



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102272584 A

(43) 申请公布日 2011. 12. 07

(21) 申请号 201080004403. 3

代理人 郭玥 张一军

(22) 申请日 2010. 01. 15

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

G01N 21/64 (2006. 01)

2009-011565 2009. 01. 22 JP

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 07. 12

(86) PCT申请的申请数据

PCT/JP2010/000201 2010. 01. 15

(87) PCT申请的公布数据

W02010/084719 JA 2010. 07. 29

(71) 申请人 三井造船株式会社

地址 日本东京都

(72) 发明人 星岛一辉 中田成幸

(74) 专利代理机构 北京万慧达知识产权代理有限公司 11111

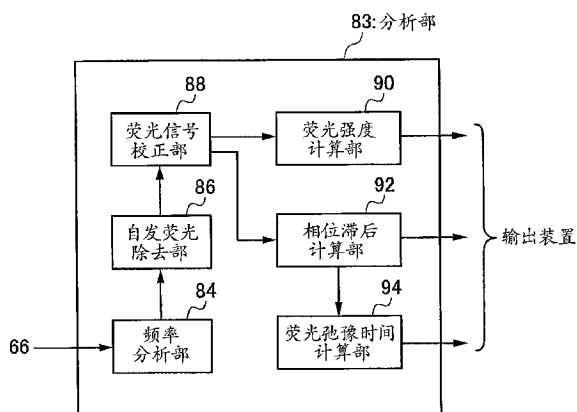
权利要求书 3 页 说明书 11 页 附图 6 页

(54) 发明名称

荧光检测装置及荧光检测方法

(57) 摘要

本发明提供一种荧光检测装置及荧光检测方法,在该荧光检测装置中,相对于 n 种测量对象物发出的各荧光,在按照测量对象物 k(k = 1 ~ n 的整数) 发出的荧光的荧光强度相对于其它测量对象物发出的荧光的荧光强度高的方式设定的多个波段 FL_k(k = 1 ~ n 的整数) 接收荧光,并得到对应于波段 FL_k 的荧光信号,通过将各荧光信号与对对应于波段 FL_k 的至少一个波段的激光 L_k(k = 1) 进行强度调制的调制信号混合并进行降频转换,生成包括荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据,对该荧光数据进行校正,由此计算出相位滞后,并根据该相位滞后计算出荧光弛豫时间。



1. 一种荧光检测装置,该装置接收 n 种 (n 是 2 以上的整数) 测量对象物受到激光照射后发出的荧光,且对所接收的荧光的多个荧光信号进行信号处理,该荧光检测装置包括:

光源部,相对于所述 n 种测量对象物的各个测量对象物,利用多个不同频率对按照测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的光吸收特性与其它测量对象物的光吸收特性不同的方式与测量对象物 k 相对应地准备的多个波长的激光 L_k 进行强度调制,并作为一个照射光发射;

受光部,包括多个受光元件,其中,相对于 n 种测量对象物被照射光照射后所发出的各个荧光,在按照测量对象物发出的荧光的荧光强度与其它测量对象物发出的荧光的荧光强度不同的方式与测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 相对应地设定的多个波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中接收荧光,并输出对应于波段 FL_k 的荧光信号;

第一处理部,将对与所述波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中至少一个波段对应的激光 L_k 进行强度调制的调制信号作为第一参照信号使用,并通过将该调制信号与所输出的各所述荧光信号混合且进行降频转换处理,由此生成包括所述荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据;

第二处理部,对已生成的所述荧光数据进行校正,并利用该校正后的荧光数据求出所述荧光信号的相位滞后,并根据该相位滞后计算出荧光弛豫时间。

2. 根据权利要求 1 所述的荧光检测装置,其特征在于:所述第二处理部利用所述光源部、所述受光部以及所述第一处理部,存储包括对 n 种测量对象物分别单独测量得到的基准相位滞后和基准强度振幅的基准荧光数据,并利用由该基准荧光数据构成的系数,对在所述第一处理部得到的荧光数据进行校正。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的荧光检测装置,其特征在于:所述激光 L_k 的波长按照测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的光吸收相对于其它测量对象物的光吸收高的方式设定。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的荧光检测装置,其特征在于:所述受光部的所述多个波段 FL_k 按照测量对象物发出的荧光的荧光强度相对于其它测量对象物发出的荧光的荧光强度高方式设定。

5. 根据权利要求 4 所述的荧光检测装置,其特征在于:从在波段 FL_m ($m = 1 \sim n$ 的整数) 的受光元件输出的测量对象物 k 的荧光信号生成所述基准荧光数据,并将所述基准荧光数据表示为 $a_{km} \cdot e^{(-i \theta_{km})}$ (a_{km} 是所述基准强度振幅、 θ_{km} 是所述基准相位滞后) 时,将所述第一处理部生成的在波段 FL_m 的所述荧光数据用复数 A_s' ($s = 1 \sim n$ 的整数) 表示,校正后的荧光数据用复数 A_s ($s = 1 \sim n$) 表示时,通过下述式 (1) 根据 A_s' 计算出 A_s 。

[数 1]

$$\begin{Bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ \vdots \\ A_n \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & \frac{a_{21}}{a_{22}} e^{-i(\theta_{21}-\theta_{22})} & \frac{a_{31}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{31}-\theta_{33})} & \dots \\ \frac{a_{12}}{a_{11}} e^{-i(\theta_{12}-\theta_{11})} & 1 & \frac{a_{32}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{32}-\theta_{33})} & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \frac{a_{1n}}{a_{11}} e^{-i(\theta_{1n}-\theta_{11})} & \frac{a_{2n}}{a_{22}} e^{-i(\theta_{2n}-\theta_{22})} & \frac{a_{3n}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{3n}-\theta_{33})} & \dots \end{bmatrix}^{-1} \begin{Bmatrix} A'_1 \\ A'_2 \\ \vdots \\ \vdots \\ A'_n \end{Bmatrix} \quad (1)$$

6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的荧光检测装置,其特征在于:在所述第一处理部生成的所述荧光数据在将不同的两个波段的荧光强度绘图在由纵轴以及横轴构成的坐标的散布图中没有位于规定的范围时,所述第二处理部将所述荧光数据作为所述校正对象选择,在所述荧光数据位于所述规定的范围时,将所述荧光数据不作为所述校正对象选择。

7. 根据权利要求 6 所述的荧光检测装置,其特征在于:

所述测量对象物按照测量对象粒子上附着荧光色素的方式构成,

所述规定的范围是以所述测量对象粒子没有与所述荧光色素附着的状态下,利用所述荧光检测装置测量的、所述测量对象粒子所发出的自发荧光的范围。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的荧光检测装置,其特征在于:所述测量对象物包括第一分子的能量通过 FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) 向第二分子移动的所述第一分子和所述第二分子,并将所述第一分子和所述第二分子作为组,准备多种的该组,以构成所述 n 种测量对象物。

9. 根据权利要求 1 至 8 所述的荧光检测装置,其特征在于:所述第一处理部将所述波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的一个波段作为第一波段,并将对与该波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 对应的激光 L_k 进行强度调制的调制信号规定为第一参照信号,并进行所述荧光信号的降频转换处理,将具有与所述第一参照信号的频率不同的频率的调制信号的、相对于所述第一参照信号的差分信号作为第二参照信号使用,并将所述降频转换处理的结果进一步通过降频转换处理,由此生成包括所述相位滞后和强度振幅的荧光数据。

10. 一种荧光检测方法,其中,接收 n 种 (n 是 2 以上的整数) 测量对象物受到激光照射后发出的荧光,且对所得到的多个荧光信号进行信号处理,该荧光检测方法的特征在于包括以下步骤:

第一步骤,相对于所述 n 种测量对象物的各个测量对象物,利用多个不同频率对按照测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的光吸收特性与其它种测量对象物的光吸收特性不同的方式与测量对象物 k 相对应地准备的多个波长的激光 L_k 进行强度调制,并作为一个照射光发射;

第二步骤,相对于 n 种测量对象物被照射光照射后所发出的各个荧光,在按照测量对象物 k 发出的荧光的荧光强度与其它测量对象物发出的荧光的荧光强度不同的方式与测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 对应地设定的多个波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中接收荧光,并输出对应于波段 FL_k 的荧光信号;

第三步骤,对与所述波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中的至少一个波段对应的激光 L_k 进

行强度调制的调制信号作为第一参照信号使用,并通过对该调制信号与所输出的各个所述荧光信号混合且进行降频转换处理,由此生成包括所述荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据;

第四步骤,对已生成的所述荧光数据进行校正,并利用校正后的荧光数据求出所述荧光信号的相位滞后,并根据该相位滞后计算出荧光弛豫时间。

11. 根据权利要求 10 所述的荧光检测方法,其特征在于:利用所述第一步骤、所述第二步骤以及所述第三步骤,预先存储包括对 n 种测量对象物分别单独测量所得到的基准相位滞后和基准强度振幅的基准荧光数据,并利用由该基准荧光数据构成的矩阵,进行所述第四步骤的校正。

12. 根据权利要求 10 或 11 所述的荧光检测方法,其特征在于:所述激光 L_k 的波长按照测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的光吸收相对于其它种测量对象物的光吸收高的方式设定。

13. 根据权利要求 10 至 12 任一项所述的荧光检测方法,其特征在于:所述多个波段 FL_k 按照测量对象物发出的荧光的荧光强度相对于其它测量对象物发出的荧光的荧光强度高方式设定。

14. 根据权利要求 13 所述的荧光检测方法,其特征在于:从在波段 FL_m ($m = 1 \sim n$ 的整数) 的受光元件输出的测量对象物 k 的荧光信号生成所述基准荧光数据,并将所述基准荧光数据表示为 $a_{km} \cdot e^{-i\theta_{km}}$ (a_{km} 是所述基准强度振幅、 θ_{km} 是所述基准相位滞后) 时,将所述第三步骤生成的在波段 FL_m 的所述荧光数据用复数 A'_s ($s = 1 \sim n$ 的整数) 表示,校正后的荧光数据用复数 A_s ($s = 1 \sim n$) 表示时,通过下述式 (1) 根据 A'_s 计算出 A_s 。

[数 2]

$$\begin{Bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ \vdots \\ A_n \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & \frac{a_{21}}{a_{22}} e^{-i(\theta_{21}-\theta_{22})} & \frac{a_{31}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{31}-\theta_{33})} & \dots & \dots \\ \frac{a_{12}}{a_{11}} e^{-i(\theta_{12}-\theta_{11})} & 1 & \frac{a_{32}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{32}-\theta_{33})} & \dots & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \frac{a_{1n}}{a_{11}} e^{-i(\theta_{1n}-\theta_{11})} & \frac{a_{2n}}{a_{22}} e^{-i(\theta_{2n}-\theta_{22})} & \frac{a_{3n}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{3n}-\theta_{33})} & \dots & \dots \end{bmatrix}^{-1} \begin{Bmatrix} A'_1 \\ A'_2 \\ \vdots \\ \vdots \\ A'_n \end{Bmatrix} \quad (1)$$

15. 根据权利要求 10 至 14 任一项所述的荧光检测方法,其特征在于:在所述第三步骤中,将所述波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的一个波段作为第一波段,并对与该波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 对应的激光 L_k 进行强度调制的调制信号作为第一参照信号来规定,并进行所述荧光信号的降频转换处理,且将具有与所述第一参照信号的频率不同的频率的调制信号的、相对于所述第一参照信号的差分信号作为第二参照信号使用,并将所述降频转换处理的结果进一步通过降频转换处理,由此生成包括所述相位滞后和强度振幅的荧光数据。

荧光检测装置及荧光检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及一种接收分析对象物上附着荧光色素的测量对象物受到激光照射后发出的荧光的荧光信号,并对该荧光的荧光信号进行处理的荧光检测装置及荧光检测方法。

背景技术

[0002] 流式细胞仪在医疗、生物领域中广泛应用。该流式细胞仪用光电倍增管或者雪崩光电二极管等光电转换器接收测量对象物受到激光照射后发出的荧光,并分析细胞或者基因等测量对象物的种或频率或特性。

[0003] 具体来说,流式细胞仪用荧光试剂将浑浊液中的细胞、DNA、RNA、酶、蛋白等的活体物质等的分析对象物标签化而制作测量对象物,且施加压力使测量对象物在以每秒大约10m 以内的速度在管道内流动的鞘液中流动,由此形成分层鞘流。通过流式细胞仪向该流动中的测量对象物照射激光,由此流式细胞仪接收测量对象物上附着的荧光色素发出的荧光,并将该荧光作为标签进行识别,由此特定分析对象物。

[0004] 该流式细胞仪例如能够测出 DNA、RNA、酶、蛋白质等的细胞内的相对量,并在短时间内能够分析这些对象物的作用。另外,可使用通过荧光对特定类型的细胞或染色体进行特定、并仅在特定的细胞或染色体以活着的状态下短时间内进行分选收集的细胞分类器等。

[0005] 在该流式细胞仪的使用中,要求在短时间内根据荧光信息对更多的测量对象物进行正确特定。

[0006] 下述专利文献 1 中记载有通过计算出测量对象物受到激光照射后发出的荧光的荧光寿命(荧光弛豫时间),能够在短时间内对更多的测量对象物进行正确特定的荧光检测装置及方法。

[0007] 该专利文献记载了以下内容:对激光进行强度调制并照射至测量对象物上,并求出从测量对象物发出的荧光的荧光信号相对于用于激光强度调制的调制信号的相位滞后,并根据该相位滞后计算出荧光弛豫时间。

[0008] 但是,测量对象物发出的荧光有多种,识别这些荧光存在以下问题。

[0009] 即,对发出多种荧光的测量对象物进行测量时,利用按照对应于各荧光波长的方式利用滤波器等使之分为多个波段的光电转换器。但是,被激光激发后所发出的荧光的波段很宽,因此荧光被多个光电转换器接收。即,一个光电转换器生成的荧光信号,不一定是一种荧光信号,是与其它荧光混合的信号。

[0010] 因此,即使是利用这样的与其它信号混合的荧光信号求出相位滞和计算出荧光弛豫时间,但是得不到高精度的荧光弛豫时间。

[0011] 专利文献

[0012] 专利文献 1:特开 2006-226698 号公报

发明内容

[0013] 因此,本发明的目的在于,为了解决上述课题,提供一种能够接收 n 种 (n 是 2 以上的整数) 测量对象物受到激光照射后发出的荧光,且在对所接收的荧光的多个荧光信号进行信号处理时,能够计算出高精度的荧光弛豫时间的荧光检测装置以及荧光检测方法。

[0014] 本发明的一个实施方式涉及下述的荧光检测装置,其中,接收 n 种 (n 是 2 以上的整数) 测量对象物受到激光照射后发出的荧光,且对所得到的多个荧光信号进行信号处理。

[0015] 即,荧光检测装置包括:

[0016] (A) 光源部,相对于所述 n 种测量对象物的各个测量对象物,利用多个不同频率对按照测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的光吸收特性与其它测量对象物的光吸收特性不同的方式与测量对象物 k 相对应地准备的多个波长的激光 L_k 进行强度调制,并作为一个照射光发射;

[0017] (B) 受光部,包括多个受光元件,其中,相对于 n 种测量对象物被照射光照射后所发出的各个荧光,在按照测量对象物 k 发出的荧光的荧光强度与其它测量对象物发出的荧光的荧光强度不同的方式与测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 相对应地设定的多个波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中接收荧光,并输出对应于波段 FL_k 的荧光信号;

[0018] (C) 第一处理部,将对与所述波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中至少一个波段对应的激光 L_k 进行强度调制的调制信号作为第一参照信号使用,并通过将该调制信号与所输出的各所述荧光信号混合且进行降频转换处理,由此生成包括所述荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据;

[0019] (D) 第二处理部,对已生成的所述荧光数据进行校正,并利用校正后的荧光数据求出所述荧光信号的相位滞后,并根据该相位滞后计算出荧光弛豫时间。

[0020] 另外,本发明的其它实施方式涉及荧光检测方法,其中,接收 n 种 (n 是 2 以上整数) 测量对象物受到激光照射后发出的荧光,且对所得到的多个荧光信号进行信号处理。

[0021] 即,荧光检测方法包括以下步骤:

[0022] (E) 第一步骤,相对于所述 n 种测量对象物的各个测量对象物,利用多个不同频率对按照测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 的光吸收特性与其它种测量对象物的光吸收特性不同的方式与测量对象物 k 相对应地准备的多个波长的激光 L_k 进行强度调制,并作为一个照射光发射;

[0023] (F) 第二步骤,相对于 n 种测量对象物被照射光照射后所发出的各个荧光,在按照测量对象物 k 发出的荧光的荧光强度与其它测量对象物发出的荧光的荧光强度不同的方式与测量对象物 k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 对应地设定的多个波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中接收荧光,并输出对应于波段 FL_k 的荧光信号;

[0024] (G) 第三步骤,对与所述波段 FL_k ($k = 1 \sim n$ 的整数) 中的至少一个波段对应的激光 L_k 进行强度调制的调制信号作为第一参照信号使用,并通过将该调制信号与所输出的各个所述荧光信号混合且进行降频转换处理,由此生成包括所述荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据;

[0025] (H) 第四步骤,对已生成的所述荧光数据进行校正,并利用校正后的荧光数据求出所述荧光信号的相位滞后,并根据该相位滞后计算出荧光弛豫时间。

[0026] 在上述实施方式的荧光检测装置及荧光检测方法中,对包括荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据进行校正,并利用校正后的荧光数据求出荧光信号的相位滞后,并根据该相位滞后计算出荧光弛豫时间,因此能够同时对荧光强度和荧光弛豫时间进行校正,且接收荧光时能够除去由于其它荧光混合而导致的影响。由此,能够在短时间内计算出高精度的荧光弛豫时间。

[0027] 特别是,由于在将两个荧光波段的荧光强度绘图在由纵轴和横轴构成的坐标中的散布图中,根据绘图荧光信号的位置,进行荧光数据的选择或不选择,所以能够进行更高精度的校正。

附图说明

[0028] 图 1 是采用本发明的强度调制激光的荧光检测装置的流式细胞仪的概略构成图;

[0029] 图 2 是用于图 1 所示的流式细胞仪的光源部的一个例的概略构成图;

[0030] 图 3 是用于图 1 所示的流式细胞仪的受光部的一个例的概略构成图;

[0031] 图 4 是用于图 1 所示的流式细胞仪的控制和处理部的一个例的概略构成图;

[0032] 图 5 是用于图 1 所示的流式细胞仪的分析装置的一个例的概略构成图;

[0033] 图 6 是表示用图 1 所示的流式细胞仪得到的自发荧光的测量范围的图;

[0034] 图 7(a) 以及 (b) 是表示荧光蛋白的光吸收特性以及荧光特性的图。

[0035] 附图标记说明

[0036] 10 :流式细胞仪

[0037] 12 :样品

[0038] 20 :信号处理装置

[0039] 22 :激光光源部

[0040] 22a、22b :光源

[0041] 23a、26b :分色镜

[0042] 23b、26a :透镜系统

[0043] 24、26 :受光部

[0044] 26c1、26c2 :带通滤波器

[0045] 27a、27b :光电转换器

[0046] 28 :控制和处理部

[0047] 30 :管道

[0048] 32 :回收容器

[0049] 34a、34b :激光驱动器

[0050] 48a、48b :功率分配器

[0051] 40 :信号生成部

[0052] 42 :信号处理部

[0053] 44 :控制器

[0054] 46a、46b :振荡器

[0055] 49、62 :低通滤波器

[0056] 50a、50b、52、54a、54b、64 :放大器

- [0057] 58a、58b、47 :IQ 混频器
- [0058] 60 :系统控制器
- [0059] 66 :A/D 转换器
- [0060] 80 :分析装置
- [0061] 81 :CPU
- [0062] 82 :存储器
- [0063] 83 :分析部
- [0064] 84 :频率分析部
- [0065] 86 :自发荧光除去部
- [0066] 88 :荧光信号校正部
- [0067] 90 :荧光强度计算部
- [0068] 92 :相位滞后计算部
- [0069] 94 :荧光弛豫时间计算部

具体实施方式

[0070] 以下,针对适用本发明荧光检测装置的流式细胞仪进行详细的说明。

[0071] 图 1 是采用一个实施方式的强度调制激光的荧光检测装置的流式细胞仪 10 的概略构成图。

[0072] 流式细胞仪 10 包括信号处理装置 20 和分析装置(计算机)80。信号处理装置 20 朝向作为测量对象的样品 12 照射激光,并对样品 12 发出的荧光的荧光信号进行检测以进行信号处理。分析装置(计算机)80 根据信号处理装置 20 中得到的处理结果,计算出荧光强度或者荧光弛豫时间。作为样品 12,下面利用两个细胞(测量对象粒子)活体结合、且以分别放入到细胞内的荧光蛋白能够引起 FRET(荧光共振能量转移, Fluorescence Resonance Energy Transfer) 的程度近距离位置的样品进行说明。FRET 是指,第一分子的能量没有经过发光的状态下转移到第二分子的现象。样品 12 的构成为一方的细胞内放入有荧光蛋白 X_1 ,另一方的细胞内放入有荧光蛋白 X_2 ,且细胞之间活体结合。

[0073] 信号处理装置 20 包括激光光源部 22、受光部 24、26、控制和处理部 28、管道 30。

[0074] 控制和处理部 28 包括:控制部,对从激光光源部 22 发射的激光按照特定频率进行强度调制;信号处理部,对样品 12 发出的荧光的荧光信号进行信号处理。

[0075] 在管道 30 中,使样品 12 包括在形成高速流的鞘液中一起流动,由此形成分层鞘流。在管道 30 的出口处设置有回收容器 32。在流式细胞仪 10 的构成中也可以配置用来通过激光照射在短时间内分离出样品 12 中的特定细胞等活体物质的细胞分类器,以将其分离于各自的回收容器中。

[0076] 激光光源部 22 是发射两束不同波长激光,例如发射 $\lambda_1 = 408\text{nm}$ 、 $\lambda_2 = 473\text{nm}$ 的激光的部分。透镜系统按照使激光聚焦在管道 30 中规定位置的方式设置,并在该聚焦位置上形成样品 12 的测量点。

[0077] 图 2 是表示激光光源部 22 构成的一个例的图。

[0078] 激光光源部 22 发射具有可见光区域波长且进行强度调制的激光。激光光源部 22 包括激光二极管的光源 22a 和激光二极管的光源 22b。光源 22a 将 408nm 波长的激光 L_1 作

为 CW(连续波)激光发射,且对该 CW 激光 L_1 以用特定频率进行强度调制的同时发射。光源 22b 将 473nm 波长的激光 L_2 作为 CW(连续波)激光发射,且对该 CW 激光强度以用特定频率进行强度调制。进一步,激光光源部 22 包括分色镜 23a、透镜系统 23b、激光驱动部 34a、34b。

[0079] 分色镜 23a 使特定波段的激光透射,使其它波段的激光反射。透镜系统 23b 使由激光 L_1 和 L_2 构成的激光 L_1+L_2 聚焦在管道 30 中的测量点上。激光驱动器 34a 和 34b 分别驱动光源 22a 和光源 22b。

[0080] 作为发射这样的激光的光源,例如,可以利用半导体激光器。

[0081] 激光的输出功率是例如约 5 ~ 100mW。这些激光按照样品 12 的两个荧光蛋白 X_1 、 X_2 中一方的荧光蛋白的光吸收特性(光吸收率)高于另一方的荧光蛋白的光吸收特性(光吸收率)的方式分别对应于荧光蛋白 X_1 、 X_2 准备。另外,在本实施方式中,激光波长按照一方的荧光蛋白的光吸收(光吸收率)高于另一方的荧光蛋白的光吸收(光吸收率)的方式设定,但是激光波长还可以按照一方的荧光蛋白的光吸收(光吸收率)与另一方的荧光蛋白的光吸收(光吸收率)不同的方式设定。

[0082] 另一方面,用于对激光 L_1 和 L_2 进行强度调制的频率(调制频率),其周期与荧光弛豫时间相比稍长,例如 10 ~ 50MHz。对激光 L_1 和 L_2 进行强度调制的频率不同。这是因为通过使被激光激发的样品 12 发出的荧光的频率互为不同,得知所接收的荧光来自哪个激光的激发所产生的荧光,并分离荧光信息。

[0083] 分色镜 23a 透射激光 L_1 、反射激光 L_2 的分色镜。通过该构成激光 L_1 和 L_2 被合成而形成成为照射测量点样品 12 的一束照射光。

[0084] 光源 22a、22b 在预先规定好的波段振荡,以使激光 L_1 、 L_2 通过激发荧光色素使其发射出特定波段的荧光。样品 12 的构成为,被激光 L_1 、 L_2 激发的荧光蛋白 X_1 、 X_2 以放入到细胞内方式附着于细胞内,且这些细胞之间活体结合。当该样品 12 通过管道 30 的测量点时,在测量点受到激光 L_1 、 L_2 照射后,荧光蛋白以特定波长发射荧光。

[0085] 受光部 24 按照夹着管道 30 与激光光源部 22 相对而置的方式进行配置。受光部 24 包括光电转换器,通过在测量点上通过的样品 12 使激光发生前向散射,由此输出样品 12 正通过测量点情况的检测信号。从该受光部 24 输出的检测信号供给到分析装置 80,用作通知样品 12 正通过管道 30 测量点的时间的触发信号、处理开始的 ON 和 OFF 信号。

[0086] 另一方面,受光部 26 配置在相对于从激光光源部 22 发射的激光发射方向垂直的方向且相对于管道 30 中样品 12 的移动方向垂直的方向,并包括多个光电转换器,以用来接收样品 12 在测量点被激光照射后发出的荧光。

[0087] 图 3 是受光部 26 一个例的概略构成图。

[0088] 图 3 所示的受光部 26 包括:对来自样品 12 的荧光信号进行聚焦的透镜系统 26a、分色镜 26b、带通滤波器 26c₁、26c₂、光电倍增管等光电转换器(受光元件)元件 27a、27b。

[0089] 透镜系统 26a 使入射至受光部 26 的荧光在光电转换器 27a、27b 受光面上聚焦。

[0090] 分色镜 26b 反射规定范围波段的荧光、透射其它波段的荧光。按照用带通滤波器 26c₁、26c₂ 过滤后用光电转换器 27a、27b 捕获规定波段的荧光的方式设定分色镜 26b 的反射波段以及带通滤波器 26c₁、26c₂ 的透射波段。

[0091] 带通滤波器 26c₁、26c₂ 设置在各光电转换器 27a、27b 的受光面前面,仅透射具有

规定波段的荧光。透射的荧光波段设定成对应于荧光蛋白 X_1 、 X_2 发出的荧光的波段。波段是例如为用来主要接收被从光源 22a 发射的波长为 408nm 的激光 L_1 照射后发出的荧光的 494nm ~ 535nm 的波段 FL_1 。另外,波段是例如为用于主要接收被从光源 22b 发射的波长为 473nm 的激光 L_2 照射后发出的荧光的波长为 540nm ~ 570nm 的波段 FL_2 。

[0092] 波段 FL_1 按照在被激光 L_1 照射的样品 12 中荧光蛋白 X_1 发出的荧光的荧光强度相对于荧光蛋白 X_2 发出的荧光的荧光强度高的方式对应于荧光蛋白 X_1 发出的荧光设定。同样,波段 FL_2 按照在被激光 L_2 照射的样品 12 中荧光蛋白 X_2 发出的荧光的荧光强度相对于荧光蛋白 X_2 发出的荧光的荧光强度高的方式对应于荧光蛋白 X_2 发出的荧光设定。

[0093] 另外,在本实施方式中波段的设定,可以按照荧光蛋白 X_1 发出的荧光的荧光强度与荧光蛋白 X_2 发出的荧光的荧光强度不同的方式对应于荧光蛋白 X_1 设定,和按照荧光蛋白 X_2 发出的荧光的荧光强度与荧光蛋白 X_1 发出的荧光的荧光强度不同的方式对应于荧光蛋白 X_2 设定。

[0094] 光电转换器 27a、27b 是例如包括光电信增管等传感器、并将光电面上接收的光转换成电信号的受光元件。在这里,所接收的荧光是基于用特定频率进行强度调制的激光激发的荧光,所以输出的荧光信号也是用特定频率改变强度的信号。该荧光信号供给到控制和处理部 28。

[0095] 如图 4 所示,控制和处理部 28 包括信号生成部 40、信号处理部 42、作为控制部的控制器 44。

[0096] 具体地说,信号生成部 40 包括振荡器 46a、46b、功率分配器 48a、48b 以及放大器 50a、50b、52、IQ 混频器以及低通滤波器 49。信号生成部 40 将生成的频率 f_1 、 f_2 ($f_2 > f_1$) 的各调制信号通过放大器 50a、50b 放大后供给到光源部 22 的激光驱动器 34a、34b,同时将频率 f_1 的调制信号通过放大器 52 放大后供给到信号处理部 42。如后述,将频率 f_1 的调制信号供给到信号处理部 42 是用作对从光电转换器 27a、27b 输出的荧光信号进行检波的第一参照信号。另外,调制信号是特定频率的正弦波信号,其频率范围设定成 10MHz ~ 50MHz。振荡器 46a 和振荡器 46b 振荡不同频率 f_1 、 f_2 的信号,并生成具有不同频率的调制信号。

[0097] 另外,通过功率分配器 48a、48b 分配的频率 f_1 、 f_2 的调制信号供给到 IQ 混频器 47,并通过利用低通滤波器 49 使低频成分过滤,生成相对于频率 f_1 的调制信号的频率 f_2 的调制信号的差分信号。该差分信号具有差分频率 ($f_2 - f_1$)。为了在后述的分析部 83 中进行降频转换时作为第二参照信号使用,该差分信号供给到分析装置 80。

[0098] 信号处理部 42 是利用输出自光电转换器 27a、27b 的荧光信号提取与两个荧光蛋白通过激光照射所发出的荧光的相位滞后有关的信息的部分。信号处理部 42 包括:放大器 54a、54b、IQ 混频器 58a、58b 和低通滤波器 62、放大器 64。

[0099] 放大器 54a、54b 将从光电转换器 27a、27b 输出的荧光信号放大。IQ 混频器 58a、58b 将被放大的各个荧光信号与作为第一参照信号的从信号生成部 40 供给的正弦波信号的调制信号混合。

[0100] IQ 混频器 58a、58b 将从光电转换器 27a、27b 供给的荧光信号与信号生成部 40 供给的调制信号混合。具体地说,各 IQ 混频器 58a、58b 将第一参照信号与荧光信号 (RF 信号) 相乘,并各自生成荧光信号的、包括与调制信号相位相同的成分的信号和荧光信号的、包括相对于调制信号相位 90 度位移的成分的信号。包括相位相同的成分的信号是通过调

制信号和荧光信号混合生成,包括相位 90 度位移的成分的信号是通过相位 90 度位移的调制信号和荧光信号混合生成。

[0101] 低通滤波器 62 是过滤在 IQ 混频器 58a、58b 中生成的信号的低频信号的部分。通过过滤,荧光信号的、与频率 f_1 的第一参照信号相位相同的成分 (Re 成分) 和荧光信号的、相对于频率 f_1 的第一参照信号相位 90 度位移的成分 (Im 成分) 作为荧光数据被提取。用放大器 64 以特定增益放大后送至 AD 转换器 66。被提取的荧光数据主要包括 DC 成分和频率 (f_2-f_1) 的信号成分。

[0102] Re 成分以及 Im 成分分别在光电转换器 27a、27b 上设定的波段 FL_1 以及波段 FL_2 中得到,因此波段 FL_1 的 Re 成分以及 Im 成分的组和波段 FL_2 的 Re 成分以及 Im 成分的组送到 AD 转换器 66。上述 Re 成分以及 Im 成分分别具有 DC 成分和频率 (f_2-f_1) 信号成分。

[0103] 控制器 44 控制信号生成部 40,使其生成特定频率的调制信号,进一步下达分析装置 80 中 AD 转换的开始以及结束指令。

[0104] 具体地说,控制器 44 下达指令以控制各部分的动作,且管理流式细胞仪 10 的整个动作。进一步,控制器 44 进行下达 AD 转换器 66 对在信号处理部 42 生成的 Re 成分以及 Im 成分进行样品化的 AD 转换器 66 的开始和结束指令。AD 转换器 66 的开始和结束指令是将,作为对从受光部 24 接收的信号作为进行 AD 转换处理的开始的 ON 信号和处理结束的 OFF 信号使用而进行。控制器 44 规定振荡器 46a、46b 的振荡频率,以对激光进行强度调制。

[0105] 分析装置 80 包括 AD 转换器 66 和分析部 83,该分析部 83 从被 AD 转换的 Re 成分和 Im 成分求出相对于激光的相位滞后角度,进一步从该相位滞后角度求出荧光弛豫时间常数 (荧光弛豫时间) 以及荧光强度。

[0106] AD 转换器 66 将从信号处理部 42 供给的 Re 成分和 Im 成分转换成数字数据,且将从信号生成部 40 供给的差分信号转换成数字数据。这些数字数据供给到分析部 83。

[0107] 图 5 是表示分析装置 80 的分析部 83 概略构成的图。

[0108] 分析部 83 包括频率分析部 84、自发荧光除去部 86、荧光数据校正部 88、荧光强度计算部 90、相位滞后计算部 92、荧光弛豫时间计算部 94。这些部分是在包括 CPU81 和存储器 82 的计算机上通过启动软件而使其发挥功能的软件模块。当然,这些部分可以由专用电路构成。

[0109] 频率分析部 84 是将从信号处理部 42 供给的 AD 转换后的 Re 成分以及 Im 成分分离成 DC 成分和差分频率 (f_2-f_1) 的信号成分的部分。频率分析部 84 与信号处理部 42 一同形成本发明的进行降频转换的第一处理部。

[0110] 频率分析部 84 通过将信号处理部 42 供给的 AD 转换后的 Re 成分以及 Im 成分的信号分别进行 FFT (快速傅利叶转换, Fast Fourier Transformation) 处理而求出 Re 成分以及 Im 成分的 DC 成分,提取包括频率 f_1 的荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据 (Re 成分、Im 成分)。进一步,频率分析部 84 通过利用作为第二参照信号的从信号生成部 40 供给的频率 (f_2-f_1) 的差分信号对从信号处理部 42 供给且 AD 转换的 Re 成分以及 Im 成分的信号实施降频转换,提取包括频率 f_2 的荧光信号的相位滞后和强度振幅的荧光数据 (Re 成分、Im 成分)。

[0111] 从信号处理部 42 供给的 Re 成分以及 Im 成分是利用频率 f_1 对荧光信号实施降频转换而得到的信号,因此上述 DC 成分包括相对于频率 f_1 的调制信号的荧光信号的频率 f_1

的相位滞后和频率 f_1 的强度振幅。另一方面,频率 (f_2-f_1) 的信号成分包括相对于频率 f_2 的调制信号的荧光信号的频率 f_2 的相位滞后和频率 f_2 的强度振幅。

[0112] 因此,频率分析部 84 通过经过 FFT 处理提取 DC 成分,得到包括用频率 f_1 进行强度调制的激光 L_1 照射而发出的荧光的相位滞后和强度振幅的荧光数据。进一步,通过利用作为第二参照信号的频率 (f_2-f_1) 的差分信号对降频转换进行软件处理,并提取频率 (f_2-f_1) 的信号成分,得到包括用频率 f_2 进行强度调制的激光 L_2 照射而发出的荧光的相位滞后和强度振幅的荧光数据。所得到的荧光数据供给到自发荧光除去部 86。

[0113] 自发荧光除去部 86 是利用由供给的 Re 成分和 Im 成分构成的荧光数据,判断所接收的荧光是不是自发荧光,并按照满足一定条件的 Re 成分、Im 成分作为自发荧光的荧光数据不实施以下处理的方式除去的部分。具体地说,利用波段 FL_1 以及波段 FL_2 的荧光信号的 Re 成分和 Im 成分求出荧光强度,并将该两个波段的荧光强度绘图在由纵轴以及横轴构成的二次元坐标中的散布图中。当该绘图没有位置在预先设定的自发荧光的范围时,将 Re 成分、Im 成分作为包括以下校正处理的对象选择,当该绘图位置在散布图中的自发荧光的范围时,将 Re 成分、Im 成分从以下处理对象中除去,即不作为校正处理的对象选择。

[0114] 这样的自发荧光的范围是通过在荧光蛋白没有被放入到作为测量对象粒子的细胞内的状态下用流式细胞仪 10 对细胞等样品 12 进行测量并将利用从信号处理装置 20 输出的 Re 成分以及 Im 成分所得到的荧光强度绘图在散布图中的方法得到。

[0115] 使用通过以下处理方法除去自发荧光是,由于通过该除去处理能够利用荧光蛋白发出的荧光的荧光数据进行更高精度的校正。

[0116] 图 6 是表示上述散布图的一个例的图。图 6 所示的散布图中,横轴上规定根据波段 FL_1 的荧光强度,纵轴上规定根据波段 FL_2 的荧光强度。在这里,预先测量而设定的自发荧光的范围是 R_1 区域。绘图在该 R_1 区域中的荧光数据被判断为自发荧光的荧光数据而被除去。绘图在 R_2 区域中的荧光数据作为以下的处理对象。

[0117] 荧光数据校正部 88 利用除去自发荧光的荧光数据的荧光数据,对荧光数据进行校正的部分。

[0118] 图 7(a) 是表示根据激光 L_1 的荧光蛋白 X_1 的吸收特性和根据激光 L_2 的荧光蛋白 X_2 的吸收特性。根据这样的吸收特性,为了使吸收特性具有宽分布,不仅吸收和激发根据激光 L_1 的荧光蛋白 X_1 ,也要吸收和激发荧光蛋白 X_2 。同样,不仅吸收和激发根据激光 L_2 的荧光蛋白 X_2 ,也要吸收和激发荧光蛋白 X_1 。

[0119] 图 7(b) 是表示被激发的荧光蛋白 X_1 和荧光蛋白 X_2 的荧光特性。根据这样的荧光特性,在主要接收荧光蛋白 X_1 发出的荧光 Y_1 的波段 FL_1 ,接收被激光 L_1 激发的荧光蛋白 X_2 发出的荧光 Y_2 的一部分。另外,在主要接收荧光蛋白 X_2 发出的荧光 Y_2 的波段 FL_2 ,接收被激光 L_2 激发的荧光蛋白 X_1 发出的荧光 Y_1 的一部分。

[0120] 因此,在波段 FL_1 接收荧光而得到的荧光数据除了包括被激光 L_1 激发的荧光蛋白 X_1 发出的荧光 Y_1 之外,还包括被激光 L_1 激发的荧光蛋白 X_2 发出的荧光 Y_2 的荧光数据。同样,在波段 FL_2 接收荧光而得到的荧光数据除了包括被激光 L_2 激发的荧光蛋白 X_2 发出的荧光 Y_2 之外,还包括被激光 L_2 激发的荧光蛋白 X_1 发出的荧光 Y_1 的荧光数据。在波段 FL_1 中包括的荧光 Y_2 的荧光数据以及在波段 FL_2 中包括的荧光 Y_1 的荧光数据由于被相同的激光激发,因此不能利用激光 L_1 、 L_2 的强度调制的不同频率分离。因此,荧光数据校正部 88 对荧

光数据进行校正。

[0121] 荧光数据校正部 88 进行以下的校正。

[0122] 即,利用包括光源部 22、受光部 24、26 以及控制和处理部 28 的信号处理装置 20,预先存储包括分别测量荧光蛋白 X₁ 以及荧光蛋白 X₂ 所得到的、基准相位滞后和基准强度振幅的基准荧光数据,并利用该基准荧光数据的校正行列,对荧光数据进行校正。

[0123] 具体地说,将基准荧光数据作为从波段 FL_m (m = 1 ~ n 的整数) 的光电转换器输出的荧光蛋白 k (k = 1 ~ n 的整数) 的荧光信号生成的信息,表示为 a_{km} • e^(-i θ_{km}) (a_{km} 是荧光信号的基准强度振幅、θ_{km} 是荧光信号的基准相位滞后角) 时,波段 FL_m 的荧光数据用 A_s' (s = 1 ~ n 的整数) 表示,校正后的荧光数据用 A_s (s = 1 ~ n) 表示时 (A_s' 以及 A_s 是由 (Re 成分) + i (Im 成分) 表示的复数表示),通过下述式 (1) 根据 A_s' 计算出 A_s 并进行校正。在这里,荧光数据 A_s'、A_s 是具有荧光强度和相位滞后信息的复数。

[0124] 例如,波段 FL₁ 中测量的荧光数据 A₁' 除了包括荧光蛋白 1 的荧光成分之外,还包括荧光蛋白 2 ~ n 的荧光成分。荧光蛋白 2 ~ n 发出的荧光的荧光数据在波段 FL₁ 中含有的比率表示为 a₂₁/a₂₂ • e^{-i(θ₂₁-θ₂₂)} ~ a_{n1}/a_{nm} • e^{-i(θ₂₁-θ_{nm})}。因此,在波段 FL₁ 测量的荧光数据 A₁' 利用原来应求出的荧光数据 A₁、A₂ ~ A_n 和 a₂₁/a₂₂ • e^{-i(θ₂₁-θ₂₂)} ~ a_{n1}/a_{nm} • e^{-i(θ₂₁-θ_{nm})} 的系数,由下述式表示。

$$[0125] \quad A_1' = A_1 + a_{21}/a_{22} \cdot e^{-i(\theta_{21}-\theta_{22})} \cdot A_2 + \dots + a_{n1}/a_{nm} \cdot e^{-i(\theta_{21}-\theta_{nm})} \cdot A_n$$

[0126] 将上述式针对 A₁' ~ A_n' 表示的式为下述式 (1)。因此,通过将在波段 FL₁ ~ FL_n 测量的荧光数据 A₁ ~ A_n,利用由式 (1) 的右边的逆矩阵的各因子,即由基准荧光数据构成的系数进行校正,可以求出原荧光数据 A₁ ~ A_n。

[0127] [数 1]

[0128]

$$\begin{Bmatrix} A_1 \\ A_2 \\ \vdots \\ \vdots \\ A_n \end{Bmatrix} = \begin{bmatrix} 1 & \frac{a_{21}}{a_{22}} e^{-i(\theta_{21}-\theta_{22})} & \frac{a_{31}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{31}-\theta_{33})} & \dots & \dots \\ \frac{a_{12}}{a_{11}} e^{-i(\theta_{12}-\theta_{11})} & 1 & \frac{a_{32}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{32}-\theta_{33})} & \dots & \dots \\ \vdots & \vdots & \vdots & \vdots & \vdots \\ \frac{a_{1n}}{a_{11}} e^{-i(\theta_{1n}-\theta_{11})} & \frac{a_{2n}}{a_{22}} e^{-i(\theta_{2n}-\theta_{22})} & \frac{a_{3n}}{a_{33}} e^{-i(\theta_{3n}-\theta_{33})} & \dots & \dots \end{bmatrix}^{-1} \begin{Bmatrix} A_1' \\ A_2' \\ \vdots \\ \vdots \\ A_n' \end{Bmatrix} \quad (1)$$

[0129] 荧光蛋白 X₁、X₂ 用激光 L₁、L₂ 照射,在波段 FL₁、FL₂ 接收荧光时,可以由下述式 (2)、(3) 表示。

[0130] 因此,在波段 FL₁ 进行校正后的荧光数据 A₁ 作为荧光蛋白 X₁ 发出的荧光 Y₁ 的荧光数据,在波段 FL₂ 进行校正后的荧光数据 A₂ 作为荧光蛋白 X₂ 发出的荧光 Y₂ 的荧光数据。校正后的荧光数据 A₁、A₂ 送至荧光强度计算部 90 以及相位滞后计算部 92。

[0131] [数 2]

[0132]

$$\begin{Bmatrix} A'_1 \\ A'_2 \end{Bmatrix} = \underbrace{\begin{bmatrix} 1 & \frac{a_{21}}{a_{22}} e^{-i(\theta_{21}-\theta_{22})} \\ \frac{a_{12}}{a_{11}} e^{-i(\theta_{12}-\theta_{11})} & 1 \end{bmatrix}}_M \begin{Bmatrix} A_1 \\ A_2 \end{Bmatrix} \quad (2)$$

[0133] [数 3]

$$[0134] \begin{Bmatrix} A_1 \\ A_2 \end{Bmatrix} = [M]^{-1} \begin{Bmatrix} A'_1 \\ A'_2 \end{Bmatrix} \quad (3)$$

[0135] 荧光强度计算部 90 是针对各校正后的荧光数据 A_1 、 A_2 通过求出复数的绝对值计算出荧光强度的部分。

[0136] 相位滞后计算部 92 是针对各校正后的荧光数据 A_1 、 A_2 将复数的辐角 (\tan^{-1} (荧光数据的 Im 成分 / 荧光数据的 Re 成分)) 作为相位滞后角 θ 计算出的部分。

[0137] 荧光弛豫时间计算部 94 是利用通过相位滞后计算部 92 计算出的 θ 将荧光弛豫时间 τ 根据式 $\tau = 1/(2\pi f) \cdot \tan(\theta)$ 计算出的部分。在这里, f 是用于对激光 L_1 、 L_2 进行强度调制的频率。能够通过式 $\tau = 1/(2\pi f) \cdot \tan(\theta)$ 算出荧光弛豫时间 τ 是由于荧光现象表示根据一次弛豫过程的变化。

[0138] 计算出的荧光强度、相位滞后角 θ 以及荧光弛豫时间 τ 是作为结果信息在未图示的打印机或者显示器上输出。另外, 该结果信息作为样品 12 通过管道 30 的测量点时测量的结果, 可作为统计处理对象。

[0139] 流式细胞仪 10 的构成如上所述。

[0140] 接着, 关于用流式细胞仪 10 进行的荧光检测方法进行说明。

[0141] 首先, 针对各荧光蛋白 X_1 以及荧光蛋白 X_2 , 将按照荧光蛋白 X_k ($k = 1$ 或者 2) 的光吸收相对于另一方的荧光蛋白的光吸收高的方式对应于荧光蛋白 X_k 准备的多个波长 L_k 用不同的多个频率进行强度调制后作为一束照射光从光源部 22 射出。

[0142] 接着, 包括针对被照射光照射后各荧光蛋白 X_1 以及荧光蛋白 X_2 发出的荧光将按照荧光蛋白 X_k 发出的荧光的荧光强度相对于其它测量对象物发出的荧光的荧光强度高的方式对应于荧光蛋白 X_k 设定的多个波段 FL_k ($k = 1$ 或者 2) 的受光部 26 接收荧光后, 输出对应于波段 FL_k 的荧光信号。

[0143] 控制和处理部 28 通过将各输出的荧光信号与对对应于波段 FL_k ($k = 1$) 的激光 L_k ($k = 1$) 进行强度调制的调制信号混合并进行降频转换, 生成包括相对于该调制信号的荧光信号的相位滞后和强度振幅的 Re 成分和 Im 成分的数据。

[0144] 分析装置 80 的分析部 83 将生成的 Re 成分和 Im 成分的数据进一步分离为 DC 成分和频率 ($f_2 - f_1$) 的信号成分。频率 ($f_2 - f_1$) 的信号成分是通过利用从信号生成部 40 供给的差分频率 ($f_2 - f_1$) 的差分信号进行降频转换而提取。DC 成分是通过 FFT 处理提取。

[0145] 由此, 得到包括频率 f_1 的荧光信号的相位滞后 (相对于频率 f_1 的调制信号的相位滞后) 和强度振幅且由 Re 成分和 Im 成分构成的荧光数据 A_1' 。进一步, 得到包括频率 f_2 的荧光信号的相位滞后 (相对于频率 f_2 的调制信号的相位滞后) 和强度振幅且由 Re 成分和

Im 成分构成的荧光数据 A_2' 。所得到的荧光数据 A_1' 、 A_2' 根据上述式 (3) 实施校正。进一步,利用该校正后的荧光数据 A_1 、 A_2 计算出荧光强度、相位滞后角 θ 以及荧光弛豫时间 τ 。

[0146] 另外,流式细胞仪 10 针对各荧光蛋白 X_1 、 X_2 ,预先存储包括利用流式细胞仪 10 单独测量得到的基准相位滞后和基准强度振幅的基准荧光数据,并利用该基准荧光数据构成的校正矩阵通过上述式 (3) 进行校正。

[0147] 如此地,分析装置 80 的分析部 83 在计算荧光弛豫时间 τ 之前,由于能够除去在波段 FL_1 、 FL_2 包括的不需要的荧光的荧光数据,因此计算出的荧光弛豫时间 τ 的精度高。

[0148] 在流式细胞仪 10 中,虽然举出一组发生 FRET 的活体结合的细胞为例对样品 12 进行了说明,但是只要是 n 种 (n 是 2 以上的整数) 测量对象物发出的荧光就没有特别地限定。例如,可以将发生 FRET 的第一分子和第二分子作为组,该组准备多个种类,构成 n 种测量对象物。另外,不仅限于发生 FRET 的测量对象物,只要是荧光色素同时通过测量点的测量对象物就可以。

[0149] 另外,控制和处理部 28 将频率 f_1 的调制信号用作第一参照信号,并通过混合处理进行降频转换之后,分析装置 80 将差分频率 (f_2-f_1) 的差分信号用作第二参照信号,并进行降频转换。但是,在上述的混合处理中,作为第一参照信号,可以是利用频率 f_1 、 f_2 的两个调制信号分别进行混合处理,并进行降频转换处理。此时,也可以按照信号处理部 42 的 IQ 混频器 58a 中作为第一参照信号使用频率 f_1 的调制信号、在 IQ 混频器 58b 中作为第一参照信号使用频率 f_2 的调制信号的方式构成信号处理部 42。由此,利用 IQ 混频器 58a 和 IQ 混频器 58b 同时可以求出包括频率 f_1 、 f_2 的相位滞后和强度振幅的 Re 成分、Im 成分。

[0150] 以上,关于本发明的荧光检测装置以及荧光检测方法进行了详细的说明,但是本发明不仅限于上述实施方式,在不脱离本发明的主要思想的情况下,可以进行各种各样的改进或者变更。

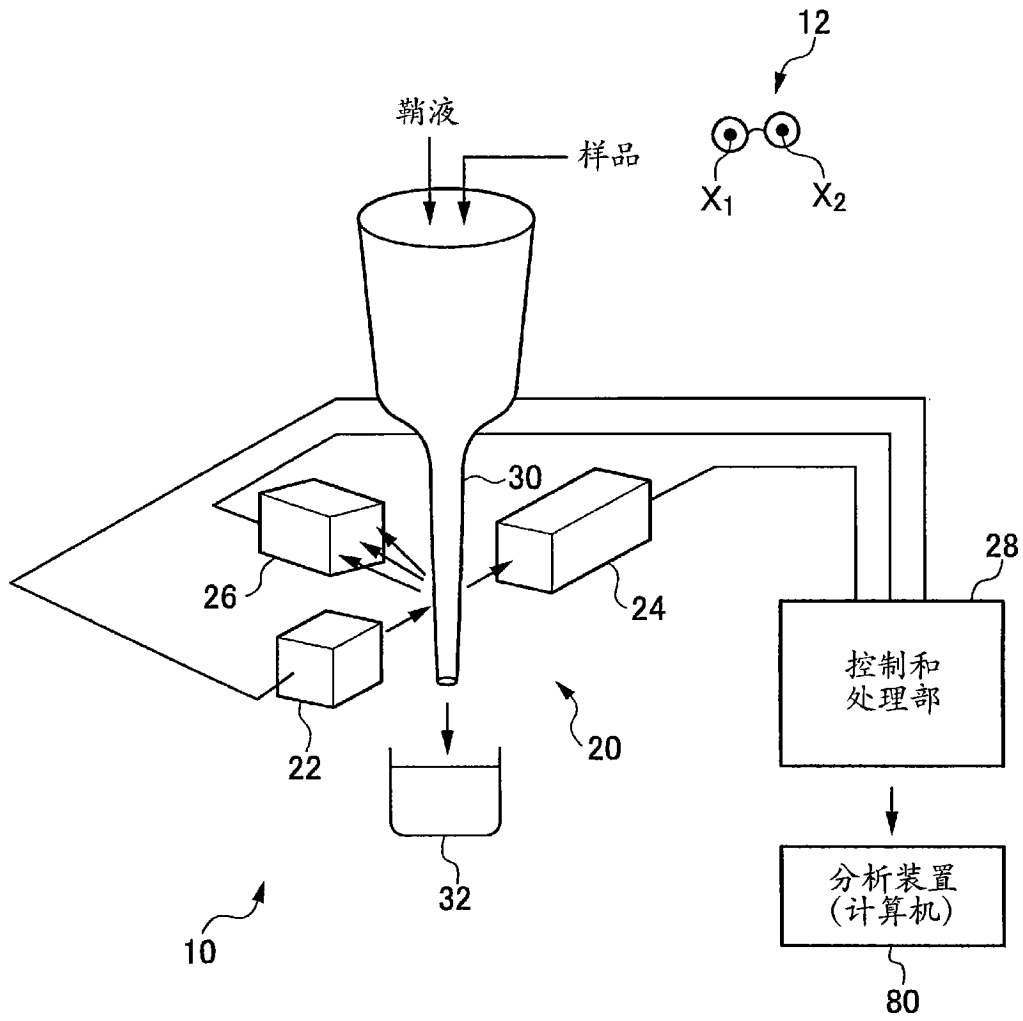


图 1

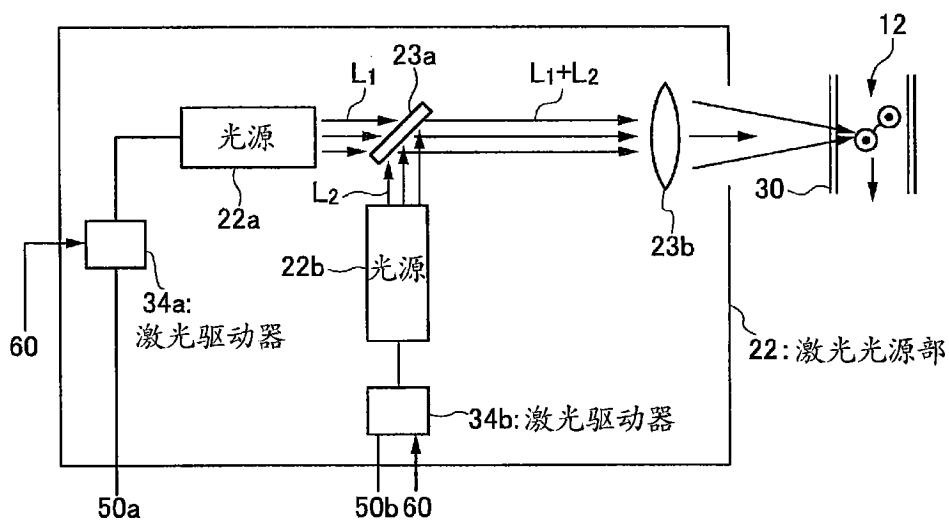


图 2

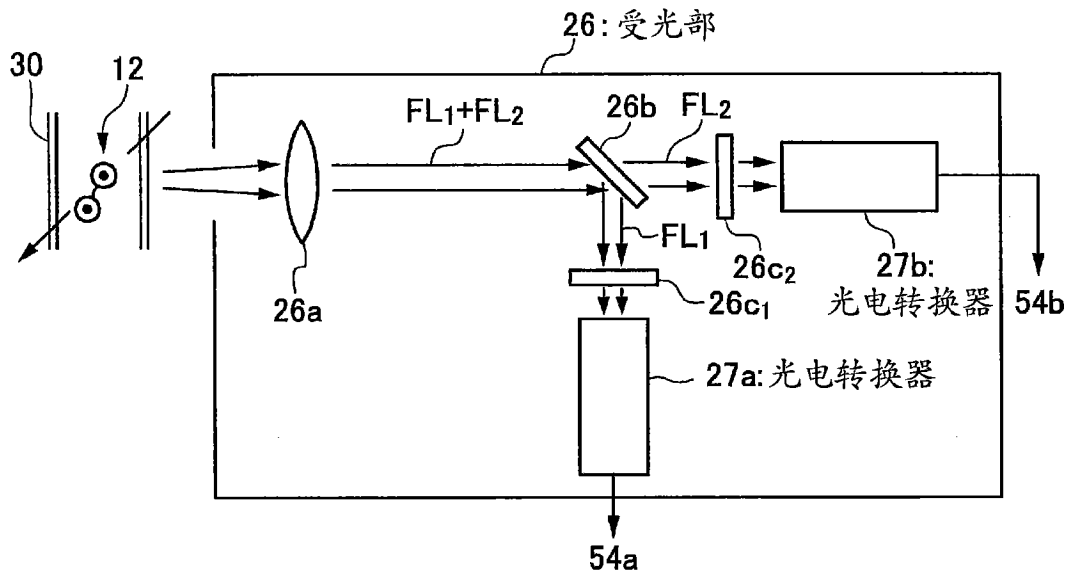


图 3

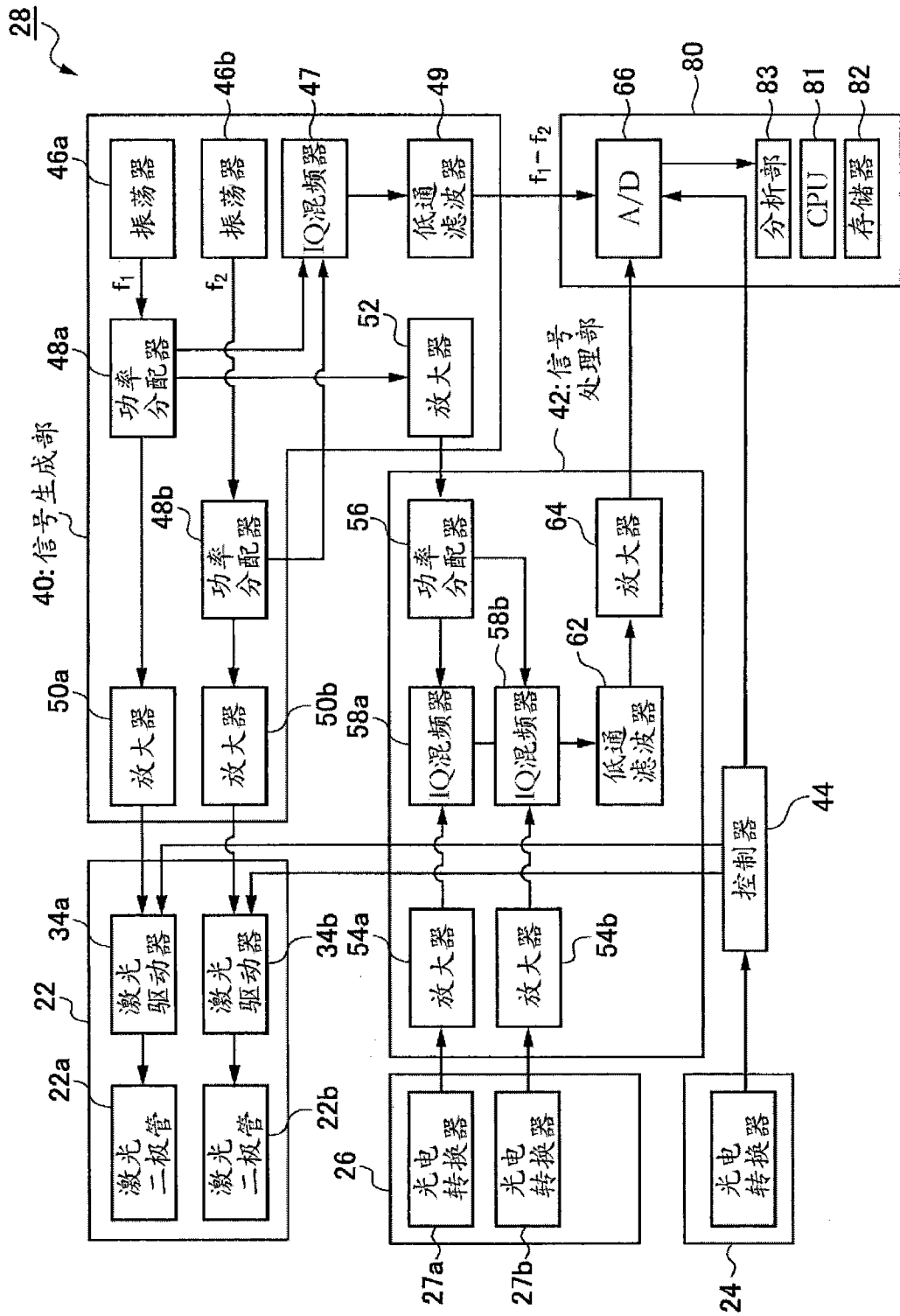


图 4

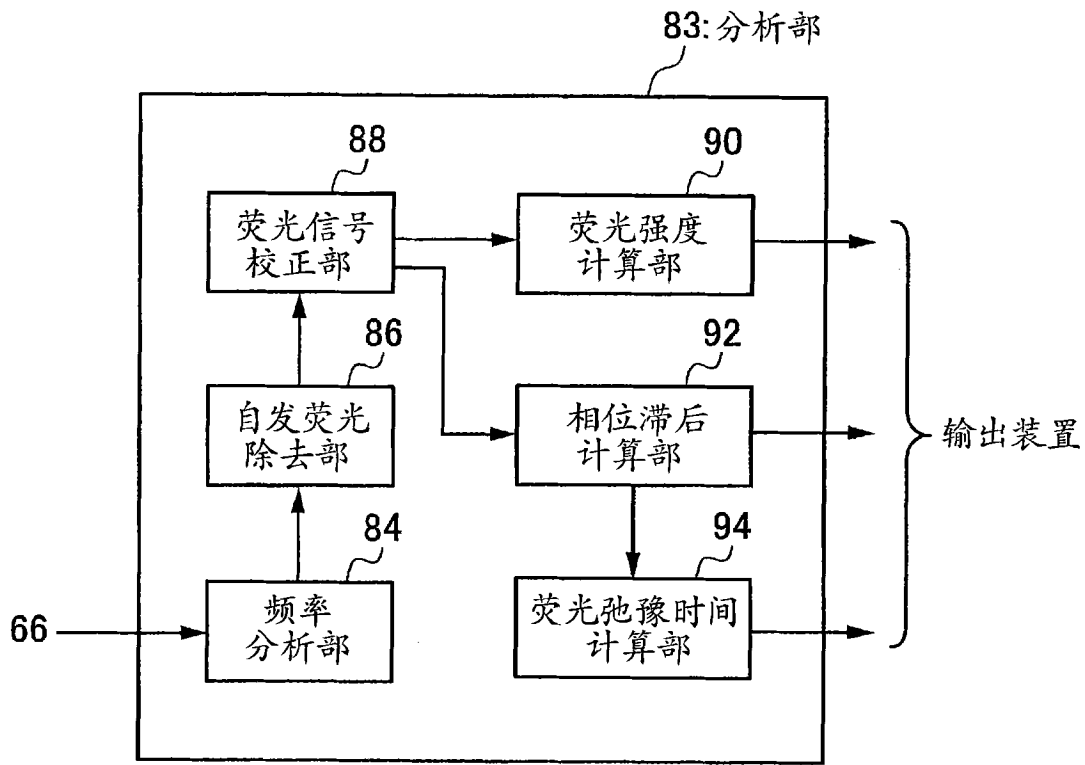


图 5

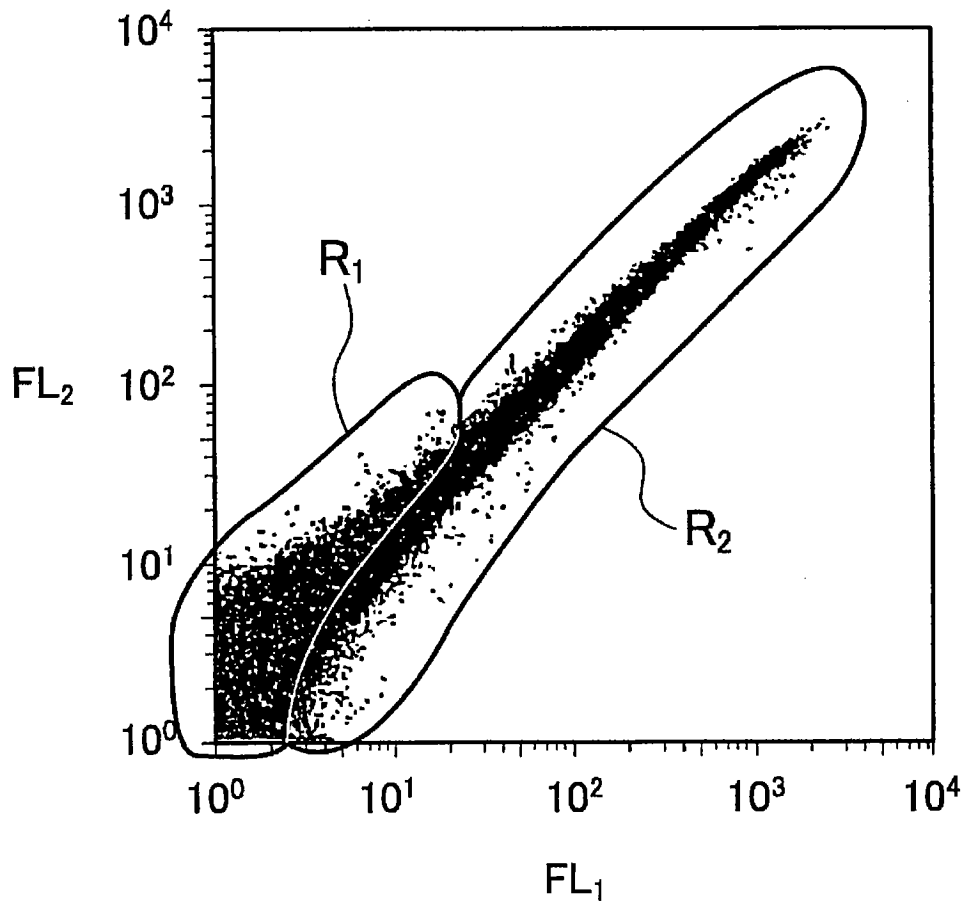


图 6

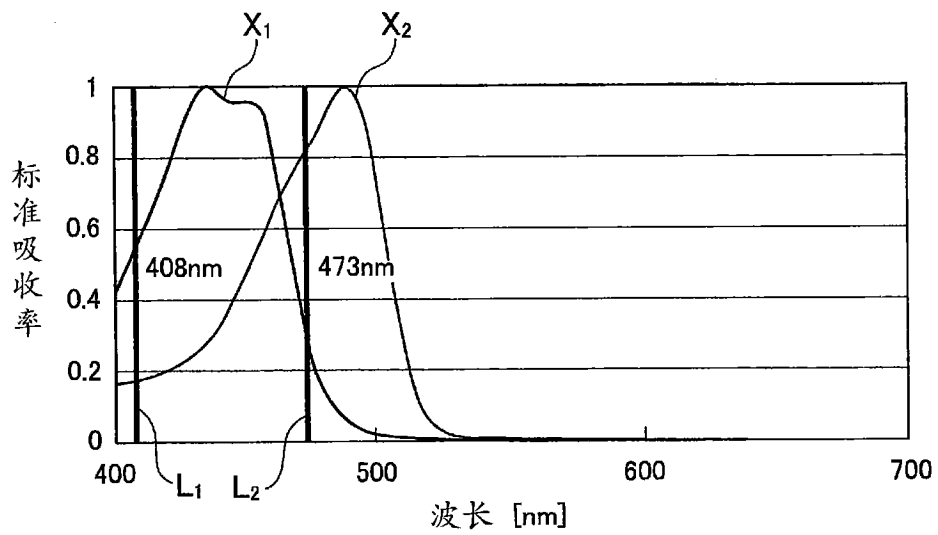


图 7a

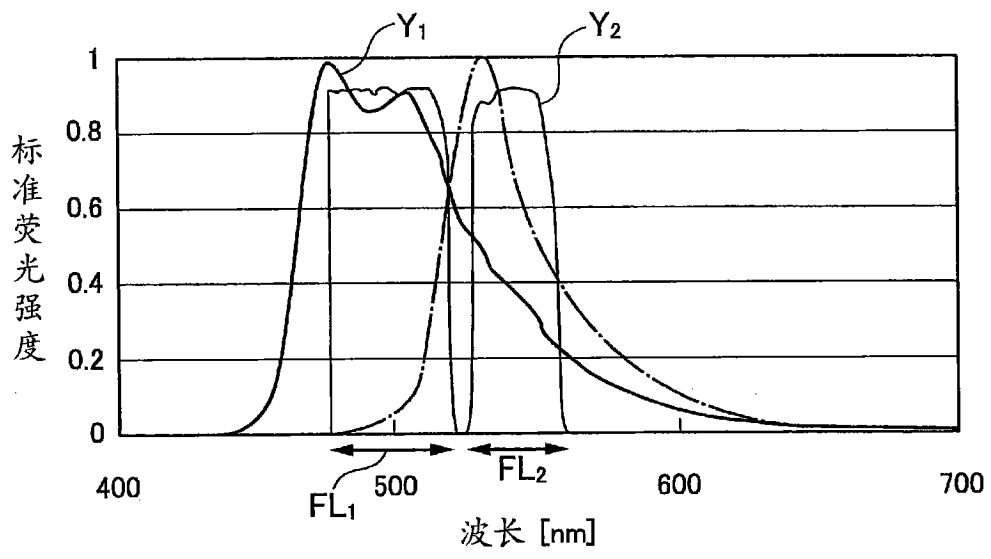


图 7b