

(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101405594 B

(45) 授权公告日 2012. 06. 27

(21) 申请号 200780009688. 8

(22) 申请日 2007. 03. 21

(30) 优先权数据

0600642-3 2006. 03. 22 SE

(85) PCT申请进入国家阶段日

2008. 09. 18

(86) PCT申请的申请数据

PCT/SE2007/000275 2007. 03. 21

(87) PCT申请的公布数据

W02007/108752 EN 2007. 09. 27

(73) 专利权人 阿米克公司

地址 瑞典乌普萨拉省

(72) 发明人 托马斯·林斯特龙

伊布·曼德尔-哈特维格

奥韦·奥曼 约翰·巴克伦

肯尼特·维尔赫尔姆森

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

司 72001

代理人 蒋骏

(51) Int. Cl.

G01N 21/64 (2006. 01)

(56) 对比文件

US 5344784 A, 1994. 09. 06, 说明书第2栏第1-5行, 第4栏第47行至第5栏第20行, 第5栏第35-40行, 第8栏第1-10行、附图1.

审查员 孙晓明

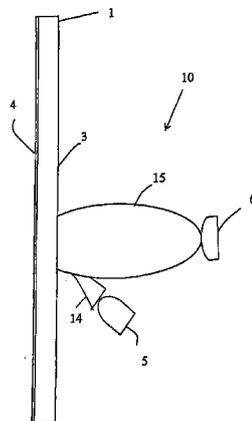
权利要求书 2 页 说明书 9 页 附图 5 页

(54) 发明名称

荧光读取器

(57) 摘要

本发明涉及一种用于包括聚合物样品基板(1)的光学分析装置的荧光读取器(10), 该聚合物样品基板(1)具有反应位置表面和基板表面(3), 该荧光读取器包括设置成通过基板表面照射反应位置表面的光源(5)、和设置成检测从反应位置表面发射的并透过基板表面的荧光的检测器件(6), 基板表面设置有全内反射抑制部件(15)。



1. 一种用于样品基板 (1) 的荧光读取器 (10), 该样品基板 (1) 包括: 反应位置表面 (2) 和相对基板表面 (3), 该荧光读取器包括

设置成将激发光线射入到基板表面 (3) 中的激发光源 (5)、和

设置成检测从布置在反应位置表面上的荧光团发射的并透过基板表面的荧光的检测器件 (6), 其特征在于:

所述基板表面 (3) 设置有位于发射的荧光光路中的全内反射抑制部件 (12, 15, 16), 从而提高被检测器件 (6) 检测的基板表面的透射, 所述全内反射抑制部件被设置成释放陷在基板 (1) 内的供检测器件 (6) 检测的发射荧光, 且所述全内反射抑制部件包括表面凹凸结构的出射部分 (12), 其设计成将发射的荧光光线衍射或折射出基板。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述光源 (5) 设置成将激发光线注入基板表面 (3) 中, 注入该激发光线的入射角 (7) 相对于反应位置表面法线大致对应于发射荧光的最大发射角 (8)。

3. 根据权利要求 2 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述基板表面 (3) 设置有位于激发光线的光路中的入射角控制部件 (11)。

4. 根据权利要求 3 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述入射角控制部件 (11) 包括有表面凹凸结构的入射部分 (9), 其设计成使激发光相对于反应位置表面的法线以增大的入射角 (7) 进入基板。

5. 根据权利要求 4 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述有表面凹凸结构的入射部分 (9) 包括衍射结构。

6. 根据权利要求 4 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述有表面凹凸结构的入射部分 (9) 包括折射结构。

7. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述出射部分 (12) 设计成将发射光线聚焦。

8. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述有表面凹凸结构的出射部分 (12) 包括衍射结构。

9. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述有表面凹凸结构的出射部分 (12) 包括折射结构。

10. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 表面凹凸结构的设计设置成根据入射荧光的发射角 (8) 变化而在出射部分 (12) 上变化。

11. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 出射部分 (12) 的位置和延伸确定被分析的反应位置区域的位置和延伸。

12. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 设置光收集透镜器件 (13) 来接收透过基板表面的发射荧光。

13. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 在靠近设置于所述基板表面上的有表面凹凸结构的出射部分 (12) 的位置设置光收集部分 (15)。

14. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述全内反射抑制部件包括与上述基板表面光学浸润接触设置的光收集部分 (15)。

15. 根据权利要求 14 所述的荧光读取器, 其特征在于: 所述光收集部分 (15) 设计成通过全内反射的方式收集并传输光。

16. 根据权利要求 14 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光收集部分(15)大致是球形的。

17. 根据权利要求 14 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光收集部分(15)设置有用用于激发光的输入端口(14)。

18. 根据权利要求 14 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光收集部分(15)设置有至少一个输出端口。

19. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器,其特征在于:所述全内反射抑制部件包括光学浸润层(16)。

20. 根据权利要求 19 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光学浸润层的至少一部分附着到设置成将发射的荧光聚焦在检测器件(6)上的透镜器件(17)。

21. 根据权利要求 20 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光学浸润层(16)具有比基板(1)的折射率高,比透镜器件(17)的折射率低的折射率。

22. 根据权利要求 19 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光学浸润层的至少一部分附着到检测器件(6)。

23. 根据权利要求 4 所述的荧光读取器,其特征在于:所述入射角控制部件包括光学浸润层。

24. 根据权利要求 23 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光学浸润层(16)包括软质聚合物材料。

25. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器,其特征在于:所述检测器件(6)设置有光谱滤波部件,该光谱滤波部件设置成阻止检测到激发光的波长。

26. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器,其特征在于:所述检测器件(6)设置有偏振滤波部件。

27. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器,其特征在于:所述光源(5)设置有光谱滤波部件,该光谱滤波部件设置成阻止与荧光发射一致的波长的透射。

28. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器,其特征在于:在不同的几何平面中进行激发和发射的测量。

29. 根据权利要求 1 所述的荧光读取器用在光学分析装置中。

荧光读取器

技术领域

[0001] 本发明涉及一种用于光学分析装置中样品基板的改进的荧光 / 磷光读取器。本发明还涉及所述荧光 / 磷光读取器的应用, 以及适用于所述荧光读取器的样品基板。

背景技术

[0002] 基于样品中分析物, 如核酸、缩氨酸、蛋白质、抗体、激素或药物的检测, 通过光学分析对液体样品进行分析和诊断测定。光学分析一个重要的应用是免疫学领域, 其中借助特定的抗体检测分析物, 例如通过用荧光团标记分析物, 或通过用荧光团标记的抗体, 该抗体能结合到分析物, 从而形成可光学检测的复合物。可通过荧光读取器进行荧光团的检测, 荧光读取器能用激发光源照射分析支撑基板并能检测从荧光团发射的荧光。

[0003] 通过包含样品支撑基板和荧光读取器的光学分析装置进行包括检测从荧光团发射的荧光在内的光学分析。荧光读取器包括用于光学波长范围内 (即在大约 40nm 与 1mm 之间) 的电磁辐射的光源和检测器、以及适当的光学滤波器和波导部件。样品支撑物包括例如在激发光和发射光的波长范围中具有较高光学透射率的聚合物材料的基板, 其还具有对其他波长的较高吸收性。基板设置有一个或多个反应位置区域, 包含探针分子, 例如抗体的点和 / 或线, 为样品中存在的分析物分子, 即目标分子提供结合位置。基板还设置有用形成例如微柱或微杆的突出微结构的图案, 其设置成形成用于样品的毛细管流道。

[0004] 当样品与支撑表面上被捕获的分子接触, 且荧光或磷光抗体检测共轭 (conjugate) 时, 形成可光学检测的点或线。当用荧光读取器的激发光源照射基板时发出荧光或磷光, 由此表示在样品的目标分子与反应位置的探针分子之间发生了反应。荧光和磷光定义为由被吸收的激发电磁辐射导致的电磁辐射的发射物, 在激发之后荧光持续小于 1×10^{-8} s, 在暴露于激发光之后磷光持续较长时间, 即其衰退更慢。

[0005] 在荧光 (和磷光) 中, 激发辐射通常具有比发射辐射短的波长 (即较高的能量), 但对于多光子荧光来说是相反的事实。可以以稳态或时间分辨来研究荧光行为, 荧光光谱学涉及例如单光子和多光子荧光、FRET (荧光共振能量转移)、和荧光上转换 (up-conversion)。在荧光分析中, 激发和发射辐射的波长依赖于荧光团的类型, 荧光团可以是有机源或无机源的, 如青色染料、荧光蛋白染料或纳米晶。作为一个例子, 一般用 649nm 激发普通荧光团 Cy-5™ (GE 卫生保健), 测量发射光为 670nm。激发最大值与发射最大值之间的波长差通常称作斯托克斯偏移。

[0006] 在光学分析中, 通过荧光读取器的检测器件, 通过测量发射荧光或磷光的强度来确定样品中分析物的浓度, 由此能进行定量测量。因而, 用激发光照射反应位置区域的效率, 以及发射的荧光的收集效率将对光学分析的性能产生影响。

[0007] 此外, 基板表面上的反应位置可设置不同探针分子的点或线的阵列, 结合不同的目标分子。因此, 荧光读取器设计成能通过不同荧光团, 或通过使用探针分子的空间分离来确定样品中几种分析物的存在。

[0008] 荧光读取器可设置成通过扫描反应位置区域进行发射荧光的检测或者作为二维像素阵列来检测整个反应位置区域的图像。扫描荧光读取器通过光学部件与样品基板之间的相对移动扫描样品基板的表面,光学部件优选包括窄带激发光源,如激光,LED 或设置有光谱滤波器的白光源,来自该窄带激发光源的光聚焦在每个单独的检测位置。从每个检测位置发射的荧光聚焦在光学检测器,如光电二极管或 PMT(光电倍增管)上。成像荧光读取器能检测二维像素阵列,光学部件包括用于照射样品基板的大部分表面区域(或整个表面区域)的激发光源、和能同时检测从整个检测位置区域发射的光的检测器,如使用 MOS(半导体上金属(Metal-On-Semiconductor))技术的 CCD(电荷耦合器件)成像器。

[0009] W001/575501 中描述了一种现有技术的光学读取器,该文献公开了在透明基板上包含样品的分析物的光学成像。该光学读取器包括用于激励从样品发射可检测光的激发能量源,基板设置有位于样品下面的用于将发射光反射进检测部件的反射表面。

[0010] W099/46596 中公开了一种光检测光学器件,其包括耦合到滑块的光导体,由此可提高光收集效率。

[0011] W003/103835 描述了现有技术的样品基板,其设置有布置成形成用于样品的毛细管流道的突出微柱。

[0012] 本发明的一个目的是提供一种改善的荧光/磷光读取器,其能有效照射基板的反应位置区域并有效收集和检测发射光,由此可实现高性能的光学分析装置。

发明内容

[0013] 通过依照所附权利要求的荧光读取器和样品基板获得这些和其他目的。

[0014] 权利要求涉及用于具有反应位置表面和相对基板表面的样品基板的荧光读取器。该荧光读取器包括设置成将光线注入到基板表面中的激发光源、和设置成检测从反应位置表面发射的并透过基板表面的荧光的检测器件。基板表面设置有位于发射的荧光光路中的全内反射抑制部件,从而提高供检测器件检测的基板表面的透射,全内反射抑制部件设置成释放陷在(trapped within)基板内的供检测器件检测的发射荧光。

[0015] 此外,光源设置成将激发光线以大致与发射荧光的最大发射角一致的相对于反应位置表面法线的入射角注入基板表面中。因而,基板表面设置有位于激发光线的光路中的入射角控制部件。

[0016] 入射角控制部件包括有表面凹凸结构的入射部分,其设计成使激发光相对于反应位置表面以增大的入射角进入基板,表面凹凸结构包括衍射或折射结构。

[0017] 全内反射抑制部件包括有表面凹凸结构的出射部分,其设计成将发射的荧光光线衍射或折射出基板,其进一步设计成将发射光线聚焦。有表面凹凸结构的出射部分包括衍射或折射结构。

[0018] 表面凹凸结构的设计设置成根据入射荧光的发射角变化而在出射部分上变化,出射部分(12)的位置和延伸确定被分析的反应位置区域的位置和延伸。

[0019] 此外,设置光收集透镜器件来接收透过基板表面的发射荧光。可选择地,靠近设置于所述基板表面上的有表面凹凸结构的出射部分设置光收集部分。

[0020] 全内反射抑制部件包括与所述基板表面光学浸润接触设置的光收集部分。

[0021] 光收集部分设计成通过全内反射的方式收集并传输光,其大致是椭球形的。其还

可设置有用于激发的输入端口,和 / 或至少一个输出端口,折射率大致与基板的折射率对应或比其大。

[0022] 可选择地,全内反射抑制部件可包括具有适当折射率的光学浸润层,所述光学浸润层的至少一部分附着到设置成将发射的荧光聚焦在检测器件上的透镜器件。折射率比基板的折射率高,比透镜器件的折射率低。此外,所述光学浸润层的至少一部分附着到检测器件。入射角控制部件也可包括具有适当折射率的光学浸润层。光学浸润层包括软质聚合物材料。

[0023] 此外,检测器件设置有设置成阻止检测激发光波长的光谱滤波部件,和 / 或偏振滤波部件。

[0024] 光源也设置有光谱滤波部件,该光谱滤波部件设置成阻止与荧光发射一致的波长的透射,在不同的几何平面中进行激发和发射的测量。

[0025] 权利要求还涉及荧光读取器在光学分析装置中的应用。

[0026] 此外,权利要求涉及一种具有反应位置表面和相对基板表面的样品基板,该样品基板适用于根据本发明的荧光读取器。

[0027] 样品基板由聚合物材料形成,反应位置表面设置成形成荧光团的线和 / 或点,此外,反应位置表面设置有突出微结构,例如能进行毛细管流动的微柱的图案。

[0028] 基板表面设置有构造成抑制发射的荧光光线的全内反射的有表面凹凸结构的出射部分,和 / 或构造成增大激发光线的入射角的有表面凹凸结构的入射部分,表面凹凸包括衍射或折射结构。

[0029] 本发明的其他特征和进一步的优点将从下面描述和附图以及所附权利要求中公开的本发明的非限制性实施方式变得显而易见。

附图说明

[0030] 现在将参照附图更加详细地描述本发明,其中:

[0031] 图 1 是样品基板的侧面透视图,表示出了反应位置表面和相对基板表面;

[0032] 图 2 图解了位于聚合物样品基板的反应位置表面上的荧光团的发射不对称性;

[0033] 图 3 是示意性图解荧光团的荧光发射波瓣 (lobe) 的曲线;

[0034] 图 4 是示意性图解在激发的两个不同入射角处荧光激发效率的曲线;

[0035] 图 5 示意性图解了样品基板以及用于发射荧光的激发光源和检测器的横截面,表示出了入射角和发射角;

[0036] 图 6 是在样品基板的基板表面上设置的包括全内反射抑制出射部分和入射角控制入射部分的表面凹凸结构的视图;

[0037] 图 7 示意性地图解了表面凹凸结构的放大实施例;

[0038] 图 8a 示意性地图解了设置有由入射部分和出射部分构成的表面凹凸的基板的横截面;

[0039] 图 8b 图解了图 8a 的基板,其进一步设置有用于发射光的光收集透镜器件;

[0040] 图 9 图解了荧光读取器,其包括设置有用作光导向器件的输入端口的全内反射抑制光收集部分;和

[0041] 图 10 显示了包括检测器和透镜的布置,该透镜设置有物理上与基板表面接触的

抑制全内发射的浸润层。

具体实施方式

[0042] 术语“荧光读取器”定义为能激发和检测荧光和磷光的读取器，术语“荧光”定义为之后称作荧光和磷光。说明书和权利要求中使用的其他术语和表述意思是指具有本领域普通技术人员通常使用的含义。

[0043] 通过依照本发明的荧光读取器，在包括聚合物样品基板的光学分析装置中获得了改善的性能，该聚合物样品基板具有设置有荧光层的反应位置表面、在该表面上形成例如线或点的荧光团、和相对基板表面。该荧光读取器包括设置成照射基板表面的激发光源，如LED，和设置成检测从荧光层发射的荧光的检测器，如光电二极管。检测器设置成收集和检测透过基板表面的发射荧光，光源设置成将激发光注入到基板表面中。

[0044] 当入射到表面上的光线相对于表面法线的入射角超过全内反射的临界角时，该光线从所述表面镜面反射，这依赖于表面两侧上材料的折射率之间的关系。从具有折射率 n_1 的第一介质传播到具有折射率 n_2 的第二介质的光线的折射由公知的斯涅耳定律的关系确定：

$$[0045] \quad n_1 \times \sin \alpha_{in} = n_2 \times \sin \alpha_{ref} \quad (1)$$

[0046] α_{in} 是入射到第一和第二介质之间表面上的第一介质中的光线与表面法线的角度， α_{ref} 是在第二介质中传播的折射光线与表面法线的角度。当 $\alpha_{ref} = 90$ 度时，在表面上发生全内反射， $\sin \alpha_{ref} = 1$ 。由上面的关系 (1)，可得出：

$$[0047] \quad \sin \alpha_{in} = n_2/n_1 \times \sin \alpha_{ref} = \sin \alpha_{in(TIR)} = n_2/n_1 = \sin \alpha_{in(TIR)} = \sin^{-1}(n_2/n_1),$$

其中 $\alpha_{in(TIR)}$ 表示全内反射的临界角。

[0048] 因而，当 n_1 大于 n_2 且 α_{in} 超过全内反射的临界角，即 $\alpha_{in} \geq \alpha_{in(TIR)}$ 时，发生全内反射。

[0049] 在适用于设置有荧光层的电介质基板的常规荧光读取器中，从荧光层发射的大部分光导入基板中，该发射荧光的大部分以超过所述全内反射的临界角入射到基板表面上。当使用折射率一般 1.5 和 1.6 之间的常规聚合物基板时，将发生全内反射，大部分光将陷在基板内，即经历多次全内反射，由此不能到达检测器。

[0050] 依照本发明，在基板表面上设置全内反射抑制部件，从而从基板释放受陷的荧光，由此使大部分发射的荧光到达检测器。全内反射抑制部件构造成使光线衍射或折射，或者消除折射率的差。由此，使得相对于基板表面具有超过全内反射临界角的角度发射的荧光逃离该表面，到达检测器。

[0051] 在空气中传播并入射到聚合物基板表面上的来自光源的激发光线将以由关系 (1) 给定的方向折射进基板中，由关系 (1) 可得出： $\sin \alpha_{ref} = n_1/n_2 \times \sin \alpha_{in}$ ，其中 α_{ref} 是基板内的折射光线与表面法线之间的角度， α_{in} 是空气中的入射光与所述表面法线之间的角度。因而，折射光由于下述事实而受到限制，即 n_1/n_2 大约为 $1/1.55 = 0.65$ ，且 α_{in} 小于 90 度，最终导致 $\alpha_{ref} \leq 40$ 度。

[0052] 图 1 示意性图解了用于光学分析装置的样品基板 1，该样品基板 1 具有彼此相对设置的反应位置表面 2 和基板表面 3。基板的反应位置表面还设置有布置成形成用于样品的毛细管流道的突出微结构，如微柱（没有示出）的图案。基板的尺寸优选适合形成用于光

学分析的一个或多个反应位置区域的适当载体,现有技术的微阵列滑块是具有 25mm×75mm 尺寸的矩形。基板的厚度例如大约为 1mm,宽度和长度例如在大约 1mm 和 100m 之间,形成大约矩形或正方形表面区域。基板的材料为折射率一般在 1.5 和 1.6 之间的具有适当光学特性,如有关光学辐射的透射率方面的光学特性的热塑性聚合物,如环烯聚合物或环烯共聚物。通过母结构的聚合物复制,如通过注模来制造聚合物基板。然而,可使用具有适当光学特性的其他基板材料,例如玻璃或硅。

[0053] 图 2 示意性图解了从位于电介质样品基板 1 的反应位置表面 2 上的荧光团 4 发射的激发电磁射线。由于空气和基板材料的不同光学特性,该发射是不对称的,发射光的强度在基板中比空气中大。因为基板对发射光线的波长具有较高透射率,所以从基板一侧检测激发的荧光是有利的。

[0054] 图 3 是示意性地图解从荧光团 Cy-5™ 薄层发射的不同发射角的强度的曲线,发射角定义为与表面法线的角度。(然而,对于给定的发射角,光将在 360° 上发射)。该曲线显示出荧光发射是高度各向异性的,峰值位于大约 50 度角处。这是比基板 / 空气界面的全内反射的临界角大的角度,因为依照上面的关系 (1),在具有 1.55 折射率的基板材料中传播并入射到基板 / 空气界面上的光线的全内反射的临界角为 40 度。因此,基板内发射的大部分荧光将以超过全内反射临界角的角度入射到基板表面的内侧,并陷在基板内。因而,该光不能以受控的方式到达位于基板表面外部的检测器。陷在基板内的一些光最终会在基板边缘处折射出基板,但该光通常不会达到检测器。如果反应位置表面设置突出微结构,则其还会影响全内反射的光学条件。

[0055] 然而,在依照本发明的荧光读取器中,基板表面设置有全内反射抑制部件,从而通过衍射或折射光线,或者通过改变基板材料与空气之间的折射率差来释放被俘的全内反射光线。由此,检测器件能够收集和检测大部分发射荧光,实现更可靠的检测和较高的性能。

[0056] 图 4 是示意性图解发射效率对激发入射角的依赖性的曲线,分别显示了相对于表面法线在两个不同的照射入射角,即 50 度和 180 度处的发射荧光的强度。该曲线显示出在光以相对于表面法线为 50 度的入射角从基板表面接近荧光团的情况下,在 30 和 60 度之间的间隔中不同发射角处的强度,以及在 180 度的入射角,即光在平行于所述表面法线的方向上接近荧光团的情况下,在不同发射角处的强度。显然,激发效率在 50 度的入射角,即大致与发射峰值一致的入射角处较大,如图 3 中所示。

[0057] 依照本发明的一个实施方式,通过选择激发辐射的入射角以与最大荧光发射角一致,可获得较高的发射效率。这可通过下述方式实现,即光源设置成将激发光线导入基板 1 中,从而以与最大发射角一致的入射角照射荧光层 4。然而,入射到基板表面 3 上的光线不能以比由关系 (1) : $\sin \alpha_{\text{ref}} = n_1/n_2 \times \sin \alpha_{\text{in}}$ 给定的一个角高的角折射进该表面。因为 α_{in} 小于 90 度,所以 $\sin \alpha_{\text{in}}$ 小于 1。空气 / 基板表面一般具有 n_1/n_2 为 $1/1.55 = 0.65$ 的值。因此, $\sin \alpha_{\text{ref}}$ 小于 0.65, α_{ref} 不能超过 40 度。因为相对于荧光层的入射角与折射角对应,所以入射角也小于 40 度,其小于理想的 50 度入射角。为了增大激发光线的入射角,依照本发明该实施方式的荧光读取器通过在入射激发光线的光路中设置在基板表面上的入射角控制部件照射基板表面 3,由此可通过获得相对于表面法线增大的入射角来提高性能。入射角控制部件通过衍射或折射注入的光线,或者通过改变基板材料与空气之间的折射率差增大折射角,相应也将增大入射角。

[0058] 图 5 示意性地图解了光学分析装置,其包括设置有例如 Cy-5™ 或 TransFluoSpheres™(Invitrogen Corporation) 的荧光层 4 的样品基板。荧光读取器包括照射基板表面 3 的光源 5 和检测透过所述表面 3 的检测器件 6,虚线表示表面法线。从荧光层 4 发射的荧光的强度在相对于所示表面法线大约为 50 度的最大发射角 8 处具有峰值。因为该角大于在基板表面 3 一侧处大约为 40 度的全内反射临界角,所以大部分发射的荧光陷在基板中,因此不能到达检测器 6。因而,通过在发射光线的光路中在基板表面上施加全内反射抑制部件,由此从基板释放受陷的光线,可提高检测的强度。

[0059] 为了获得增强的发射,光源 5 应以相对于所示表面法线的入射角 7 将激发光线注入到基板中,入射角 7 大致对应于 50 度的所述最大发射角 8。然而,由于空气与基板材料之间的折射率关系,不能获得该角。为了增大入射角和增强发射,在注入光线的光路中,在基板表面上设置入射角控制部件。

[0060] 在依照本发明的荧光读取器中,为了减少全内反射并释放受陷的发射光,在发射荧光的光路中,优选在发射光的最大发射波瓣的路径中在基板表面上设置全内反射抑制部件。此外,为了进一步增强荧光发射,在激发光线的路径中在基板表面上设置入射角控制部件,由此增大基板内激发光的入射角,从而获得大致与荧光的最大发射角一致的入射角。

[0061] 图 6-8a 示意性地图解了依照本发明第一方面的实施方式,其中全内反射抑制部件和入射角控制部件构造成在理想的方向上衍射或折射光线。全内反射抑制部件和入射角控制部件包括在发射的荧光光线和激发光线的光路上施加在样品基板的基板表面 3 上的凹凸结构 9。表面凹凸结构设计成衍射的或折射的,包括例如栅格或小面结构,提供了一种光线在其上衍射或折射到理想方向的表面。

[0062] 图 6 图解了第一个典型实施方式,其中全内反射抑制部件和入射角控制部件包括分为三个部分的表面凹凸结构 9,第一部分 11 组成了入射角控制部件,其包括形成设计为使激发光线以适当入射角进入基板的内沟道的入射部分,外层部分 12 组成了全内反射抑制部件,其形成用于使具有超过全内反射临界角的角度度的荧光光线透过基板表面的出射部分。出射部分 12 设计成从基板释放具有在全内反射临界角之下和之上的发射角的发射荧光光线,入射部分 11 设计成增大基板内的激发光线的入射角,从而超过由空气折射率和基板折射率之间的关系给定的折射角。

[0063] 因为荧光以较小的发射角 8 和较低强度发射,所以尤其是在荧光的最大发射波瓣的路径中,入射部分和出射部分的位置分别优选适应于反应位置表面上的荧光团的位置,例如使入射部分 11 位于荧光团正下方,并使出射部分 12 包围入射部分。

[0064] 本发明的另一个优点是,通过仅检测从表面凹凸结构的特定有限区域发射的荧光,或者通过施加仅覆盖基板表面的特定有限区域的全内反射抑制部件就可分析反应位置区域的特定区域。

[0065] 例如通过 e 束光刻、栅格刻线机、全息干涉方法、金刚石点切削、硅微机械加工等产生表面凹凸,凹凸结构例如是正弦形的、三角形的或梯形的。表面凹凸通过复制方法,像注塑模一样从母结构转印到聚合物基板上。表面凹凸例如可形成为小面的一维或二维图案,其设计成传输未偏差的光线或者将发射光聚焦到检测器件上。

[0066] 图 7 图解了具有小面角度 α 、深度 D 和间距 P 的小面结构,其深度和间距在次微米范围中,高达几百微米。如果使用相干光源,如激光,则表面凹凸将是衍射性质的。如果使

用非相干光源,如 LED,表面凹凸将是折射性质的。

[0067] 从荧光团发射的光线以根据发射角和相对于荧光团,例如图 6 中所示位于内沟道 11 正上的荧光团的线的位置而在基板表面上变化的入射角入射到基板表面上。因此,依照凹凸结构的另一个实施方式,衍射或折射结构的设计设置成根据入射的发射光线的入射角而在出射部分的表面上变化,以进一步提高全内反射抑制功能。

[0068] 依照另一个实施方式的荧光读取器,其中光源的位置相对于基板是固定的,衍射或折射结构的设计设置成根据激发光束的强度分布而在入射部分的表面上变化,以实现激发光的聚焦。

[0069] 图 8a 是具有荧光层 4 和设置有表面凹凸结构 9 的基板表面 3 的样品基板的横截面图,其一个部分是用作全内反射抑制部件,另一个部分是用作入射角控制部件,通过这两个部分分别传输激发的光线和发射的荧光光线。

[0070] 图 8b 图解了依照第一个方面的另一个实施方式的荧光读取器,显示了依照图 8a 的样品基板,其进一步设置有设置成接收透过表面凹凸 9 的荧光的光收集透镜 13,以提高到达检测器件(没有示出)的发射光的强度,由此进一步提高性能。

[0071] 图 9 示意性图解了依照本发明第二个方面的适用于包括设置有荧光层 4 的样品基板 1 的光学分析装置的荧光读取器 10,其中全内反射抑制部件包括适当材料,如聚合物材料或玻璃的光收集部分 15。依照第一个实施方式,光收集部分 15 具有对应于基板材料折射率或比其大的折射率。光收集部分物理上与该表面接触设置,优选在光学上浸润接触设置,以“打开”基板表面,使具有超过全内反射临界角的发射角的荧光光线逃离基板并进入部分 12 中。此外,光收集部分的形状例如通过在该部分的内表面上全内反射的方式收集并聚焦荧光光线,从而使光线到达安装在光收集部分上的检测器件 6。因而,图解的光收集部分用作全内反射抑制器和光收集器。由此,到达检测器件 6 的发射荧光的强度增加,提高了光学分析装置的性能。

[0072] 依照第二个实施方式,光收集部分设置有用作光导向器件的输入端口 14,其设置成控制来自光源的光线的方向,以将激发光导入基板 1 中,从而例如获得大致与荧光的最大发射角一致的入射角。光收集部分 15 的光学特性使激发光线相对于设置在反应位置表面上的荧光层以适当的入射角进入基板。由此,更有利于激发荧光层,并发射更多的荧光,由此进一步提高光学分析装置的性能。

[0073] 依照其他的实施方式,光收集部分 15 设置有一个或多个输入端口(图中没有示出),其例如设置成用作镜面反射的激发光线的光束收集器。

[0074] 图 10 示意性图解了依照本发明第三个方面的适用于包括设置有荧光层 4 的样品基板 1 的光学分析装置的荧光读取器,其中全内反射抑制部件 16 构造成通过包含适当材料的光学浸润层来改变表面处的折射率差。因为由上面的关系 (1) 得出 $\alpha_{in(TIR)} = n_2/n_1$, 所以如果减小折射率差,从而增加 n_2/n_1 , 则更多的荧光会透过表面。

[0075] 依照第一个实施方式,荧光读取器包括光源 5、检测器 6 和设置成将发射的荧光聚焦到检测器 6 上的透镜器件 17。透镜器件 17 设置有全内反射抑制部件 16,该全内反射抑制部件 16 包括物理上与基板表面 3 接触设置的具有适当折射率的适当材料层。该层的材料优选为软质聚合物,如硅、环氧树脂、聚氨酯(polyurethane)或丙烯酸酯,其施加作为透镜器件 17 表面上的光学浸润层,在该层与表面之间不具有空气。由此,传播到透镜

的光线不穿过任何空气层,这将导致在较高角度处丧失反射。选择软质聚合物材料的其他优点是,其能在不完全均匀或平坦的表面上形成光学浸润层。此外,选择该层的材料对于透过的发射光线或激发光线具有适当的光透射特性,如低荧光和低散射,层 16 的厚度在几微米和几毫米之间。该层折射率的适当值在聚合物基板材料折射率与透镜器件折射率的值之间,透镜器件的折射率最大。物理上与基板表面 3 接触对接的全内反射抑制光学浸润层 16 释放陷进基板的荧光光线,并能使大部分发射光线被检测器 6 收集。

[0076] 光源 5 设置成照射样品基板 1 的基板表面 3,检测器件 6 设置成检测从样品基板的反应位置表面上的荧光层 4 发射的并透过基板表面 3 的荧光。光源 5 将激发光线注入基板中,荧光的最大发射角通常超过全内反射的角度。然而,在透镜器件 17 上施加了作为全内反射抑制部件的光学浸润层 16,从而可通过增加全内反射的角度提高逃离该表面的光的强度。

[0077] 依照可选择的实施方式(在图中没有示出),在检测器件适于收集发射光而没有任何聚焦部件的情形中,光学浸润层 16 直接施加在检测器件 6 上。优选地,检测器件如此设置,即光学浸润层物理上与基板表面 3 接触地对接。

[0078] 此外,根据光学分析装置的构造,光学浸润层 16 大致覆盖整个透镜 17 或检测器件 6,或者可选择地,覆盖检测器件 6 或透镜 17 的表面的适当部分。

[0079] 依照可选择的实施方式(在图中没有示出),在基板表面 3 上施加入射角控制部件,以通过改变表面处的折射率差增大激发光线相对于表面法线的入射角。因为入射角对应于由关系 $\sin \alpha_{\text{ref}} = n_1/n_2 \times \sin \alpha_{\text{in}}$ 给定的折射角,所以折射率差的变化将影响入射角。依照该实施方式,入射角控制部件包括在注入的激发光线的光路中在基板表面上施加的具有适当折射率的光学浸润材料层。如果光学浸润层的折射率大于空气的折射率,则 n_1/n_2 增加,这导致较大的 α_{ref} 和较大的入射角。最终的入射角优选与荧光的最大发射角一致,从而发射更多的荧光。可选择地,光学浸润层可施加在设置成控制激发光线的方向的光导向器件(图中没有示出)的表面上。

[0080] 依照本发明的第四个方面,全内反射抑制部件包括参照图 6-8 所述的依照本发明第一个方面的表面凹凸结构 9 和参照图 9 所述的依照第二个方面的光收集部分 15。光收集部分优选靠近基板表面设置,如设置在距表面小于大约 1mm 的距离处。通过组合表面凹凸结构 9 和光收集部分 15,实现了改善的全内反射的抑制,同时通过光收集部分提供了改善的发射光的收集。

[0081] 为了进一步提高光学分析装置的性能,给如上所述依照本发明任意方面实现的荧光读取器设置适当的滤波器,如光谱滤波器和偏振滤波器,以阻止任何激发光线到达检测器。因为一部分激发光线被反射,透过基板并从基板表面释放以被检测器件检测,所以检测器件优选设置移除激发光线波长的光谱滤波器。然而,来自例如激光二极管或发光二极管(LED)的光的激发光线的光谱一般具有延伸到发射荧光的波长区域中的拖尾,发射荧光的波长区域依赖于荧光层中荧光团的类型。因为荧光的波长不能被检测器滤波器移除,所以激发光源优选设置有移除该拖尾的光谱滤波器。因而,依照其他典型实施方式的荧光读取器,检测器设置有移除激发光线和任何其他不希望的光源的波长的光谱滤波器,光源设置有移除与荧光一致的波长的光谱滤波器。因此,检测器滤波部件的切断频率必须适应于光源滤波部件的切断频率,避免激发光和检测光的波长范围之间的任何交迭,由此进一步提

高荧光读取器的效率。

[0082] 为了阻止任何激发光到达检测器,另一个典型实施方式的荧光读取器设置成对于激发光和发射荧光的测量使用不同的、正交放置的几何平面,例如用于激发的几何 yz -平面和用于测量发射的几何 xz -平面。

[0083] 依照另一个实施方式的荧光读取器,通过给光源和检测器(如果需要的话)设置偏振滤波器来阻止激发光线到达检测器。如果样品基板具有低双折射,一个典型的设置是彼此垂直对准两个偏振器。由此,只有与检测器的偏振滤波器平行偏振的荧光才被检测。可选择地,如果双折射改变并可被忽略掉,则一个偏振器必须旋转适当的角度,以移除激发光,由此进一步提高荧光读取器的性能。

[0084] 因而,如上所述,通过给扫描或成像荧光读取器设置适当的全内反射抑制部件、入射光控制部件、透镜和光导向器件、以及光谱和/或偏振滤波器,可获得较高性能的光学分析装置。

[0085] 然而,本发明并不限于图中所述的实施方式,而是可在所附权利要求的范围内自由变化。

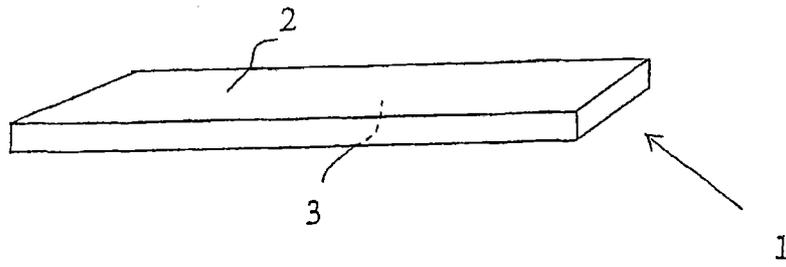


图 1

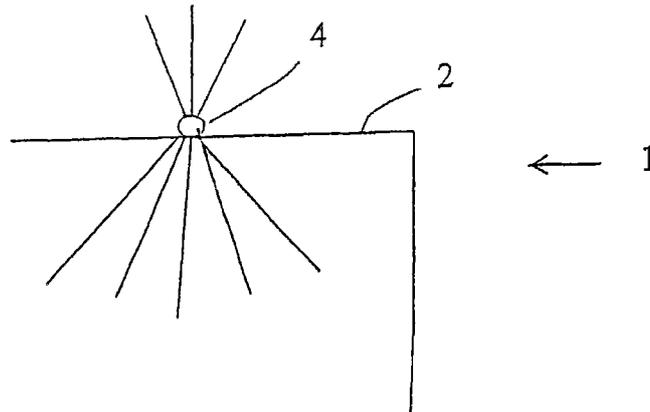


图 2

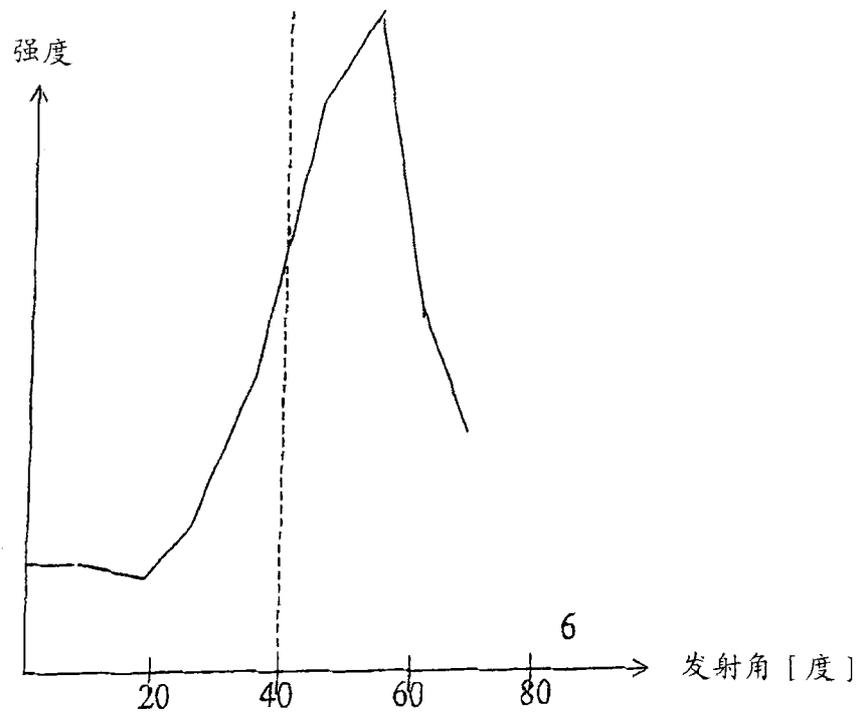


图 3

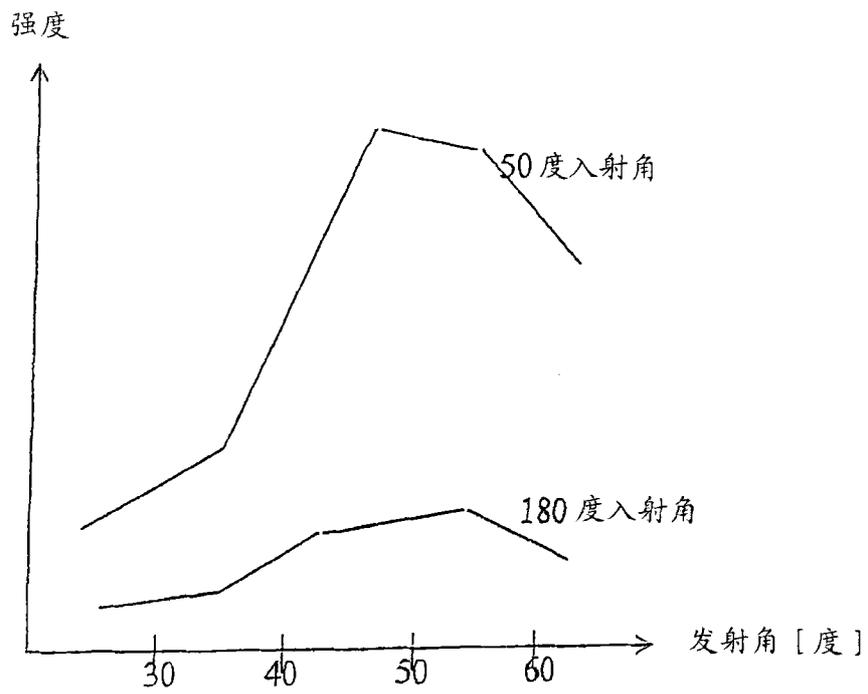


图 4

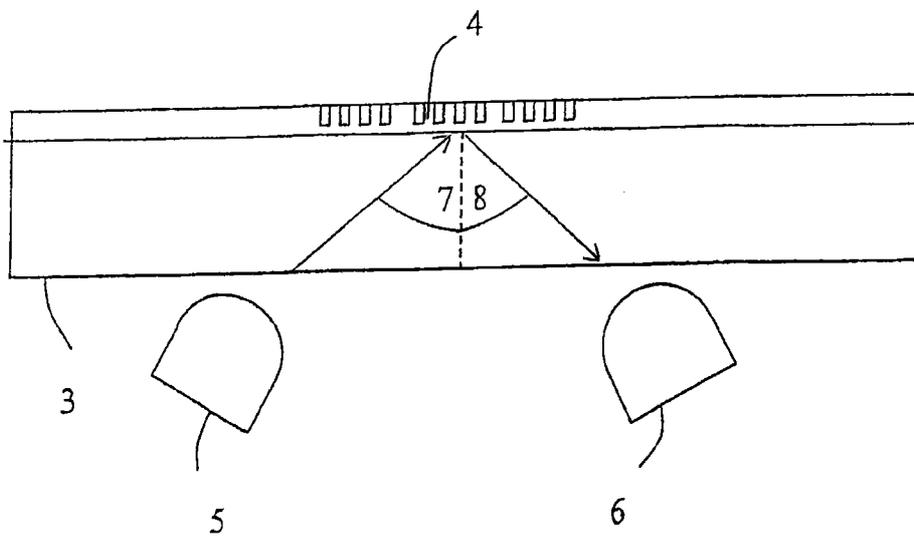


图 5

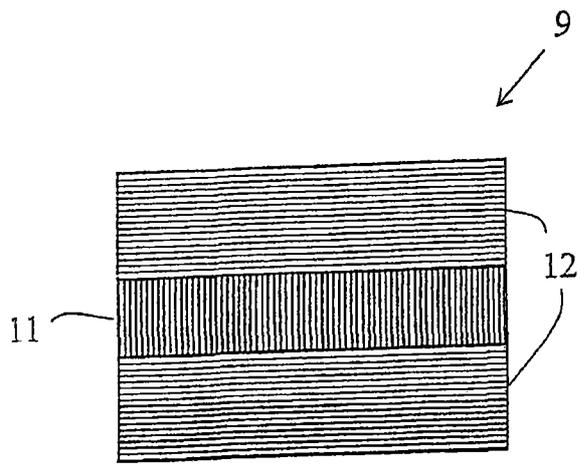


图6

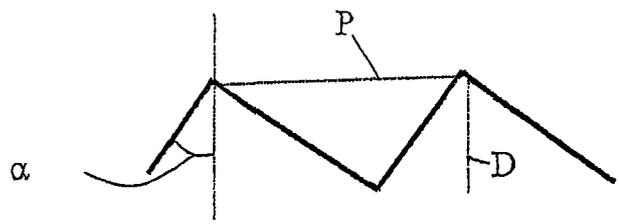


图7

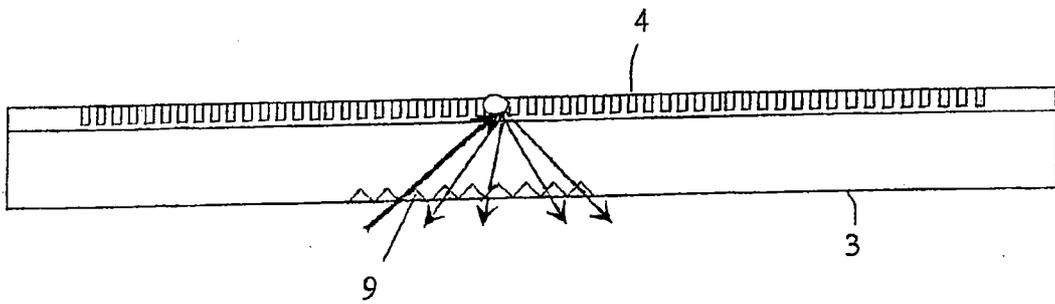


图8a

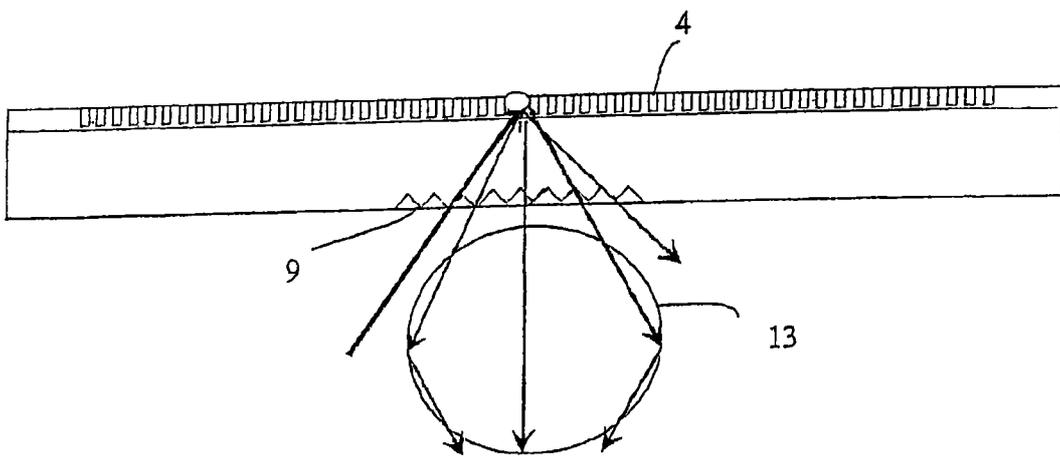


图8b

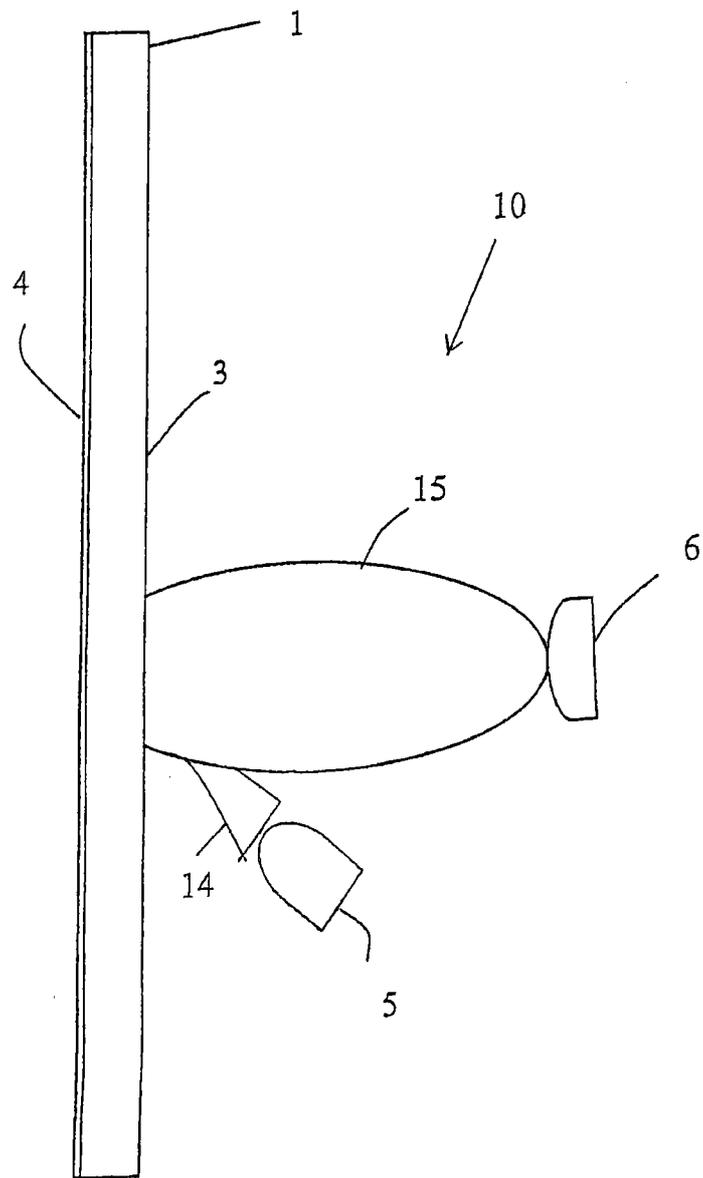


图 9

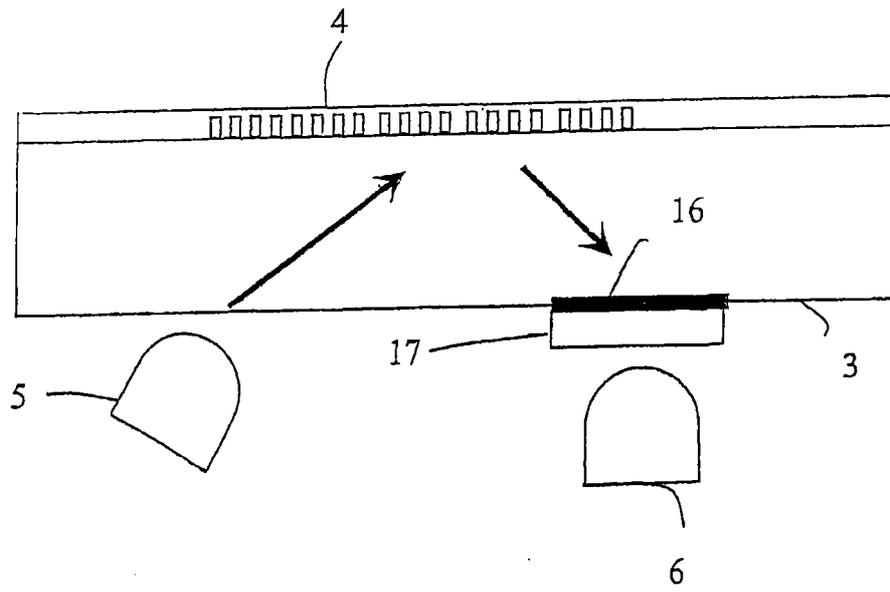


图 10