた SiO_2 キャビティ１１－２２１０の上に堆積させ（動作１１－２２０３）、その後、キャビティを窒化シリコン層１１－２２１８で埋める（動作１１－２２０５）。窒化シリコン層を、CMPを介して研磨し（動作１１－２２０７）、第二の反射防止層１１－２２２６を研磨された窒化シリコン層の上に堆積させる（動作１１－２２０９）。反射防止層の上には、追加の層、例えば上述し、図１１－１１で層１１－２２２４として示されているスペーサ層を堆積させてもよい。反射防止層は、以下のパラメータを有していてもよい：屈折率 $n_c = \sqrt{(n_{\text{oxide}} \cdot n_{\text{nitride}})} = \sqrt{(1.46 \cdot 1.91)} = 1.67$ ；屈折率範囲 $1.67 \sim 1.75$ ；及び厚さ $t = \lambda / (4 \cdot n_c) = 675 \text{ nm} / (1.670 \cdot 4) = 101.1 \text{ nm}$ 。反射防止層は何れの適当な方法で堆積させてもよい。例えば、PECVDを使用してもよい。あるいは、LPCVDを使用してもよい。

D. レンズ製造プロセス：フレネルレンズ

回折光学素子（DOE）は何れの適当な形状であってよく、CMOSセンサ上での集光と発光光子の選別を改善するための何れの適当な方法で製造されてもよい。いくつかの実施形態において、DOEはフレネルレンズの一部を含んでいてもよい。図１１－１２～１１－１９に示されるように、DOE １１－２３０１はフレネルレンズの中心からずれた

正方形部分として特徴付けられる。図11-13に示されるように、DOEは2つのユニットセル層を含んでもよく、第一の層11-2401は「小型の」特徴を含み、第二の層11-2403は「大型の」特徴を含む。ユニットセル層は、何れの適当なピッチを有していてもよく、さらに、フレネルレンズの光学設計に応じて異なるピッチを有していてもよい。図11-13の例に示されているように、小型のDOE層のピッチは220nmであり、大型のDOE層のピッチは440nmである。大型のDOE層は小型のDOE層の上に重なっていてもよく（又はその逆もあり）、多層回折光学系が形成される。図11-13は、オフセットフレネルアレイ11-2405の一例を示し、大きい位置合わせマークがオフセットフレネルレンズを取り囲む。それに加えて、オフセットフレネルアレイは、集光及び発光のセンサのスペクトル分離を提供するようにセンサの上に位置付けられ得る。

10

【0446】

あるいは、回折光学素子（DOE）は、ナノアパーチャの下に埋め込まれてもよく、それによって励起エネルギーのナノアパーチャへの集束とそれからの発光の回収が改善される。いくつかの実施形態において、ナノアパーチャの下に埋め込まれたフレネルレンズとセンサの上方に位置付けられたオフセットフレネルレンズは可変的な周期と可変的なステップサイズの段階的構造を有していてもよい。他の実施形態において、センサの上方に位置付けられたオフセットフレネルレンズのみが、可変的な周期と可変的なステップサイズを有していてもよい。これらの回折レンズは、標準的なフォトリソグラフィプロセス及びエッチング技術を使用して製造されてもよい。図11-14に示されているように、回折レンズパターン11-2501は、大きいステップ（大型パターン）と、より大きいステップの各々の上の小さいステップ（小型パターン）を含み、それらの周期が左から右に見たときに減少するような段階的構造を有することによって特徴付けられる。可変的な周期のステップ付回折レンズの製造プロセスは、図11-16に示されるように、大きいステップを最初にエッチングし、その後、小さいステップをエッチングする工程を含んでもよく、これは第二のエッチング中に大きいステップの隅部を保護できる。代替的な方法では、図11-15に示されるように、まず平坦な基板上に小さいステップをエッチングし、その後大きいステップをエッチングする。回折レンズの充填層と段階的な層を形成するために、 SiO_2 又は窒化シリコン、 TiO_2 又は Ta_2O_5 等の何れの適当な誘電材料が使用されてもよい。図11-15に示される実施形態において、窒化シリコンが充填層の製作に使用され、 SiO_2 が段階的な層の製作に使用される。

20

30

【0447】

段階的な SiO_2 層の製造プロセスの第一の工程は、ハードエッチマスク11-2614を SiO_2 層11-2610の上に直接堆積させ、その後、反射防止層11-2622、その後、フォトレジスト層11-2620を堆積させる工程を含んでもよい。ハードエッチマスクには何れの適当な材料が使用されてもよい。例えば、図11-15に示されるハードエッチマスクにはa-Siが使用されてもよいが、他の材料も使用可能である。次の工程は、a-Siハードエッチマスクの上にARC及び／又はフォトレジスト層を形成する工程を含んでもよい。従来のフォトリソグラフィ法が可変的な周期の大型バイナリパターンを製作するために使用されてもよい。パターンを、従来のエッチング法、例えば反応イオンエッチング法を使用して下のSi層に転写する。

40

【0448】

大きい回折レンズ工程のエッチの深さは、所望の焦点距離を実現する何れの適当な深さとすることもできる。図11-16に示される実施形態において、 SiO_2 層へのこのエッチング深さは、大きいステップについて約684nmである。次に、従来の技術を使用して、レジストとエッチングマスクの残留物を剥離し（動作11-2605）、 SiO_2 層の表面を洗浄する。次の工程は、大きいステップの各々に小さいステップをエッチングする工程を含んでもよい。図11-16に示される実施形態において、大きいステップの各々は、4つのより小さいステップを含む。

【0449】

50

次に、パターニングされた SiO_2 層11-2610の上に第二の Si ハードエッチマスク11-2644を堆積させる。次に、ARC層11-2642を Si 層11-2610の上に堆積させ、続いてフォトリソエッチマスク層11-2640を堆積させる。第二の可変的周期の小型バイナリパターンを、フォトリソ及び／又はARC層に転写する。図11-16に示される実施形態において、製造工程は図11-15に示されているものと同様であるが、1つの大きいステップにつき2つの小さいステップがエッチングされ、全部で4つのステップができる。他の実施形態においては、何れの数のステップが使用されてもよい。次に、小さいステップを SiO_2 層11-2710にエッチングする。小さい回折レンズステップの厚さは、何れの適当な厚さとしてもできる。図11-16に示される実施形態において、 SiO_2 層へのエッチング深さは小さいステップについて約342 nmである。次に従来の技術を使用してレジストを剥離し、 SiO_2 層の表面を洗浄する。

10

【0450】

製造プロセスでは、段階的な SiO_2 層11-2810の製作後の追加のステージは、例えば窒化シリコン等、何れかの適当な高屈折率レンズ材料11-2818でキャビティを充填し、図11-17~11-18に示されるような「埋め込み型フレネルレンズ」を作る工程を含んでもよい。「埋め込み型フレネルレンズ」に使用される段階的構造は、オフセットフレネルレンズに使用される段階的構造と略同じ、及び／又はそれより小さい特徴物を有していてもよい。例えばPECVD等、窒化シリコンを堆積させる何れの方法が使用されてもよい。任意選択により、窒化シリコン層を SiO_2 材料の最上ステップが露出するまで均一に研磨してもよい。あるいは、窒化シリコン層11-2818を均一に研磨するが、 SiO_2 材料は露出させない。図11-18に示される実施形態において、次に、PECVDを介して研磨された窒化シリコン層11-2918上に SiO_2 の第二の層11-2928を堆積させ、CMPを介して研磨する。いくつかの実施形態において、スペーサ層11-2928の厚さはスペーサ層材料中の焦点距離と等しくてもよい。これに加えて、窒化シリコン層の上に他の適当な透明スペーサ層を堆積させてもよい。その後、透明スペーサ層及び／又は追加の層の上にナノアパーチャ層を製造してよい。

20

【0451】

あるいは、図11-19に示される実施形態において、回折レンズのための段階的層11-3018は窒化シリコンで製作される。窒化シリコン層11-3018は、基板11-3010の上に何れの適当な厚さで堆積してもよく、その後、エッチングマスク11-3014、ARC層11-3022、及びフォトリソ層11-3020が続く。図11-19に示される実施形態において、窒化シリコン層は厚さ約1 μm である。製造プロセスは、 SiO_2 中に段階的で可変的周期の回折レンズ層を製作することに関して上述したものと同様であってもよい。任意選択により、異なるハードマスクを使用して窒化シリコンの段階的層を製作してもよい。窒化シリコンの段階的層は、 SiO_2 段階層と略同じ、及び／又はそれより小さい大きさの特徴物を有していてもよい。窒化シリコンの段階層を作った後、窒化シリコン層を何れの適当な誘電材料11-3028でコーティングしてもよい。図11-19に示される実施形態において、窒化シリコン層を SiO_2 層11-3028でコーティングする。 SiO_2 層は、例えばPECVD等の従来の堆積プロセスを使用して堆積させてもよい。その後、 SiO_2 層を研磨して平坦な平面を作ってもよい。その後、ナノアパーチャ層を SiO_2 層及び／又は追加の層の上に製造してもよい。

30

40

【0452】

回折光学系の特定の特徴は、所望の光学特性を有する構造を得るために、製造プロセス中にある程度の均一性及び／又は精度が必要となり得る。例えば、大型及び小型の段差のエッチング深さには、特定の精度が必要となり得る。いくつかの実施形態において、焦点ナノアパーチャ内に所望のパワー効率を実現するために、標的の50又は10%以内のエッチング深さが必要であり得る。これに加えて、レンズ特徴物のエッチングには、特定の程度の均一性が必要であり得る。例えば、所望の焦点距離を実現するために、5%（又は50 nm）以内のエッチング均一性が必要である。

50

【0453】

上述のレンズの何れも、改善された光学特性を作り出すために、何れの適当な堆積及びエッチングプロセスを使用して製造されてよい。例えば、非限定的にPECVDが使用されてもよい。堆積パラメータは、自己発光を減少させ、発光のレンズ吸収を減少させ、及び／又は高い屈折率にするために、何れの適当な方法で調整されてもよい。例えば、窒化シリコン堆積中に、自己発光とレンズ吸収の低減化は、シリコンナノ結晶を形成し得るSi-Si結合の密度を低下させることによって実現されてもよい。いくつかの実施形態において、入力ガスとそれらの比は、Si-Si結合とシリコンナノ結晶の密度を低下させるために変化させてもよい。例えば、SiH₄とN₂が使用されてもよく、その比は、Siナノ結晶の密度を低下させるために何れの適当な方法で調整されてもよい。他の実施形態において、SiH₄とNH₃が使用されてもよく、それらの比は、Si-Si結合とシリコンナノ結晶の密度を低下させるための何れの適当な方法で調整されてもよい。例えば、NH₃対SiH₄の比は少なくとも10:1であってもよい。それに加えて、PECVD中のプラズマを制御する周波数の調整を利用して光学特性を改善してもよい。例えば、低周波数（例えば、0.5MHz以下）対高周波数（例えば、約10MHz）の比は少なくとも1:1であってもよい。

10

【0454】

それに加えて、上述の堆積パラメータにより、光学特性を改善するようにレンズ屈折率が調整されてもよい。いくつかの実施形態において、適当な低自己発光効果及び／又は適当な低吸収損失のために、窒化シリコンレンズの屈折率は $n = 1.92$ 未満で、波長633nmに関連付けられていてもよい。上述のように調整される品質は、相互に関係し、比例し、関連し、関連付けられ、及び／又は依存していてもよい。例えば、窒化シリコン製のレンズの場合、 $n = 1.92$ の屈折率は、低発光及び低吸収損失を示し、これはSi-Si結合とシリコンナノ結晶の低密度に関係する。

20

X. 結論

ここまで本発明の少なくとも1つの実施形態のいくつかの態様を説明したが、様々な変更形態、改良形態、及び改善形態が当業者にとって容易に着想されるであろう。

【0455】

このような変更形態、改良形態、及び改善形態は本開示の一部とされるものとし、本発明の趣旨及び範囲に含められるものとする。さらに、本発明の利点が示されているが、本発明の全ての実施形態が記載されている全ての利点を含むとはかぎらないと理解すべきである。いくつかの実施形態は、本明細書において、及びいくつかの例において有利であると記載されている何れの特徴も実現しないことがあり得る。したがって、上述の説明と図面は例にすぎない。

30

【0456】

本発明の上述の実施形態は、様々な方法の何れかで実施できる。例えば、実施形態は、ハードウェア、ソフトウェア、又はその組合せを使用して実施されてよい。ソフトウェアで実施される場合、ソフトウェアコードは何れの適当なプロセッサ又はプロセッサの集合によっても実行でき、これらは1台のコンピュータ内に提供されても、複数のコンピュータ内に分散されてもよい。このようプロセッサは集積回路として実施されてもよく、1つ又は複数のプロセッサが集積回路コンポーネント内にあり、これには当技術分野においてCPUチップ、GPUチップ、マイクロプロセッサ、マイクロコントローラ、又はコプロセッサとの名称で知られる市販の集積回路コンポーネントが含まれる。あるいは、プロセッサは、ASIC等のカスタム回路、又はプログラマブルロジックデバイスを構成することから得られるセミカスタム回路で実装されてもよい。また別の代替案として、プロセッサは、より大規模の回路又は半導体デバイスの一部であってもよく、これは市販されているか、セミカスタムか、カスタムかを問わない。具体的な例として、いくつかの市販のマイクロプロセッサは、複数のコアを有し、これらのコアの1つ又はサブセットがプロセッサを構成してもよい。しかしながら、プロセッサは、何れの適当なフォーマットの回路を使用して実装されてもよい。

40

50

【0457】

さらに、コンピュータは何れの任意の適当な数の形態で実施されてもよく、例えばラックマウント式コンピュータ、デスクトップコンピュータ、ラップトップコンピュータ、又はタブレットコンピュータがある。それに加えて、コンピュータは、一般にはコンピュータとみなされないが適当な処理能力を備える装置、例えば、携帯情報端末（PDA）、スマートフォン、又は任意のその他の適当な携帯式又は固定式電子機器に埋め込まれてもよい。

【0458】

またコンピュータは、1つ又は複数の入力及び出力装置を有していてもよい。これらの装置は、例えば、ユーザインタフェースを提供するために使用できる。ユーザインタフェースを提供するために使用できる出力装置の例には、出力の視覚的提示のためのプリンタ又は表示スクリーン及び出力の聴覚的提示のためのスピーカ又はその他の音声発生装置が含まれる。ユーザインタフェースのために使用可能な入力装置の例には、キーボード、及びマウス、タッチパッド、デジタイジングタブレット等のポインティングデバイスが含まれる。他の例として、コンピュータは、音声認識を通じて、又はその他の聴覚的フォーマットで入力情報を受け取ってもよい。

10

【0459】

このようなコンピュータは、ローカルエリアネットワークやワイドエリアネットワークを含む、例えば企業ネットワーク又はインターネット等、何れの適当な形態の1つ又は複数のネットワークで相互接続されてもよい。このようなネットワークは、何れの適当な技術に基づいていてもよく、何れの適当なプロトコルにより動作してもよく、無線ネットワーク、ワイヤードネットワーク、又は光ファイバネットワークを含んでいてもよい。

20

【0460】

また、本明細書で概説する各種の方法又はプロセスは、ソフトウェアとしてコード化されてもよく、これは様々なオペレーティングシステム又はプラットフォームの何れを利用する1つ又は複数のプロセッサで実行可能である。それに加えて、このようなソフトウェアは、多数の適当なプログラミング言語及び／又はプログラミング又はスクリプティングツールの何れを使用して書かれてもよく、またフレームワーク又は仮想マシン上で実行される実行可能機械言語コード又は中間コードとして編集されてもよい。

【0461】

30

この点において、本発明はコンピュータ読取可能記憶媒体（又は複数のコンピュータ読取可能媒体）（例えば、コンピュータメモリ、1つ又は複数のフロッピディスク、コンパクトディスク（CD：compact disc）、光ディスク、デジタルビデオディスク（DVD：digital video disk）、磁気テープ、フラッシュメモリ、フィールドプログラマブルゲートアレイ又はその他の半導体装置の回路コンフィギュレーション、又は他の有形コンピュータ記憶媒体）として、1つ又は複数のコンピュータ又はその他のプロセッサにより実行されたときに、上述の本発明の各種の実施形態を実施する方法を実行する1つ又は複数のプログラムでコード化されたものとして具現化されてもよい。上述の例から明らかであるように、コンピュータ読取可能記憶媒体は、非一時的な形態のコンピュータ実行可能命令を提供するのに十分な時間にわたり情報を保持してもよい。このようなコンピュータ読取可能記憶媒体はトランスポート可能であり、それによってその上に記憶されたプログラムは、1つ又は複数の異なるコンピュータ又はその他のプロセッサにロードして、上述の本発明の各種の態様が実施されるようにすることができる。本明細書中で使用されるかぎり、「コンピュータ読取可能記憶媒体」という用語は、製造されたと考えることのできるコンピュータ読取可能媒体（すなわち、製品）又は機械を包含する。その代わりに、又はそれに加えて、伝播信号等、コンピュータ読取可能記憶媒体以外のコンピュータ読取可能媒体として具現化されてもよい。

40

【0462】

「プログラム」又は「ソフトウェア」という用語は、本明細書においては包括的な意味で使用され、上述の本発明の各種の態様を実施するようにコンピュータ又はその他のプロ

50

セッサをプログラムするために使用可能なあらゆる種類のコンピュータコード又はコンピュータ実行可能命令セットを指す。それに加えて、本実施形態の1つの態様によれば、実行されたときに本発明の方法を実施する1つ又は複数のコンピュータプログラムは、1つのコンピュータ又はプロセッサ内にある必要はなく、多数の異なるコンピュータ又はプロセッサ間でモジュール式に分散されて、本発明の各種の態様を実施してもよいと理解すべきである。

【0463】

コンピュータ実行可能命令は、1つ又は複数のコンピュータ又はその他の装置により実行されるプログラムモジュール等、様々な形態をとってもよい。一般に、プログラムモジュールは、特定のタスクを実行し、又は特定の抽象データタイプを実施するルーチン、プログラム、オブジェクト、コンポーネント、データ構造等を含む。

10

【0464】

また、データ構造は、コンピュータ読取可能媒体内に何れの適当な形態で保存されてもよい。説明を簡単にするために、データ構造は、データ構造内の場所を通じて関係付けられるフィールドを有するように示されていてもよい。このような関係は同様に、フィールドに関する記憶を、フィールド間の関係を伝えるコンピュータ読取可能媒体内の場所に割り当てることによって実現されてもよい。しかしながら、何れの好適なメカニズムを使用してデータ構造のフィールド内の情報間の関係を確立してもよく、これにはポインタ、タグ、又はデータ要素間の関係を確立するその他のメカニズムの使用を通じたものも含まれる。

20

【0465】

本発明の各種の態様は、単独でも、組合せでも、又は上述の実施形態で具体的に論じられていない様々な構成でも使用されてよく、したがって、その応用において、上述の説明に記載され、図面に示されている構成要素の詳細と配置に限定されない。例えば、1つの実施形態に記載されている態様は、他の実施形態に記載されている態様と何れの方法で組み合わせてもよい。

【0466】

また、本発明は方法として具現化されてもよく、その一例を提供した。方法の一部として実行される動作は、何れの適当な方法で順番付けられてもよい。したがって、実施形態は、動作が図と異なる順序で実行されると解釈されてもよく、これには、例示的な実施形態において逐次的動作として示されていても、いくつかの動作を同時に実行することが含まれてもよい。

30

【0467】

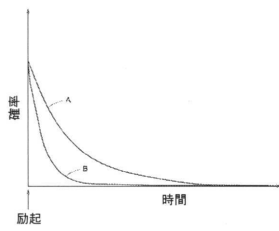
特許請求中に「第一の」、「第二の」、「第三の」等の序数を、請求要素を変更するために使用することは、それ自体が1つの請求要素の他の要素に対するいかなる優先性、優位性、又は順序もしくは方法の動作が実行される時間的な順序を暗示しておらず、単に特定の名称を有する1つの請求要素を同じ名称（序数の使用を除く）を有する他の要素と区別して、請求要素を区別するためのラベルとして使用されるにすぎない。

【0468】

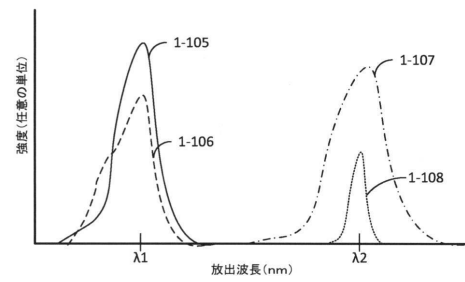
また、本明細書で使用される語句及び用語は、説明を目的としており、限定的とみなすべきではない。「包含する」、「含む」、又は「有する」、「含有する」、「伴う」及びその変化形の使用は、その後に挙げられる用語及びその均等物ならびに追加の項目を包含するものとする。

40

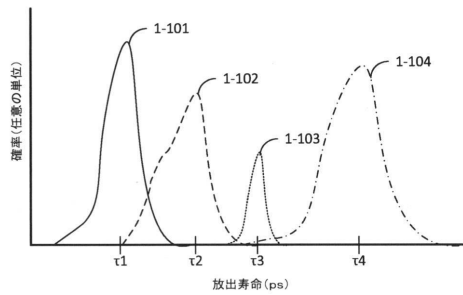
【図 1 - 1】



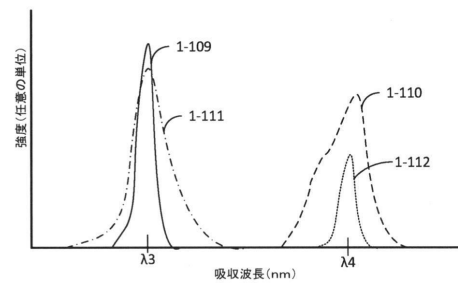
【図 1 - 2 B】



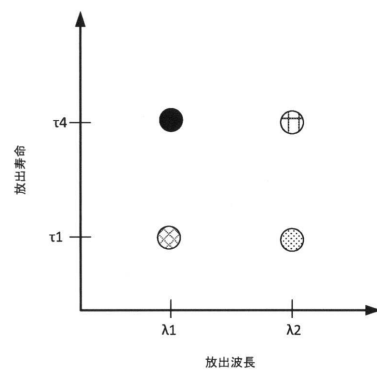
【図 1 - 2 A】



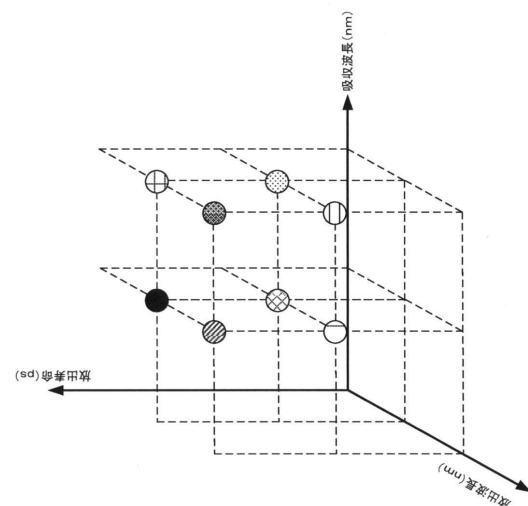
【図 1 - 2 C】



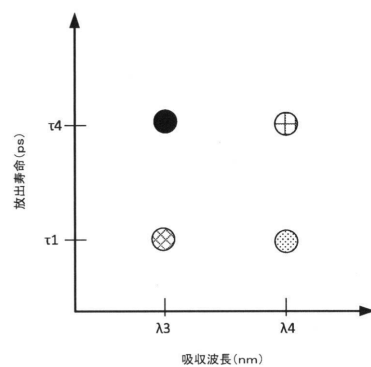
【図 1 - 3 A】



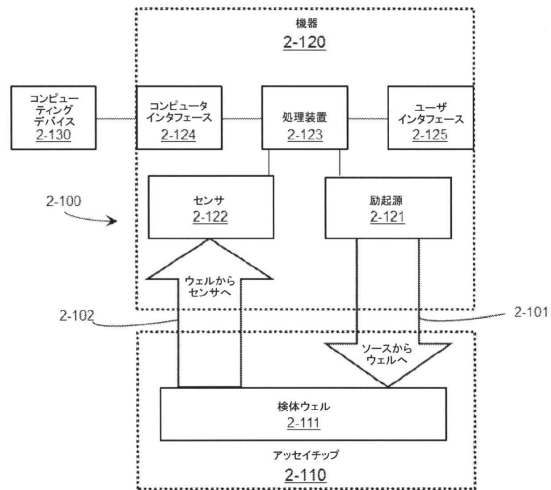
【図 1 - 4】



【図 1 - 3 B】



【図 2 - 1】



【図 2 - 2】

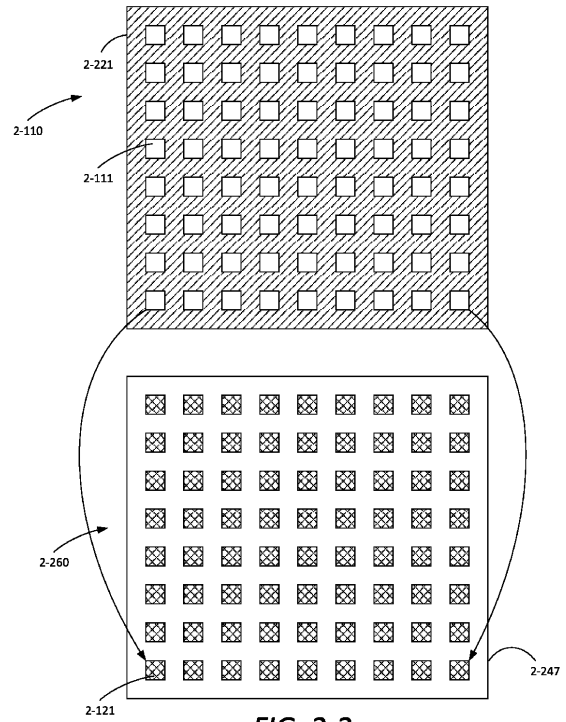
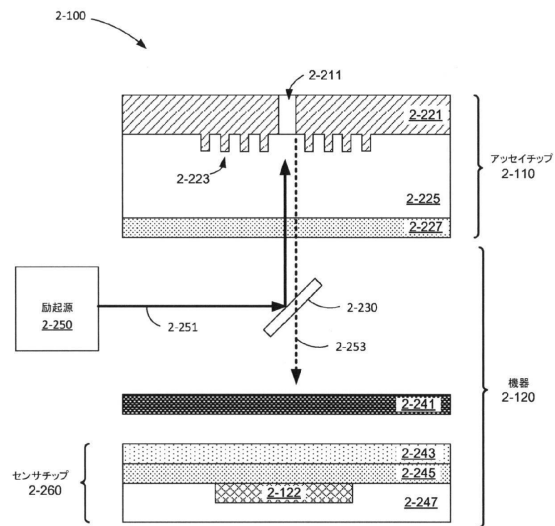


FIG. 2-2

【図 2 - 3】



【図 2 - 4】

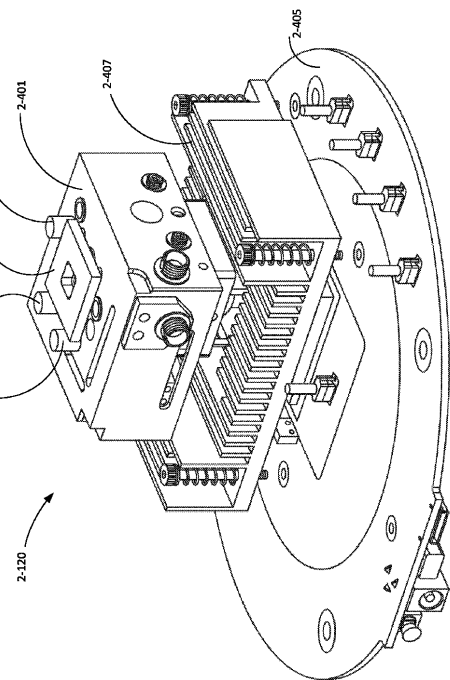


FIG. 2-4

【図 3 - 1 A】

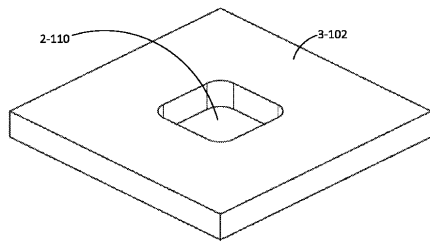


FIG. 3-1A

【図 3 - 1 B】

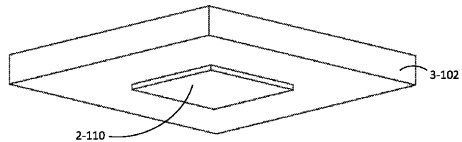


FIG. 3-1B

【図 3 - 1 C】

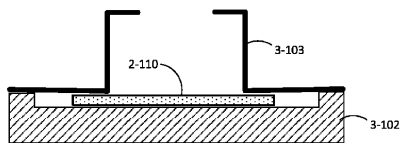


FIG. 3-1C

【図 3 - 4】

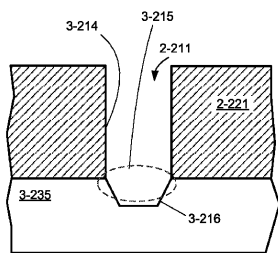


FIG. 3-4

【図 3 - 2】

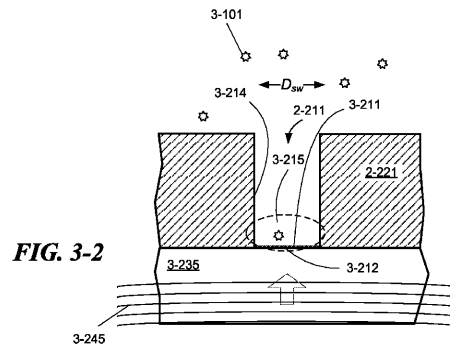
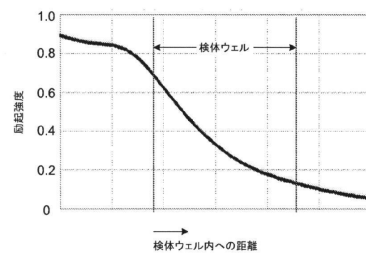


FIG. 3-2

【図 3 - 3】



【図 3 - 6】

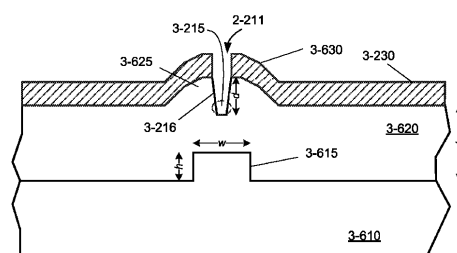
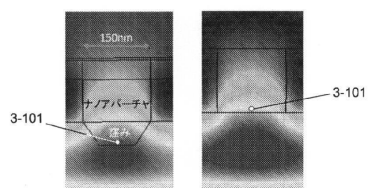
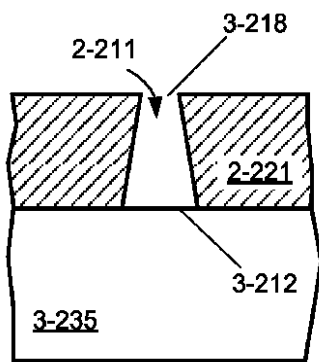


FIG. 3-6

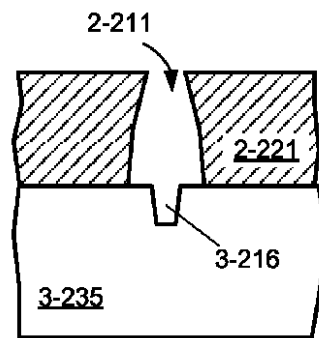
【図 3 - 5】



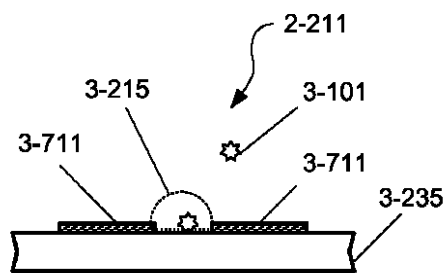
【図 3 - 7 A】

**FIG. 3-7A**

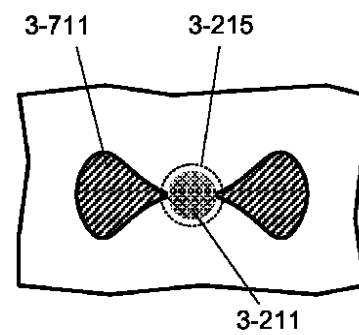
【図 3 - 7 B】

**FIG. 3-7B**

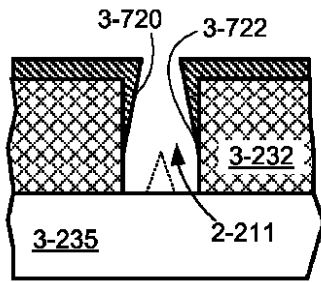
【図 3 - 7 C】

**FIG. 3-7C**

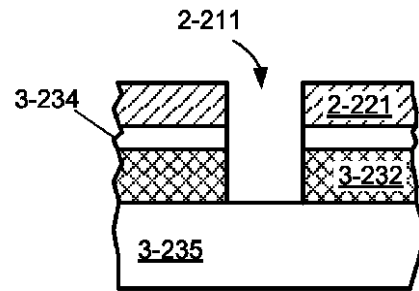
【図 3 - 7 D】

**FIG. 3-7D**

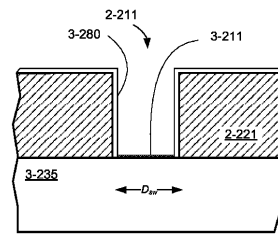
【図 3-7 E】

**FIG. 3-7E**

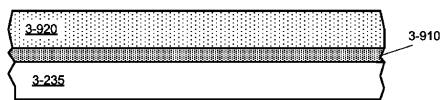
【図 3-7 F】

**FIG. 3-7F**

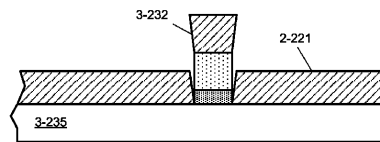
【図 3-8】

**FIG. 3-8**

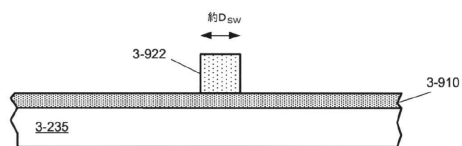
【図 3-9 A】

**FIG. 3-9A**

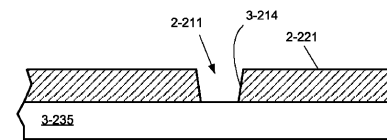
【図 3-9 D】

**FIG. 3-9D**

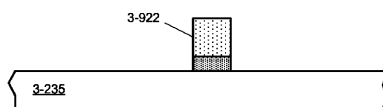
【図 3-9 B】



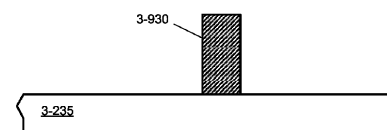
【図 3-9 E】

**FIG. 3-9E**

【図 3-9 C】

**FIG. 3-9C**

【図 3-9 F】

**FIG. 3-9F**

【図 3-10A】

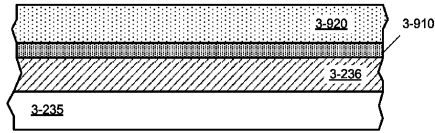
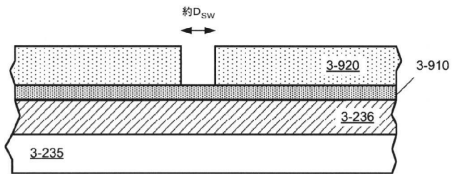


FIG. 3-10A

【図 3-10B】



【図 3-10C】

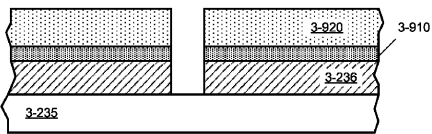


FIG. 3-10C

【図 3-13A】

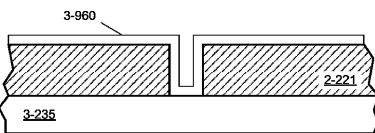


FIG. 3-13A

【図 3-13B】

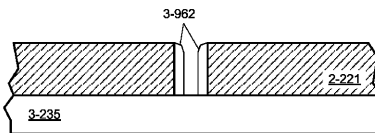


FIG. 3-13B

【図 3-13C】

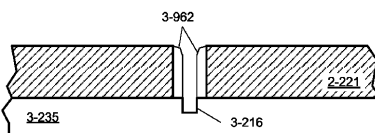


FIG. 3-13C

【図 3-10D】

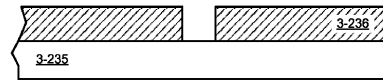


FIG. 3-10D

【図 3-11】

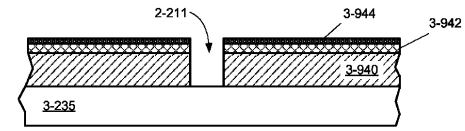


FIG. 3-11

【図 3-12】

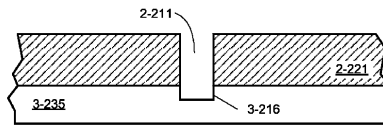


FIG. 3-12

【図 3-14A】

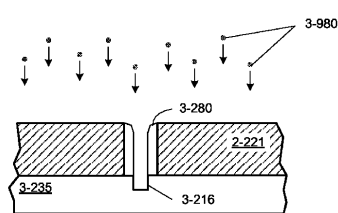


FIG. 3-14A

【図 3-14B】

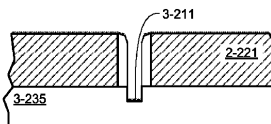
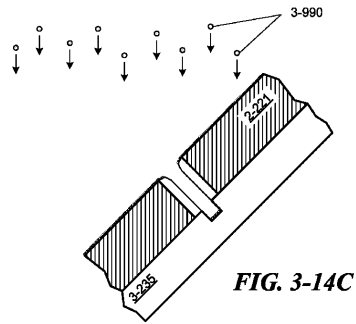
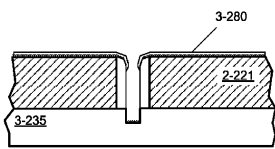


FIG. 3-14B

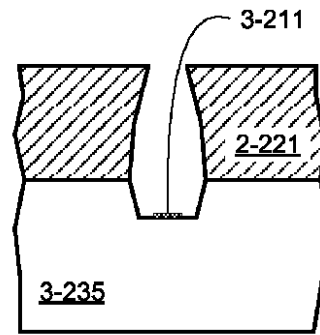
【図 3 - 1 4 C】



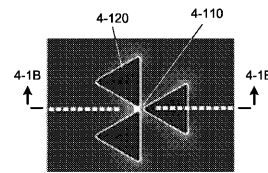
【図 3 - 1 4 D】



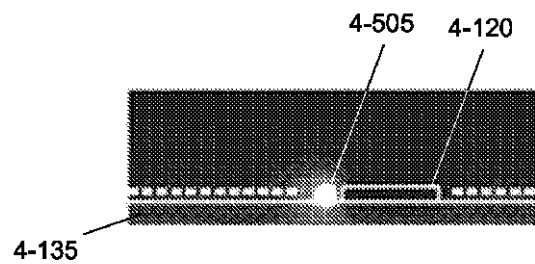
【図 3 - 1 5】



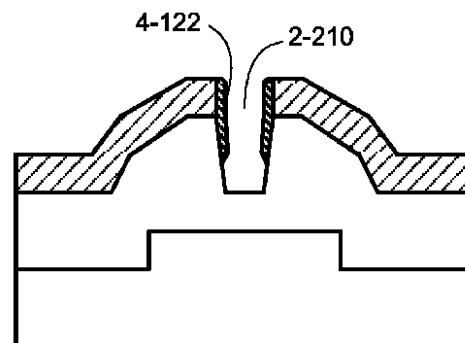
【図 4 - 1 A】



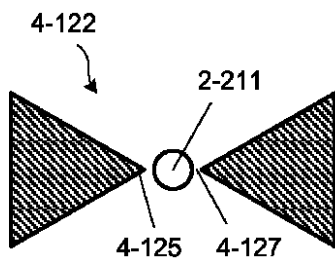
【図 4 - 1 B】



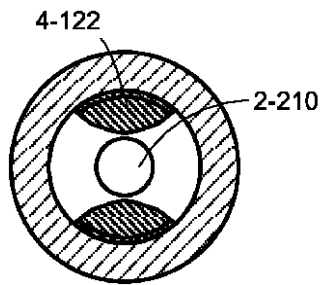
【図 4 - 1 D】



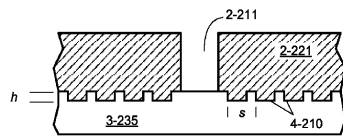
【図 4 - 1 C】



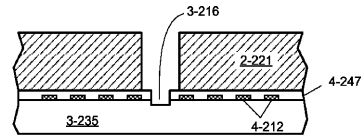
【図 4 - 1 E】

**FIG. 4-1E**

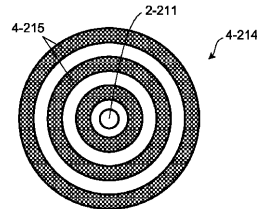
【図 4 - 2 A】

**FIG. 4-2A**

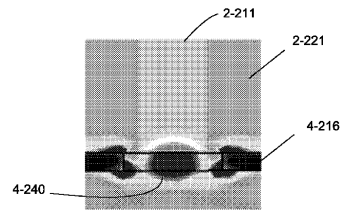
【図 4 - 2 B】

**FIG. 4-2B**

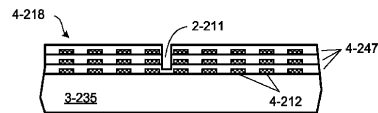
【図 4 - 2 C】

**FIG. 4-2C**

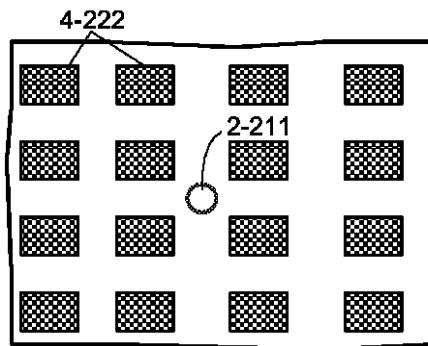
【図 4 - 2 D】

**FIG. 4-2D**

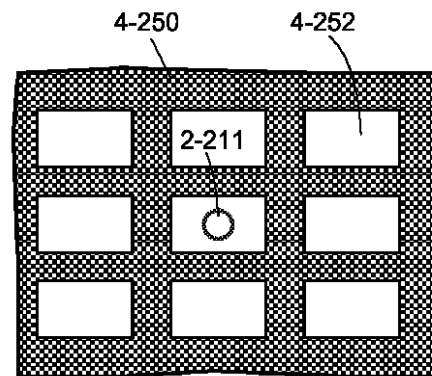
【図 4 - 2 E】

**FIG. 4-2E**

【図 4 - 2 F】

**FIG. 4-2F**

【図 4 - 2 G】

**FIG. 4-2G**

【図 4 - 2 H】

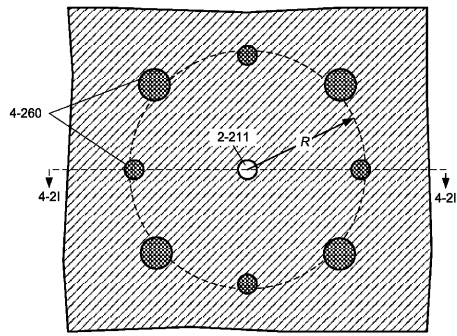


FIG. 4-2H

【図 4 - 2 I】

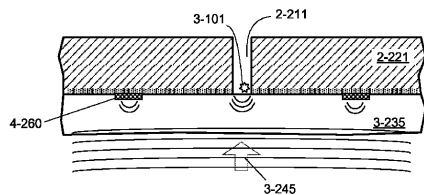


FIG. 4-2I

【図 4 - 3 A】

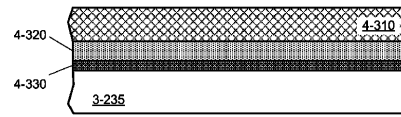


FIG. 4-3A

【図 4 - 3 B】

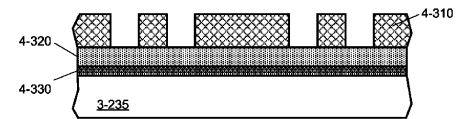


FIG. 4-3B

【図 4 - 3 C】



FIG. 4-3C

【図 4 - 3 D】



FIG. 4-3D

【図 4 - 3 E】

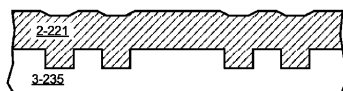


FIG. 4-3E

【図 4 - 4 C】

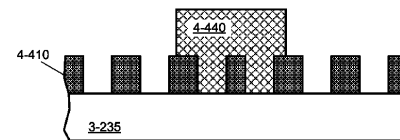


FIG. 4-4C

【図 4 - 4 A】



FIG. 4-4A

【図 4 - 4 D】

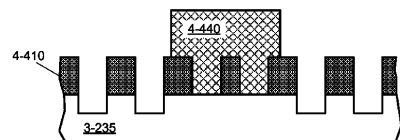


FIG. 4-4D

【図 4 - 4 B】

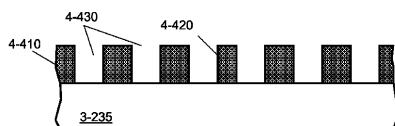


FIG. 4-4B

【図 4 - 4 E】

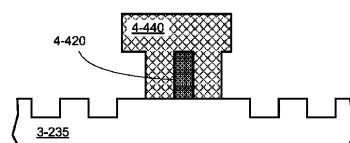


FIG. 4-4E

【図 4 - 4 F】

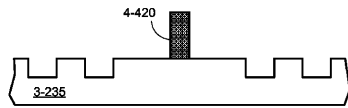


FIG. 4-4F

【図 4 - 4 G】

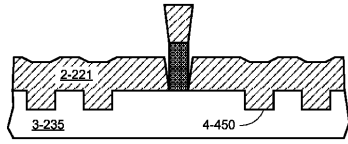


FIG. 4-4G

【図 4 - 5 A】

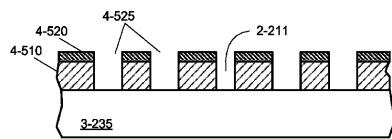


FIG. 4-5A

【図 4 - 5 E】

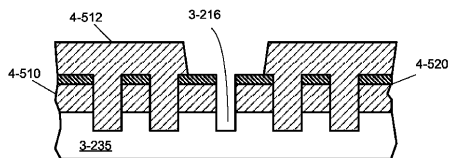


FIG. 4-5E

【図 4 - 6 A】

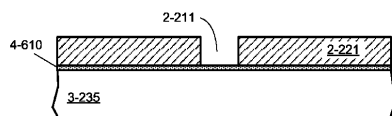


FIG. 4-6A

【図 4 - 6 B】

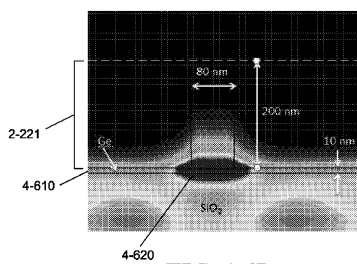


FIG. 4-6B

【図 4 - 5 B】

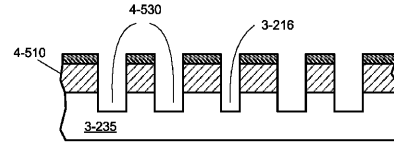


FIG. 4-5B

【図 4 - 5 C】

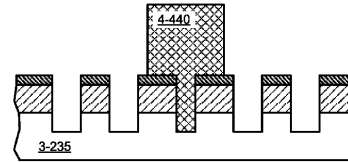


FIG. 4-5C

【図 4 - 5 D】

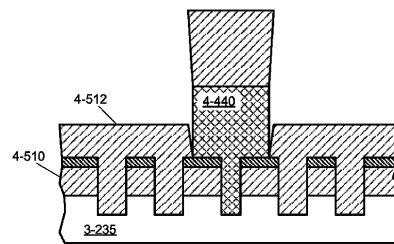
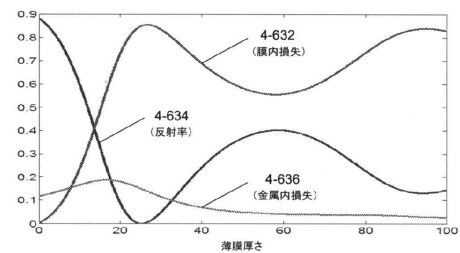


FIG. 4-5D

【図 4 - 6 C】



【図 4 - 6 D】

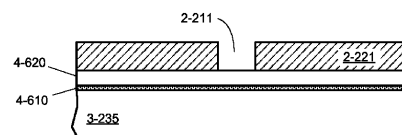


FIG. 4-6D

【図 4 - 6 E】

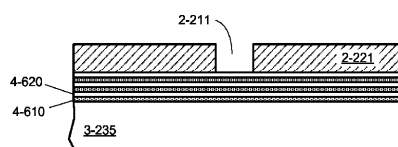


FIG. 4-6E

【図 4 - 7 A】

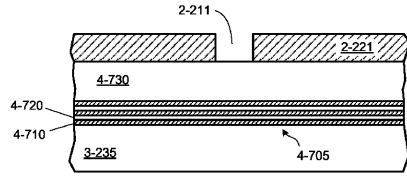


FIG. 4-7A

【図 4 - 7 D】

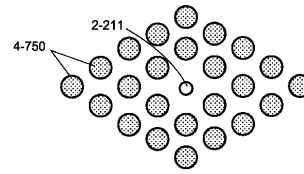


FIG. 4-7D

【図 4 - 7 B】

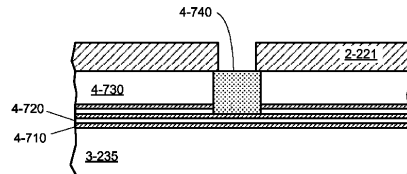


FIG. 4-7B

【図 4 - 8 A】

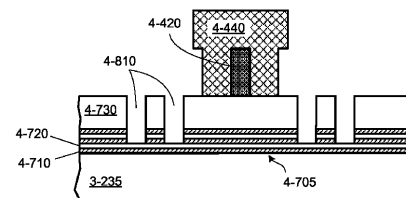


FIG. 4-8A

【図 4 - 7 C】

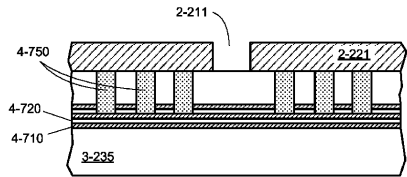


FIG. 4-7C

【図 4 - 8 B】

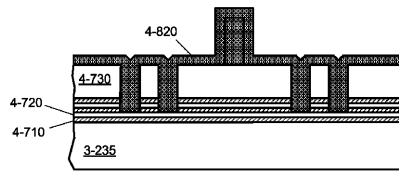


FIG. 4-8B

【図 4 - 8 C】

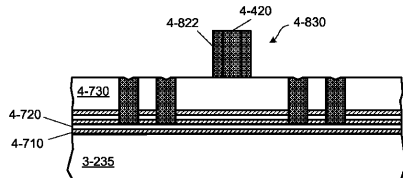


FIG. 4-8C

【図 4 - 8 F】

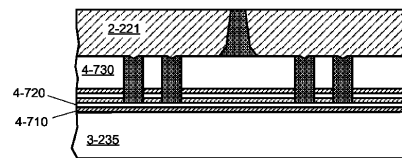


FIG. 4-8F

【図 4 - 8 D】

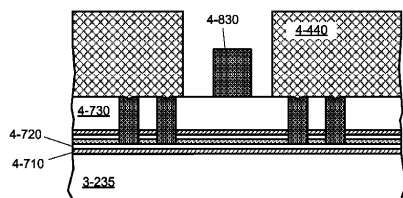


FIG. 4-8D

【図 4 - 8 G】

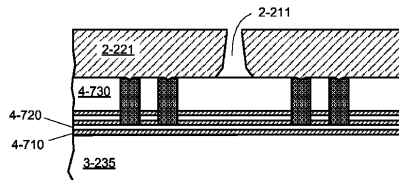


FIG. 4-8G

【図 4 - 8 E】

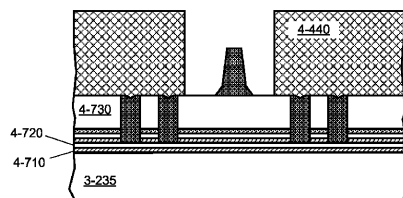


FIG. 4-8E

【図 4 - 9 A】

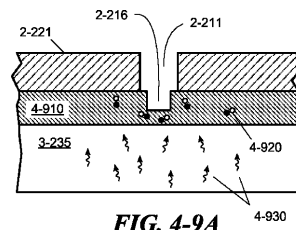
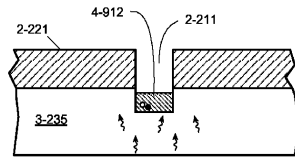
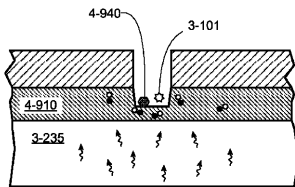


FIG. 4-9A

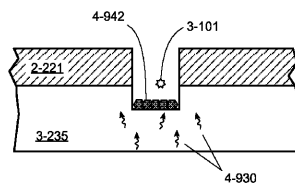
【図 4 - 9 B】

**FIG. 4-9B**

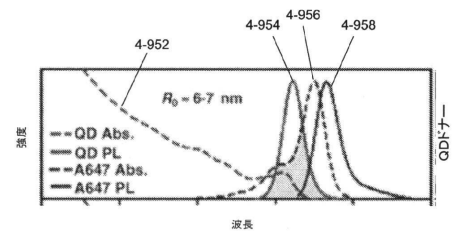
【図 4 - 9 C】

**FIG. 4-9C**

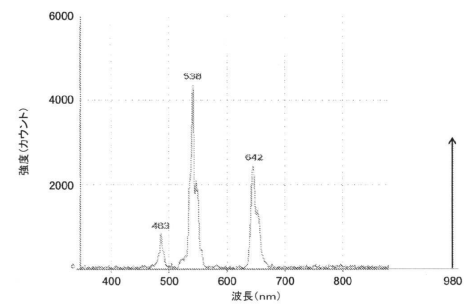
【図 4 - 9 D】

**FIG. 4-9D**

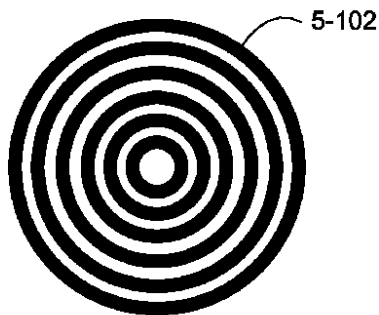
【図 4 - 9 E】



【図 4 - 9 F】



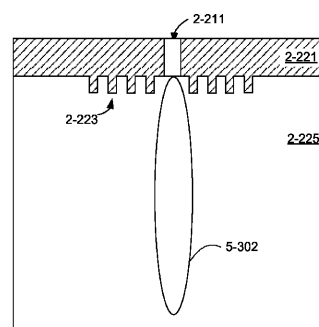
【図 5 - 1】

**FIG. 5-1**

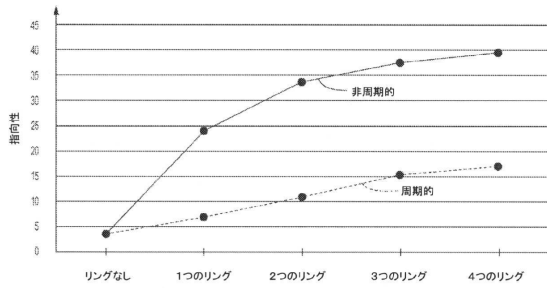
【図 5 - 2】

**FIG. 5-2**

【図 5 - 3 A】

**FIG. 5-3A**

【図 5-3 B】



【図 5-4 A】

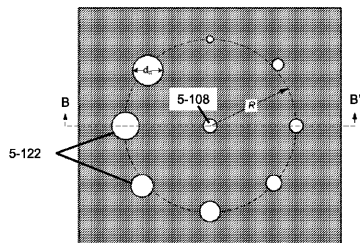


FIG. 5-4A

【図 5-5 C】

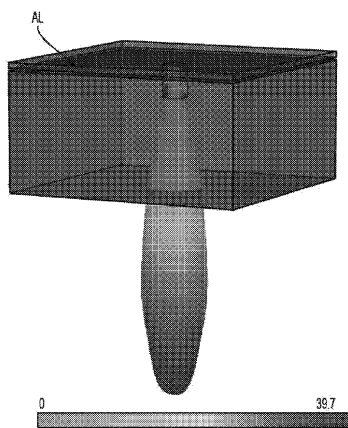


FIG. 5-5C

【図 5-4 B】

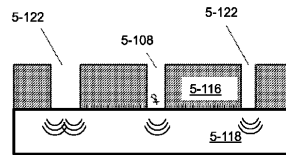


FIG. 5-4B

【図 5-5 A】

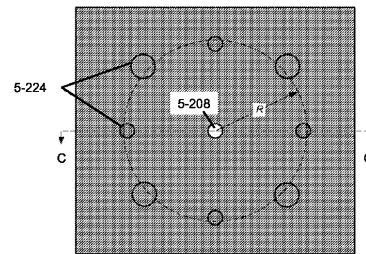


FIG. 5-5A

【図 5-5 B】

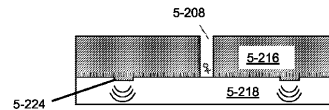


FIG. 5-5B

【図 5-6 A】

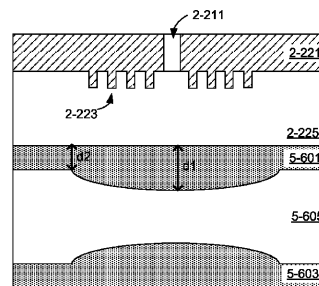


FIG. 5-6A

【図 5-6 B】

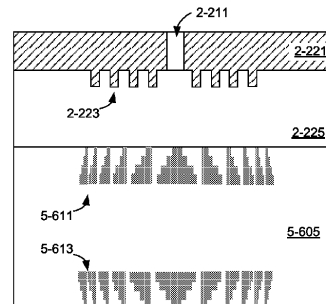
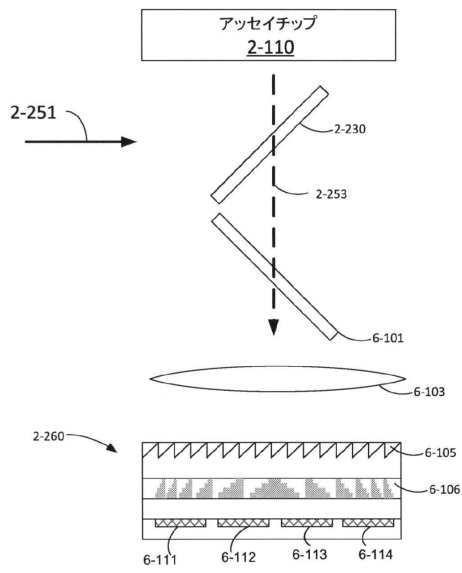


FIG. 5-6B

【図 6 - 1】



【図 6 - 2 A】

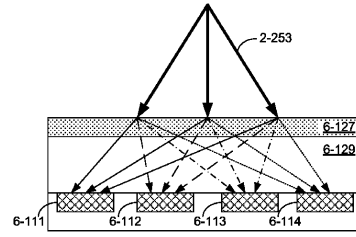


FIG. 6-2A

【図 6 - 2 B】

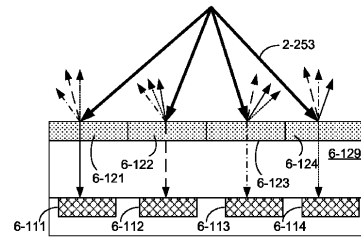


FIG. 6-2B

【図 6 - 3 A】

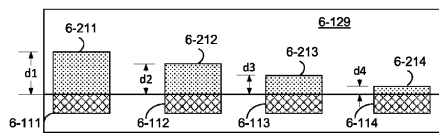


FIG. 6-3A

【図 6 - 3 B】

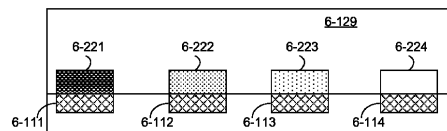


FIG. 6-3B

【図 6 - 4 A】

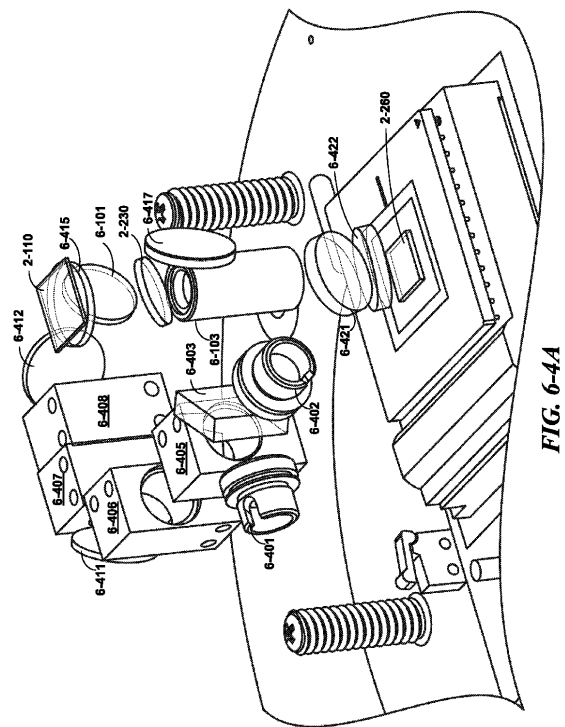
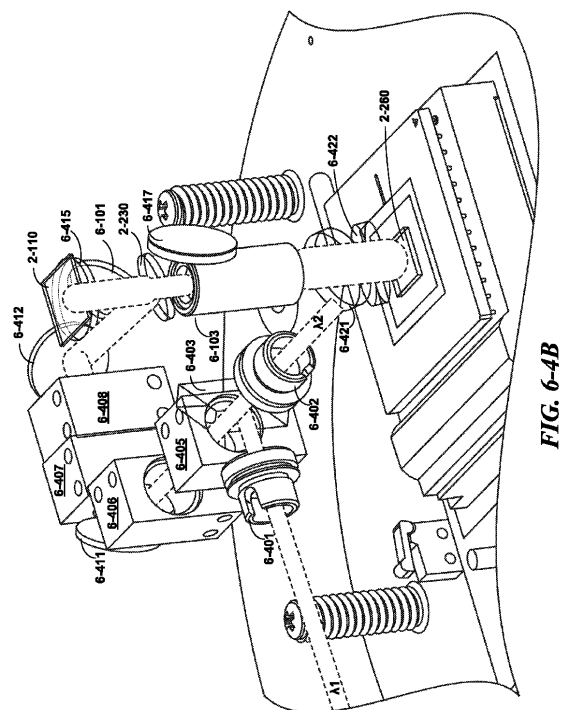
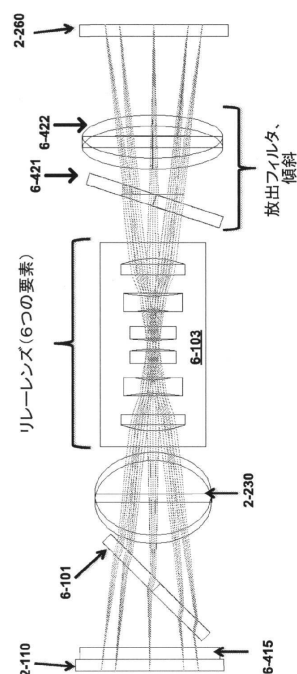


FIG. 6-4A

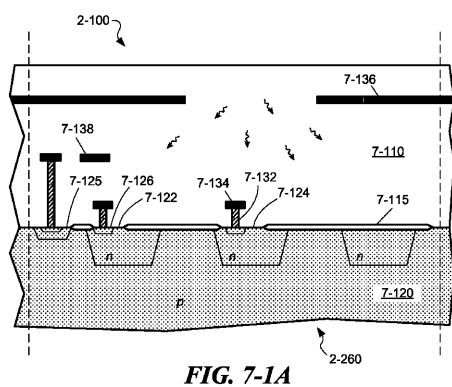
【图 6-4 B】



【图 6-5】



【图 7-1 A】



【図 7-1 C】

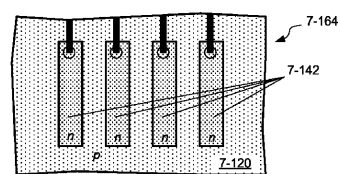


FIG. 7-1C

【图 7-1 D】

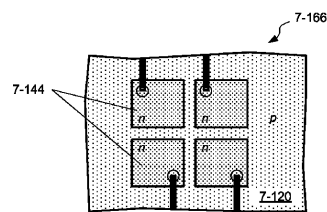


FIG. 7-1D

【图 7-1 B】

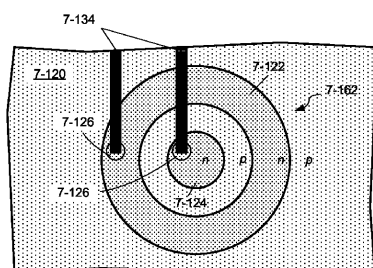


FIG. 7-1B

【図 7 - 1 E】

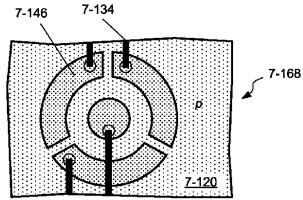


FIG. 7-1E

【図 7 - 1 F】

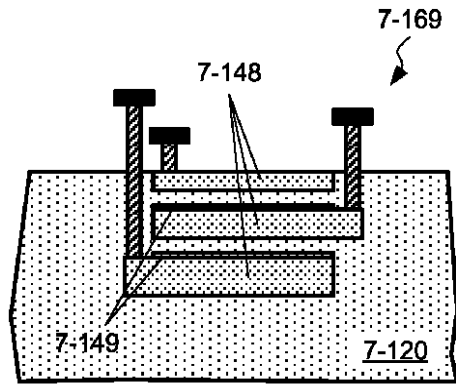


FIG. 7-1F

【図 7 - 2 A】

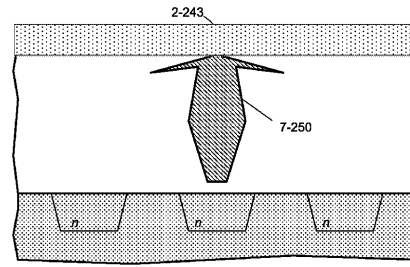


FIG. 7-2A

【図 7 - 2 B】

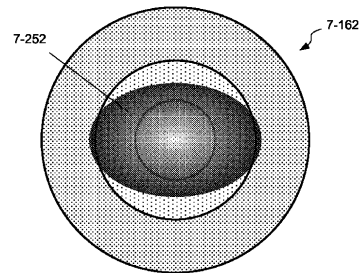


FIG. 7-2B

【図 7 - 2 C】

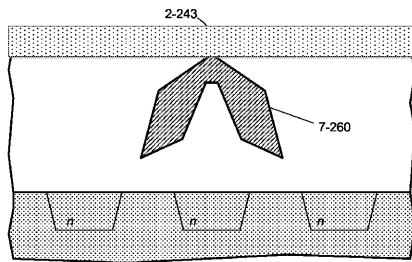


FIG. 7-2C

【図 7 - 2 D】

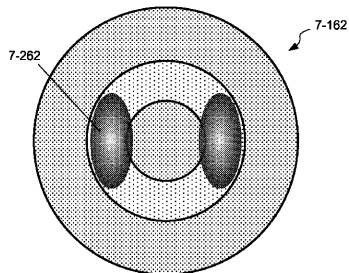
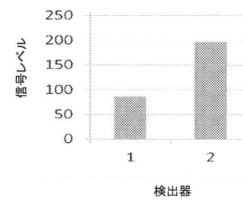
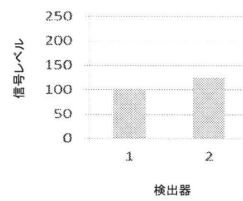


FIG. 7-2D

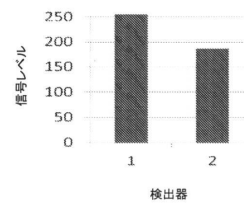
【図 7 - 2 E】



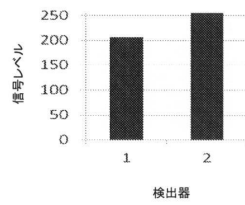
【図 7 - 2 F】



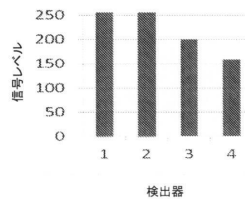
【図 7 - 2 G】



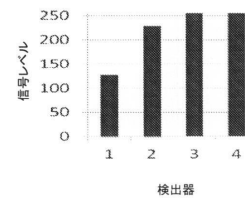
【図 7-2 H】



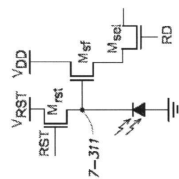
【図 7-2 I】



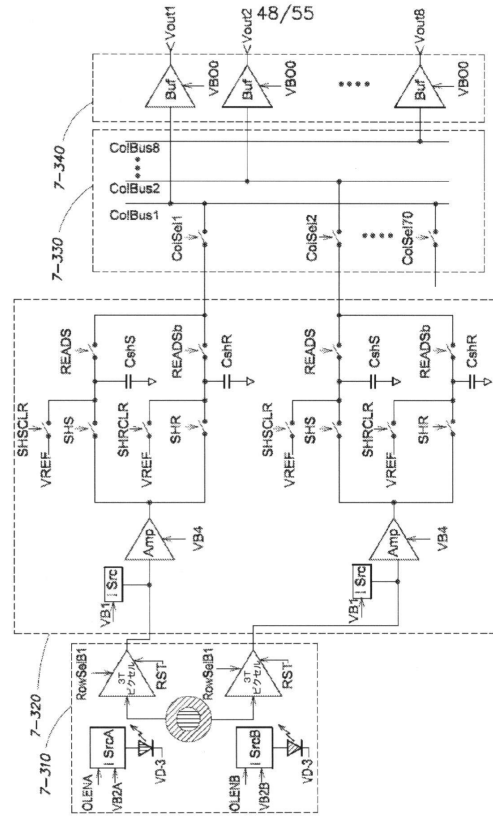
【図 7-2 J】



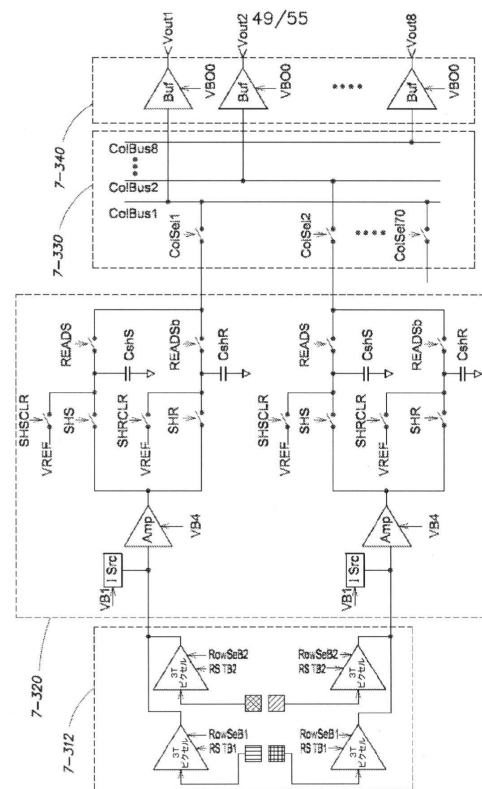
【図 7-3 B】



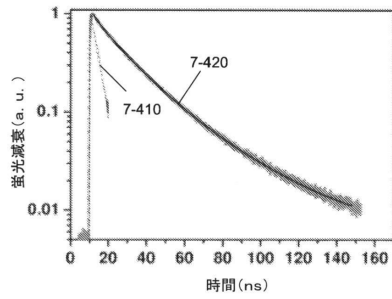
【図 7-3 A】



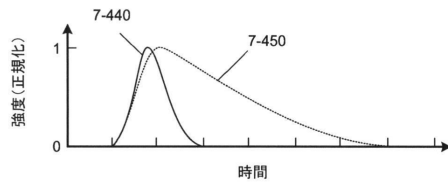
【図 7-3 C】



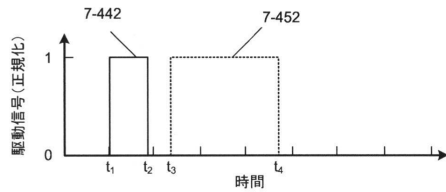
【図 7 - 4 A】



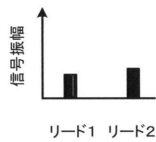
【図 7 - 4 B】



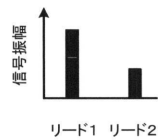
【図 7 - 4 C】



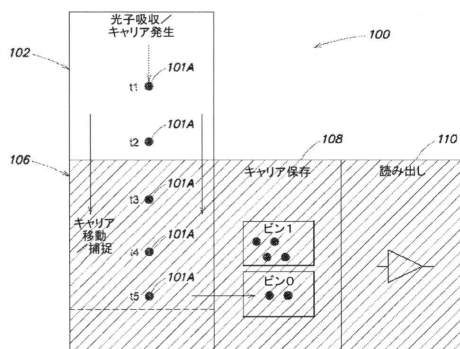
【図 7 - 4 G】



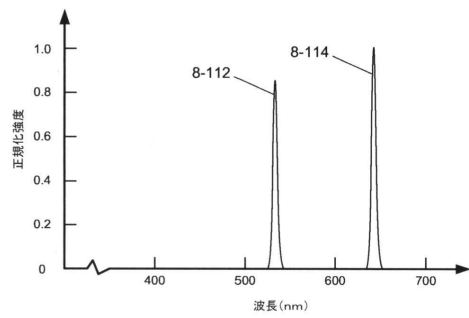
【図 7 - 4 H】



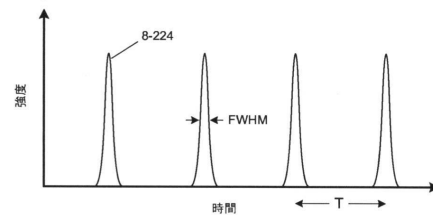
【図 7 - 5】



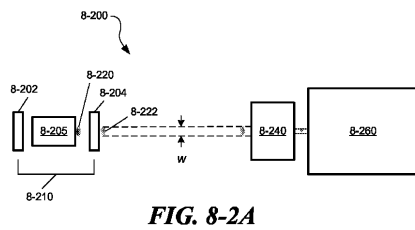
【図 8 - 1 B】



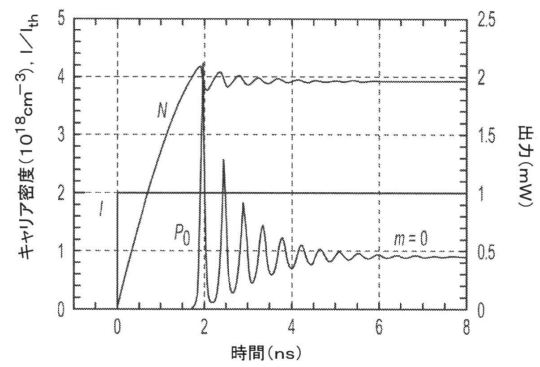
【図 8 - 2 B】



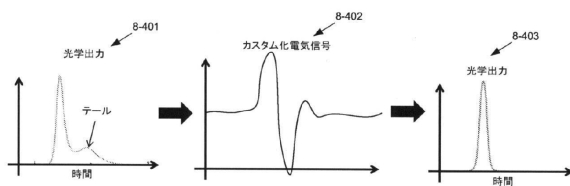
【図 8 - 2 A】



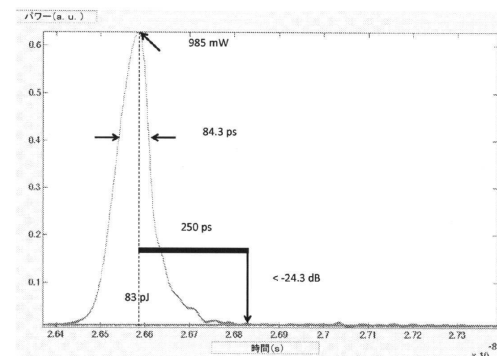
【図 8 - 3】



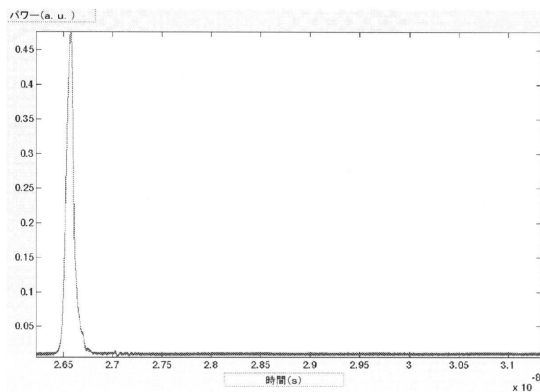
【図 8 - 4】



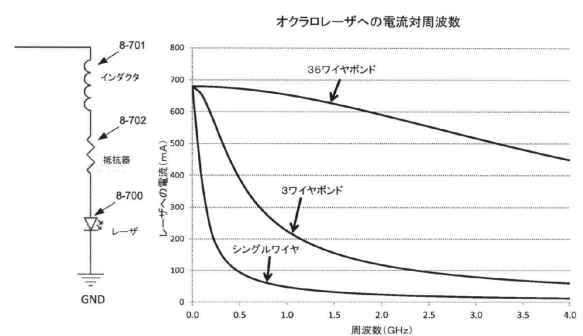
【図 8 - 6】



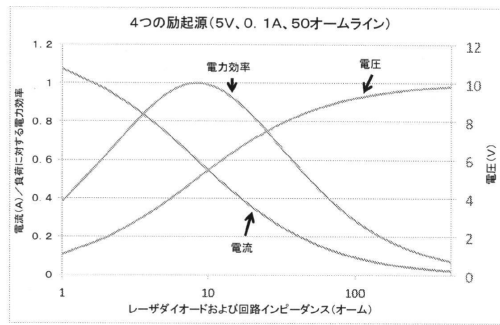
【図 8 - 5】



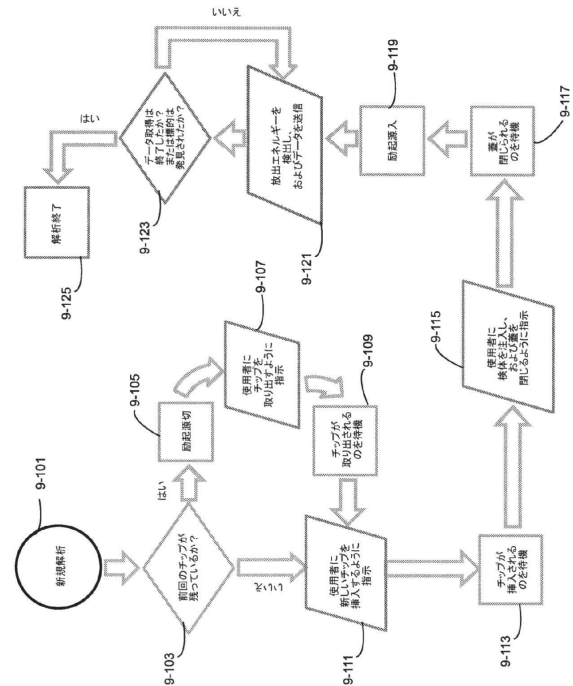
【図 8 - 7】



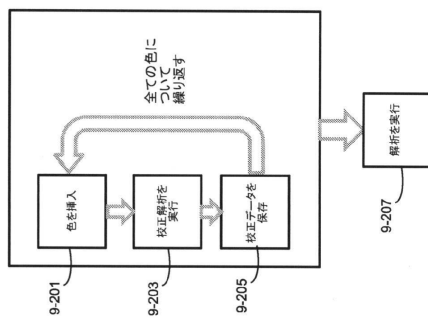
【図 8 - 1 3 B】



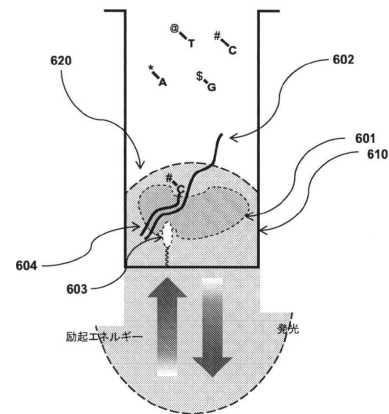
【図 9 - 1】



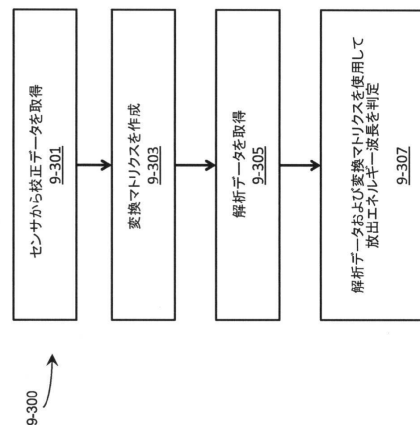
【図 9 - 2】



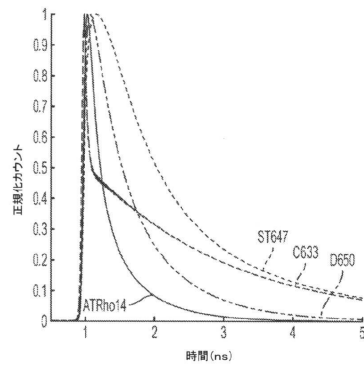
【図 10 - 1】



【図 9 - 3】



【図 10-8】

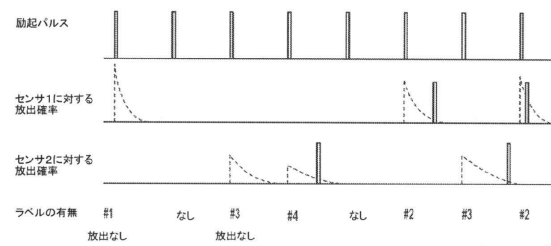


【図 10-9】

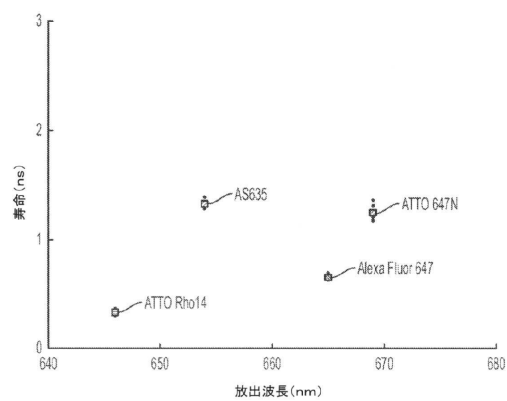
Exc	ATTO Rho14	C633	ST647	D650
0.25	0.380	0.287	0.170	0.130
0.51	0.131	0.170	0.080	0.060
0.967	0.152	0.268	0.180	0.140
1.057	0.131	0.170	0.080	0.060
1.915	0.131	0.170	0.080	0.060
2.227	0.131	0.170	0.080	0.060
3.185	0.131	0.170	0.080	0.060
3.315	0.131	0.170	0.080	0.060
7.955	0.131	0.170	0.080	0.060
7.995	0.131	0.170	0.080	0.060
8.701	0.131	0.170	0.080	0.060
8.837	0.131	0.170	0.080	0.060
8.847	0.131	0.170	0.080	0.060
9.91	0.131	0.170	0.080	0.060

FIG. 10-9

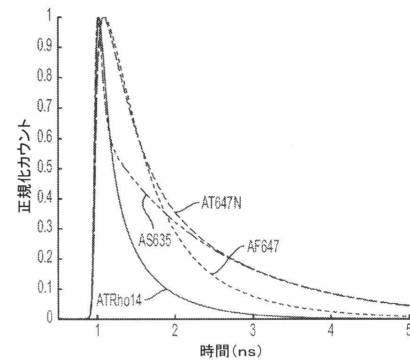
【図 10-10】



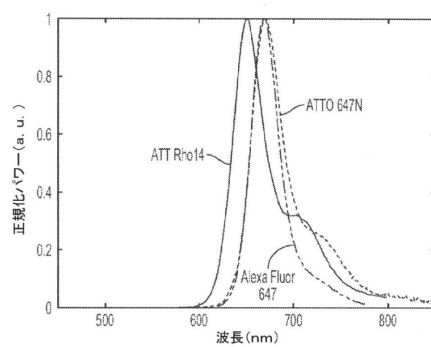
【図 10-11】



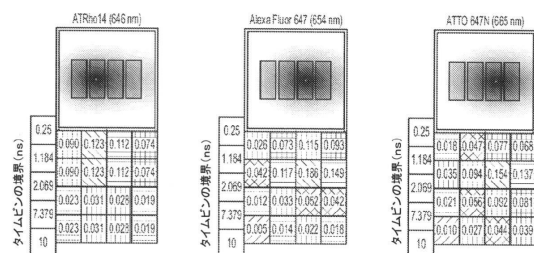
【図 10-13】



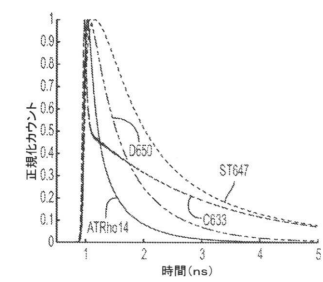
【図 10-12】



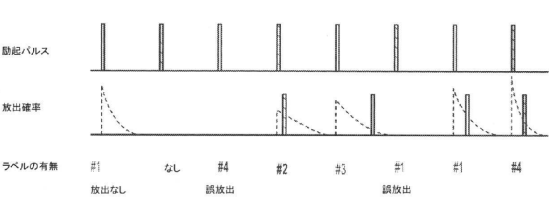
【図 10-14】



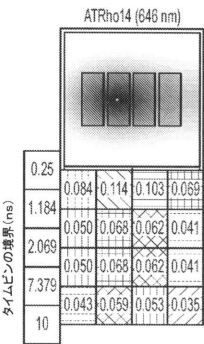
【図 10－15】



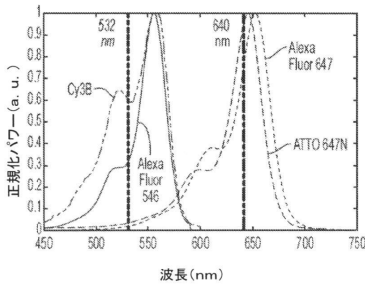
【図 10－17】



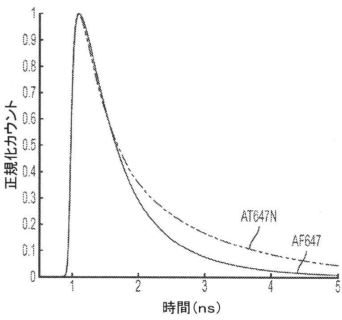
【図 10－16】



【図 10－18】



【図 10－19】



【図 10－20】

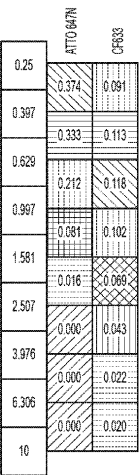


FIG. 10-20

【図 10-21】

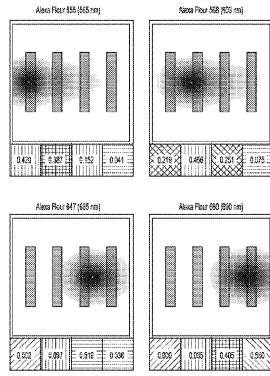
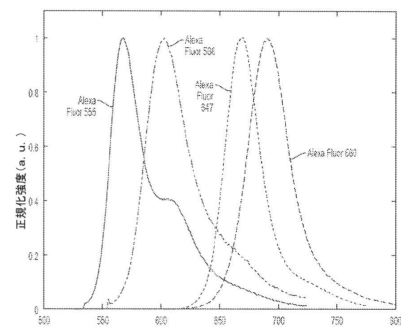
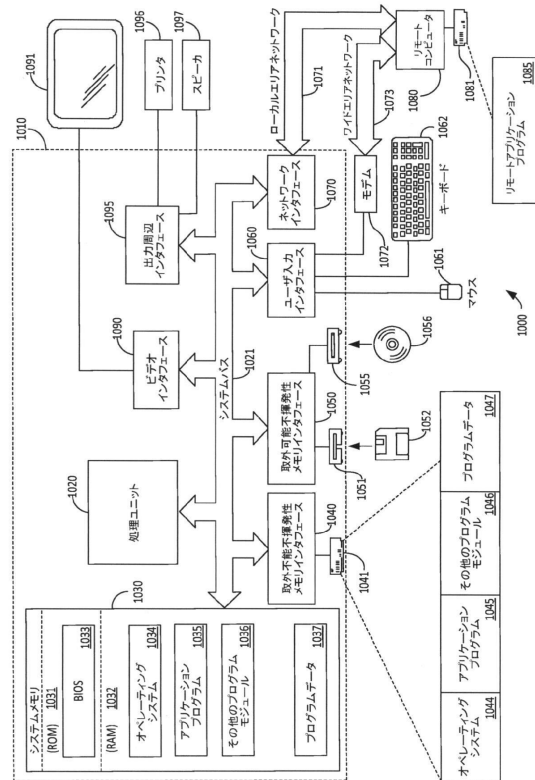


FIG. 10-21

【図 10-22】



【図 10-23】



【図 11-1】

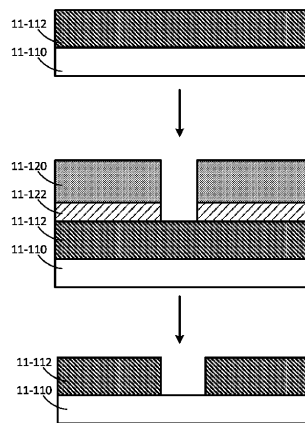


FIG. 11-1

【図 11-2】

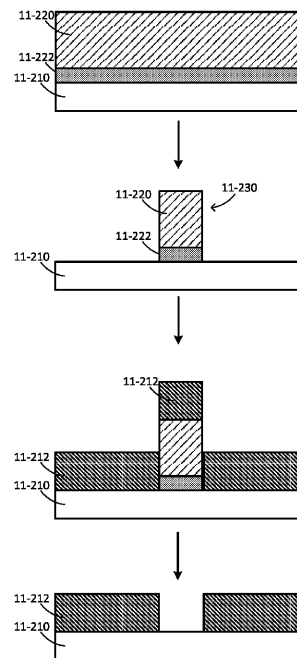


FIG. 11-2

【図 11-3】

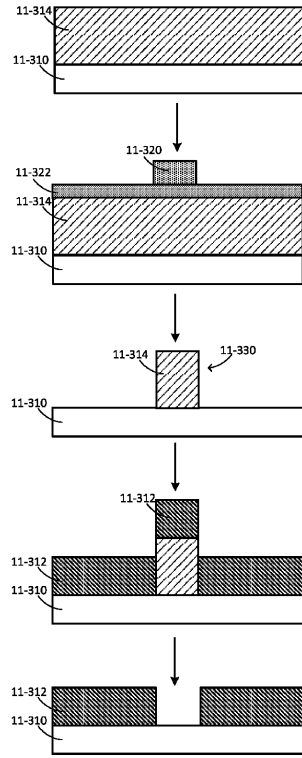
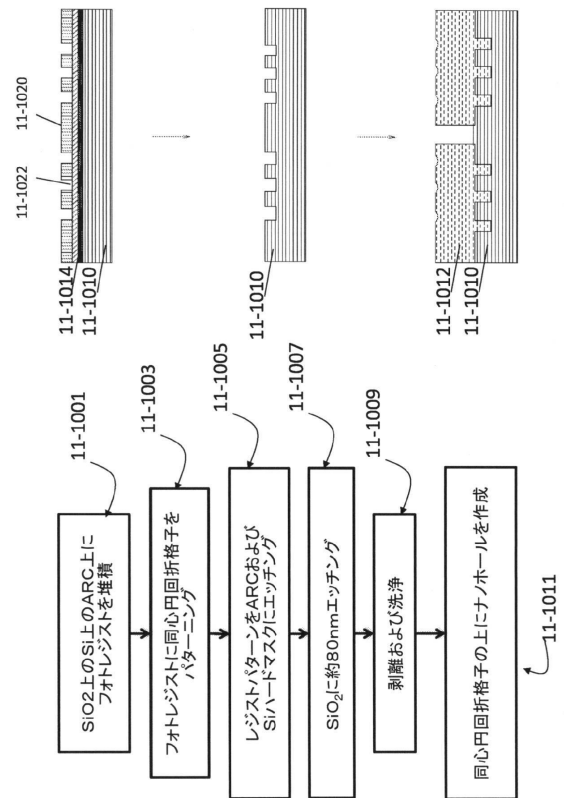
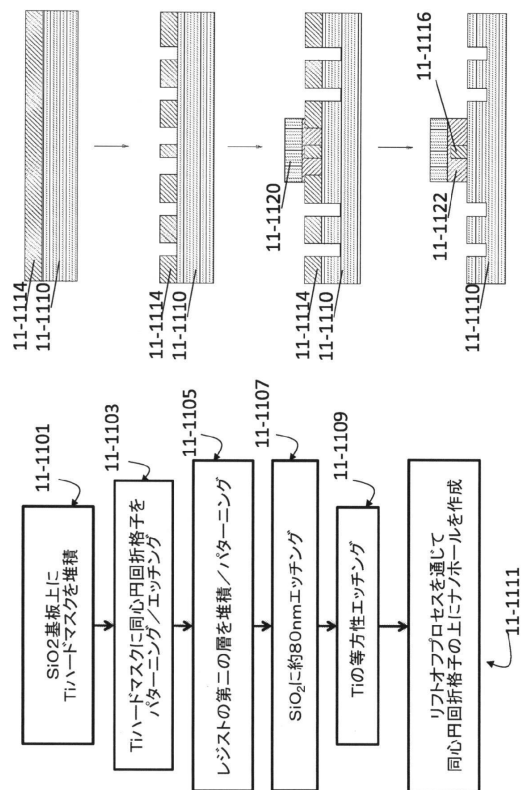


FIG. 11-3

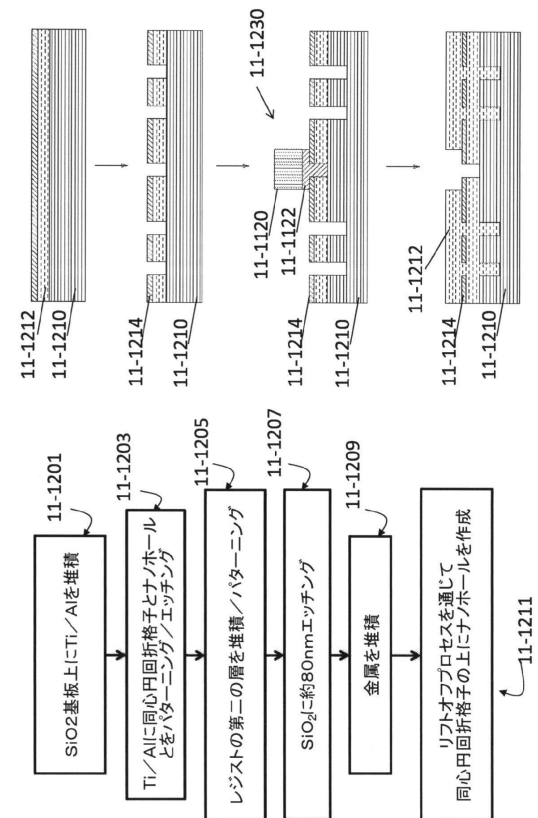
【図 11-4】



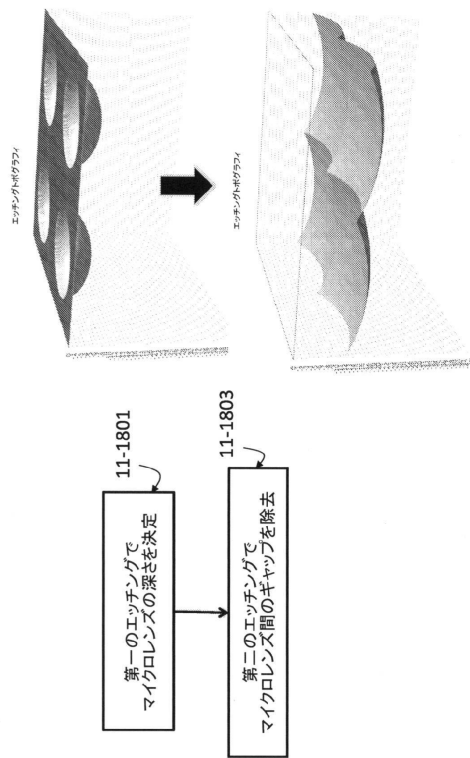
【図 11-5】



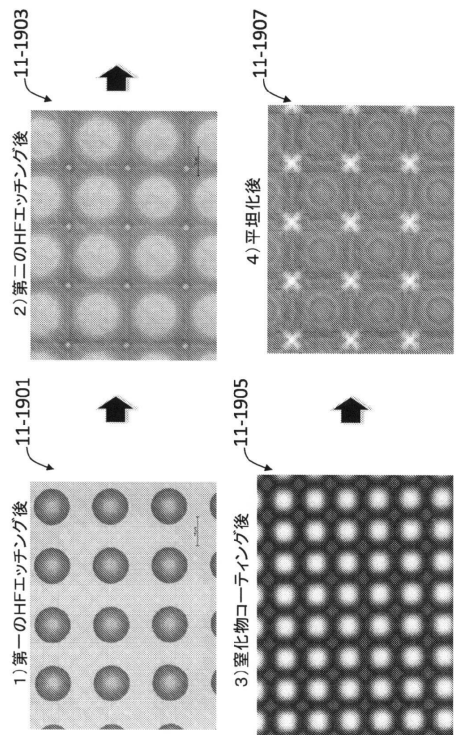
【図 11-6】



【図 1 1 - 7】



【図 1 1 - 8】



【図 1 1 - 9】

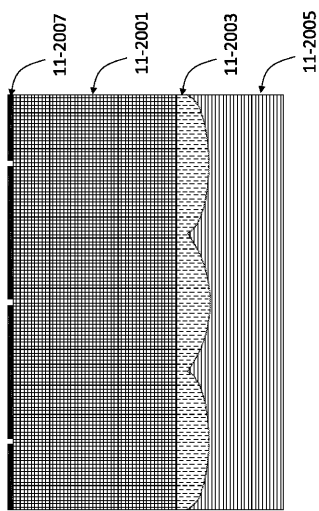


FIG. 11-9

【図 1 1 - 1 0】

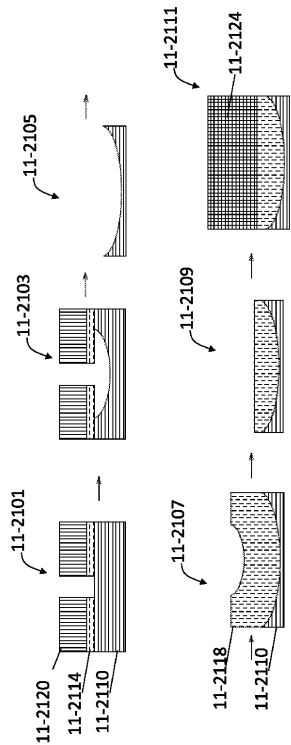
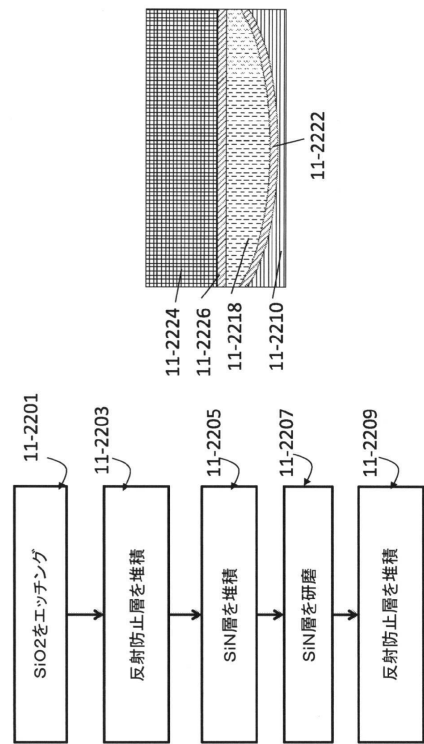


FIG. 11-10

【図 1 1 - 1 1】



【図 1 1 - 1 2】

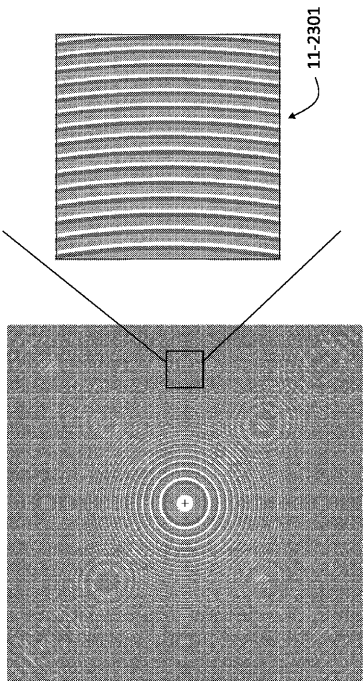


FIG. 11-12

【図 1 1 - 1 3】

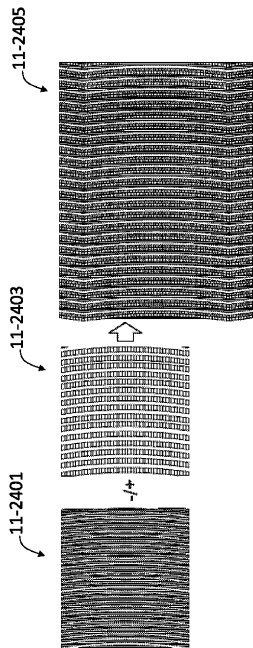


FIG. 11-13

【図 1 1 - 1 4】

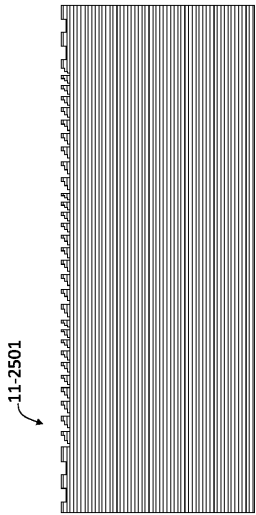
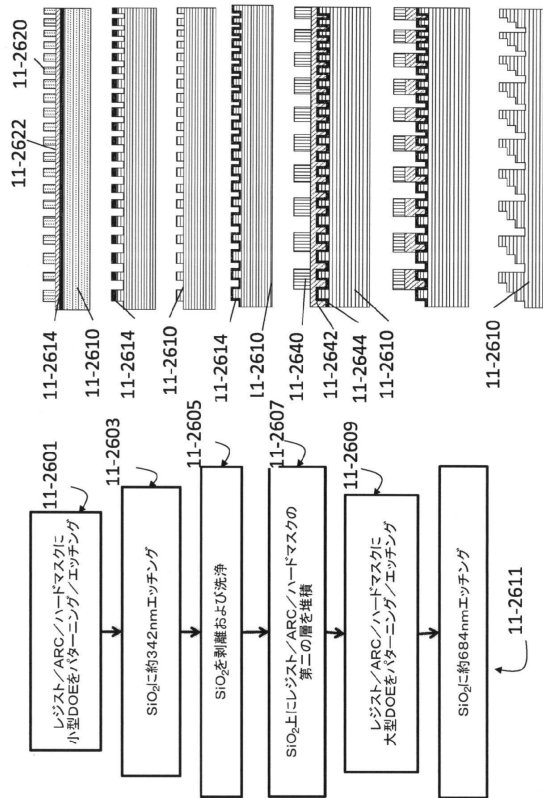
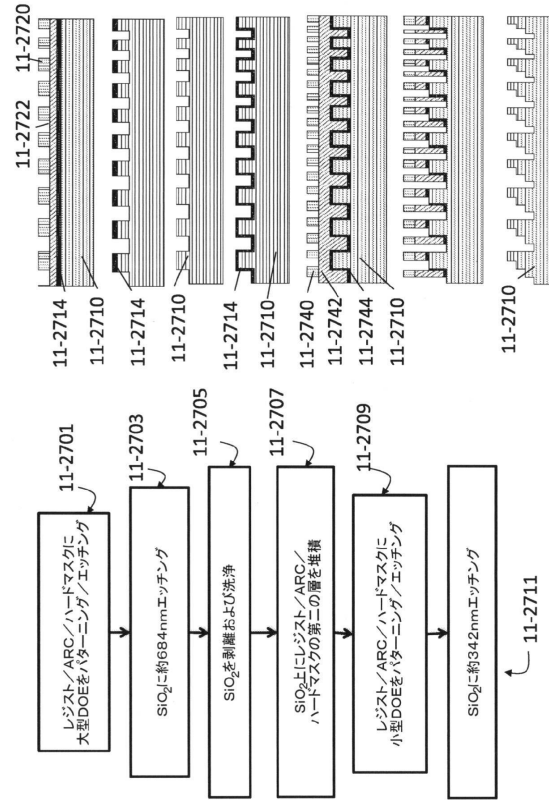


FIG. 11-14

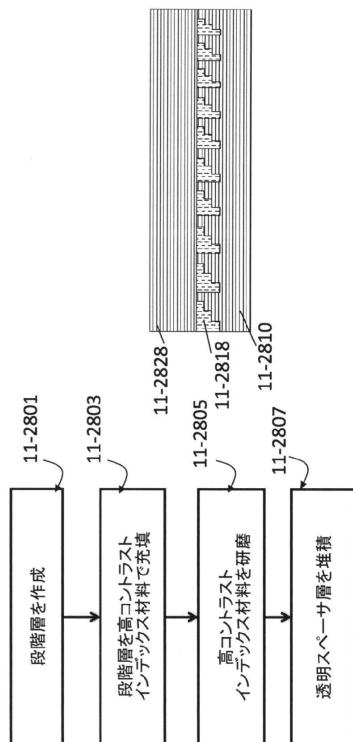
【図 11-15】



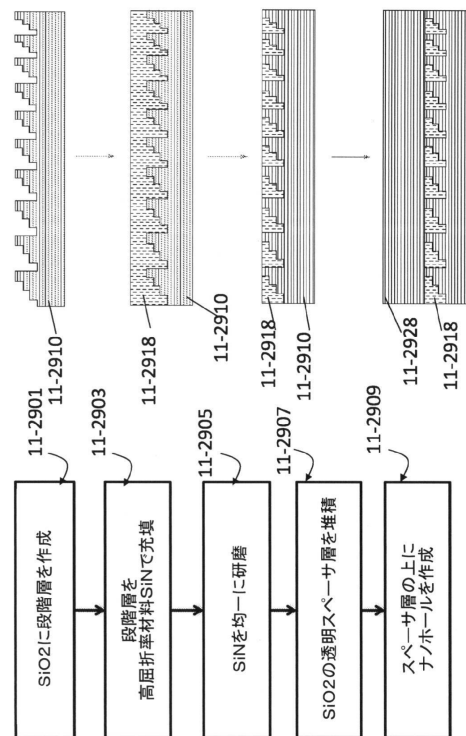
【図 11-16】



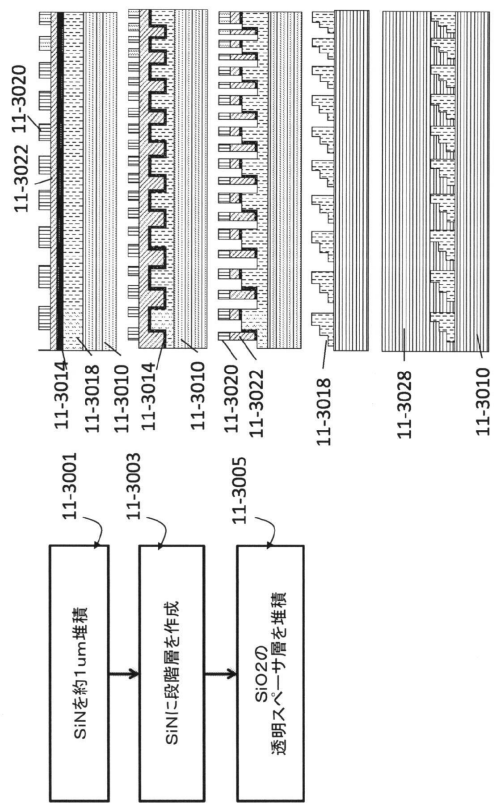
【図 11-17】



【図 11-18】



【図 1 1 - 1 9】



フロントページの続き

- (51)Int.Cl. F I
B 8 2 Y 40/00 (2011.01) B 8 2 Y 20/00
 B 8 2 Y 40/00
- (72)発明者 ロスバーク、ジョナサン エム.
 アメリカ合衆国 0 6 4 3 7 コネチカット州 ギルフォード アンカス ポイント ロード 2
 1 5
- (72)発明者 カビリ、アリ
 アメリカ合衆国 0 6 4 4 3 コネチカット州 マディソン グリーン ヒル ロード 5 8
- (72)発明者 シックラー、ジェイソン ダブリュ.
 アメリカ合衆国 0 6 4 4 3 コネチカット州 マディソン ハイ フィールド レーン 1 0
- (72)発明者 ジャーフィス、ブレット ジェイ.
 アメリカ合衆国 0 6 4 3 7 コネチカット州 ギルフォード ナット プレインズ ロード 1
 6 4
- (72)発明者 ラッキー、ジェレミー
 アメリカ合衆国 0 6 4 3 7 コネチカット州 ギルフォード ノートンタウン ロード 6 3 6
- (72)発明者 シュミッド、ジェラード
 アメリカ合衆国 0 6 4 3 7 コネチカット州 ギルフォード ワイルドローズ アベニュー 1
 4 0
- (72)発明者 グレン、ポール イー.
 アメリカ合衆国 0 2 4 8 2 マサチューセッツ州 ウェルズリー パインウッド ロード 2 2
- (72)発明者 ウエスト、ローレンス シー.
 アメリカ合衆国 9 5 1 2 0 カリフォルニア州 サンノゼ ブレアウッド コート 7 7 4
- (72)発明者 チブリアニー、ベンジャミン
 アメリカ合衆国 0 6 4 0 5 コネチカット州 ブランフォード タートル ベイ ドライブ 1
 7 6
- (72)発明者 ファイフ、キース ジー.
 アメリカ合衆国 9 4 3 0 6 カリフォルニア州 パロ アルト マタデロ アベニュー 6 3 5

審査官 伊藤 裕美

- (56)参考文献 国際公開第2005/073407 (WO, A1)
 特開2007-248063 (JP, A)
 米国特許第06825921 (US, B1)
 米国特許出願公開第2008/0030628 (US, A1)
 特表2008-520975 (JP, A)
 米国特許出願公開第2003/0222222 (US, A1)
 特開2010-161629 (JP, A)
 特開2008-089346 (JP, A)
 特表2010-511148 (JP, A)
 特開2008-185585 (JP, A)
 特開2012-047719 (JP, A)
 国際公開第2014/065329 (WO, A1)
 特開2006-300950 (JP, A)
 米国特許出願公開第2005/0074784 (US, A1)
 特開平08-015590 (JP, A)
 特開平05-281041 (JP, A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 2 1 / 0 0 - 2 1 / 7 4

C 1 2 M 1 / 3 4

C 1 2 Q 1 / 6 8 - 1 / 7 0