

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 公表特許公報(A)

(11) 特許出願公表番号

特表2005-534944

(P2005-534944A)

(43) 公表日 平成17年11月17日(2005.11.17)

(51) Int. Cl.⁷
G01N 21/64

F I
G O I N 21/64 Z

テーマコード (参考)
2 G O 4 3

審査請求 未請求 予備審査請求 未請求 (全 28 頁)

(21) 出願番号 特願2005-506096 (P2005-506096)
 (86) (22) 出願日 平成15年8月1日 (2003.8.1)
 (85) 翻訳文提出日 平成17年3月15日 (2005.3.15)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2003/024369
 (87) 国際公開番号 W02004/013620
 (87) 国際公開日 平成16年2月12日 (2004.2.12)
 (31) 優先権主張番号 60/400, 503
 (32) 優先日 平成14年8月1日 (2002.8.1)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/430, 273
 (32) 優先日 平成14年12月2日 (2002.12.2)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/461, 394
 (32) 優先日 平成15年4月8日 (2003.4.8)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

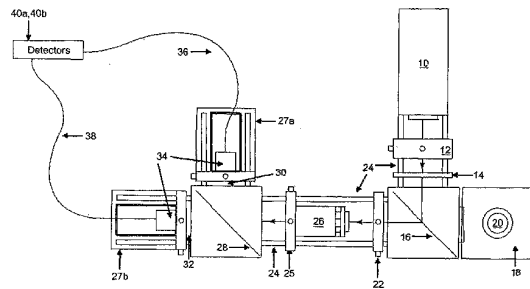
(71) 出願人 504178096
 センサー テクノロジーズ リミティド
 ライアビリティー カンパニー
 アメリカ合衆国, マサチューセッツ O 1
 5 4 5, シュリューズベリー, ポストン
 ターンパイク 9 1 0, パーク ナイン
 ウェスト
 (74) 代理人 100099759
 弁理士 青木 篤
 (74) 代理人 100092624
 弁理士 鶴田 準一
 (74) 代理人 100102819
 弁理士 島田 哲郎
 (74) 代理人 100089819
 弁理士 平岩 賢三

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 蛍光相関分光器

(57) 【要約】

開示されているのは、励起源(10)、該励起源により発出された光を受光するように位置づけされた少なくとも1つの集光素子(12)、該励起源により励起された試料により発出された光を受光するように位置づけされた光検出用検出器(40a、40b)、及び該検出器で受光されたデータを処理して自己相関データ、相互相関データ又はそれらの組合せを含むデータを提供するための該検出器に結合された相関器、を含むポータブル式蛍光相関分光器である。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

励起源、

前記励起源により発出された光を受光するべく位置づけされた少なくとも 1 つの集光素子、

前記励起源により励起された試料により発出された光を受光するように位置づけされた、光検出用検出器、及び

前記検出器で受光したデータを処理し、自己相関データ、相互相関データ又はそれらの組合せを含むデータを提供するための、前記検出器に結合された相関器、を有して成る、ポータブル式蛍光相関分光器。

10

【請求項 2】

前記検出器に光を透過させるように位置づけされた吸収フィルタをさらに有して成り、前記吸収フィルタが、前記励起源によって発出された光の波長よりも大きい波長をもつ光を透過させる、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 3】

前記集光素子が光ファイバを含んで成る、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 4】

前記励起源により励起された試料によって発出された光を受光するように位置づけされたアパーチャをさらに含んで成る、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 5】

前記集光素子が集光レンズを含んで成る、請求項 1 に記載の分光器。

20

【請求項 6】

前記光ファイバが前記励起源に結合されている、請求項 3 に記載の分光器。

【請求項 7】

試料体積中で前記励起源により発出された光を集束するべく位置づけされた第 2 の集光素子をさらに有して成る、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 8】

前記励起源及び前記第 1 の集光素子に結合された光ファイバをさらに含んで成る、請求項 7 に記載の分光器。

【請求項 9】

試料チャンバ及び第 2 の集光素子をさらに含んで成り、前記第 1 の集光素子が、前記試料チャンバ内に配置された第 1 の端部をもつ光ファイバを含み、前記第 2 の集光素子が前記光ファイバの前記第 1 の端部上に焦点合わせされている、請求項 1 に記載の分光器。

30

【請求項 10】

前記試料チャンバがフローチャンバを有して成る、請求項 9 に記載の分光器。

【請求項 11】

前記第 2 の集光素子を通して透過された光を受光し前記検出器まで前記光を透過させるように位置づけされた吸収フィルタをさらに有して成る、請求項 10 に記載の分光器。

【請求項 12】

前記集光素子には前記励起源に結合された第 1 の光ファイバが含まれており、前記励起源によって励起された試料が発出した光を受光するように位置づけされた第 2 の光ファイバをさらに含んで成る、請求項 1 に記載の分光器。

40

【請求項 13】

前記第 2 の光ファイバが前記第 1 の光ファイバと直交関係にある、請求項 12 に記載の分光器。

【請求項 14】

前記第 2 の光ファイバが前記第 1 の光ファイバと線形の関係にある、請求項 12 に記載の分光器。

【請求項 15】

第 2 の集光素子をさらに有して成り、前記第 1 の集光素子が前記第 2 の集光素子と直交

50

関係にある、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 16】

第 2 の集光素子をさらに有して成り、前記第 1 の集光素子が前記第 2 の集光素子と線形の関係にある、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 17】

前記第 2 の光ファイバからの光を受光し前記検出器まで光を透過させるように位置づけされた吸収フィルタをさらに有して成る、請求項 12 に記載の分光器。

【請求項 18】

前記アパーチャからの光を受光し前記検出器まで光を透過させるように位置づけされた吸収フィルタをさらに有して成る、請求項 4 に記載の分光器。

10

【請求項 19】

前記吸収フィルタから前記検出器まで光を透過させるように位置づけされた第 3 の光ファイバをさらに含んで成る、請求項 12 に記載の分光器。

【請求項 20】

前記集光素子が前記励起源に結合された第 1 の光ファイバを含み、さらに前記第 1 の光ファイバの端部が中に延びている試料チャンバ、第 2 の集光素子、及び前記第 2 の集光素子からの光を受光し、前記検出器に光を透過させるように位置づけされた吸収フィルタ、を有して成る、請求項 1 に記載の分光器。

20

【請求項 21】

前記第 2 の集光素子が前記光ファイバの前記端部上に焦点合わせされている、請求項 20 に記載の分光器。

【請求項 22】

前記第 2 の集光素子がレンズを含んで成る、請求項 20 に記載の分光器。

【請求項 23】

前記吸収フィルタから光を受光し前記検出器に光を透過させるように位置づけされた第 2 の光ファイバをさらに含んで成る、請求項 20 に記載の分光器。

【請求項 24】

前記励起源から光を受光するように位置づけされた第 1 のダイクロマティックミラー、前記ダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた第 2 の集光素子、

30

第 1 のアパーチャ、

前記ダイクロマティックミラーを通し、かつ前記第 1 のアパーチャを通して透過させられた光を受光するように位置づけされた第 3 の集光素子、及び

前記第 3 の集光素子を通して透過させられた光を受光するように位置づけされた第 2 のダイクロマティックミラー、をさらに有して成り、

前記第 1 の検出器が、前記第 2 のダイクロマティックミラーから反射された光、及び前記ダイクロマティックミラーを通して透過させられた光のうちの少なくとも 1 つを受光するように位置づけされている、請求項 1 に記載の分光器。

40

【請求項 25】

前記第 2 のダイクロマティックミラーから反射された光、及び前記ダイクロマティックミラーを通して透過させられた光のうちの少なくとも 1 つを受光するように位置づけされた第 1 の吸収フィルタをさらに有して成る、請求項 24 に記載の分光器。

【請求項 26】

前記第 2 のダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光するように位置づけされた第 2 の吸収フィルタと、前記ダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた前記第 1 の吸収フィルタ、及び

前記第 2 の吸収フィルタを通して透過させられた光を受光するように位置づけされた第

50

2の検出器、
をさらに有して成る、請求項25に記載の分光器。

【請求項27】

前記第1の吸収フィルタを通過する光を受光し、かつ前記第1の検出器まで光を透過させるように位置づけされた第1の光ファイバをさらに含んで成る、請求項25に記載の分光器。

【請求項28】

前記第2の吸収フィルタを通過する光を受光し、かつ前記第2の検出器まで光を透過させるように位置づけされた第2の光ファイバをさらに含んで成る、請求項27に記載の分光器。

10

【請求項29】

前記第1のダイクロマティックミラーから反射された光を受光し前記光を前記第2の集光素子まで透過させるように位置づけされた第1の反射ミラーをさらに有して成る、請求項24に記載の分光器。

【請求項30】

前記第1のダイクロマティックミラーから反射された光を受光し前記光を前記第2の集光素子まで透過させるように位置づけされた第1の反射ミラーをさらに有して成る、請求項26に記載の分光器。

【請求項31】

前記第1のダイクロマティックミラーにより透過させられた光を受光し前記第1のアパーチャ上に前記光を集束させるように位置づけされた第4の集光素子をさらに有して成る、請求項24に記載の分光器。

20

【請求項32】

前記第2の集光素子が無限補正済み対物レンズであり、前記第4の集光素子がチューブレンズを含む、請求項31に記載の分光器。

【請求項33】

前記第1のダイクロマティックミラーにより透過させられた光を受光し前記第1のアパーチャ上に前記光を集束させるように位置づけされた第4の集光素子をさらに有して成る、請求項26に記載の分光器。

【請求項34】

前記第1のダイクロマティックミラーにより透過させられた光を受光し前記第1のアパーチャ上に前記光を集束させるように位置づけされた第4の集光素子をさらに有して成る、請求項27に記載の分光器。

30

【請求項35】

前記第1のダイクロマティックミラーにより透過させられた光を受光し前記第1のアパーチャ上に前記光を集束させるように位置づけされた第4の集光素子をさらに有して成る、請求項28に記載の分光器。

【請求項36】

前記第1のダイクロマティックミラーにより透過させられた光を受光し前記第1のアパーチャ上に前記光を集束させるように位置づけされた第4の集光素子をさらに有して成る、請求項29に記載の分光器。

40

【請求項37】

前記第1のダイクロマティックミラーにより透過させられた光を受光し前記第1のアパーチャ上に前記光を集束させるように位置づけされた第4の集光素子をさらに有して成る、請求項30に記載の分光器。

【請求項38】

前記励起源から光を受光するように位置づけされた第1のダイクロマティックミラー、
前記第1のダイクロマティックミラーにより反射された光を受光するように位置づけされた第2の集光素子、

前記ダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光するように位置づけさ

50

れた第3の集光素子、

前記第3の集光素子を通過する光を受光するように位置づけされた第2のダイクロマティックミラー、

第1のアーチャ及び第1の光ファイバのうちの少なくとも1つを含んで成る第1のコンポーネント、及び

前記第1のコンポーネントを通して前記第2のダイクロマティックミラーから反射された光、及び前記第1のコンポーネントを通し前記第2のダイクロマティックミラーを通過させられた光のうちの少なくとも1つを受光するように位置づけされた第1の検出器、

をさらに有して成る、請求項1に記載の分光器。

10

【請求項39】

前記コンポーネントが第1のアーチャである、請求項38に記載の分光器。

【請求項40】

前記第1の検出器が前記第1のコンポーネントを通して前記第2のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされており、

第2のアーチャ及び第2の光ファイバのうちの少なくとも1つを含む第2のコンポーネント、及び

前記第2のダイクロマティックミラー及び前記第2のコンポーネントを通過させられた光を受光するように位置づけされた第2の検出器、

をさらに有して成る、請求項38に記載の分光器。

20

【請求項41】

前記第1のコンポーネントが第1のアーチャであり、前記第2のコンポーネントが第2のアーチャである、請求項40に記載の分光器。

【請求項42】

前記第1のコンポーネントが第1の光ファイバであり、前記第2のコンポーネントが第2の光ファイバである、請求項40に記載の分光器。

【請求項43】

前記第2のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた第1の吸収フィルタをさらに有して成る、請求項38に記載の分光器。

【請求項44】

前記第2のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた第1の吸収フィルタ、及び

前記第2のダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光するように位置づけされた第2の吸収フィルタ、

をさらに有して成る、請求項38に記載の分光器。

30

【請求項45】

前記第1のコンポーネントが、前記第1の吸収フィルタを通して透過させられた光を受光し、前記第1の検出器まで前記光を透過させるように位置づけされた第1の光ファイバを含んで成る、請求項43に記載の分光器。

【請求項46】

前記第2の吸収フィルタを通過する光を受光し、前記第2の検出器まで前記光を透過させるように位置づけされた第2の光ファイバをさらに含んで成る、請求項45に記載の分光器。

40

【請求項47】

前記第1のダイクロマティックミラーから反射された光を受光し前記第2の集光素子まで前記光を透過させるように位置づけされた反射ミラーをさらに有して成る、請求項38に記載の分光器。

【請求項48】

前記励起源により発出された光を受光するように位置づけされた第1のダイクロマティックミラー、

50

前記第 1 のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた第 2 の集光素子、及び

前記第 1 のダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光し前記検出器まで光を透過させるように位置づけされた第 1 の吸収フィルタ、
をさらに有して成る、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 49】

前記第 1 の吸収フィルタからの光を受光し前記検出器まで光を透過させるように位置づけされた光ファイバをさらに含んで成る、請求項 48 に記載の分光器。

【請求項 50】

前記第 1 の吸収フィルタからの光を受光し前記検出器まで光を透過させるように位置づけされたアパーチャをさらに含んで成る、請求項 48 に記載の分光器。 10

【請求項 51】

前記第 1 のダイクロマティックミラーにより反射された光を受光し前記第 2 の集光素子まで前記光を反射させるように位置づけされた第 1 の反射ミラーをさらに有して成る、請求項 48 に記載の分光器。

【請求項 52】

前記励起源によって励起された試料により発出された光を受光するように位置づけされた第 1 の光ファイバ、

前記第 1 の光ファイバからの光を受光するように位置づけされたビームスプリッタ、

前記ビームスプリッタに結合された第 3 の光ファイバ、 20

前記第 3 の光ファイバからの光を受光するように位置づけされた第 1 の吸収フィルタ、

前記ビームスプリッタに結合された第 4 の光ファイバ、

前記第 4 の光ファイバからの光を受光するように位置づけされた第 2 の吸収フィルタ、
及び

前記第 2 の吸収フィルタからの光を受光するように位置づけされた第 2 の検出器、
をさらに有して成り、

前記第 1 の検出器が前記第 1 の吸収フィルタからの光を受光するように位置づけされている、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 53】

前記第 1 の吸収フィルタからの光を受光し前記第 1 の検出器まで前記光を透過させるように位置づけされた第 5 の光ファイバをさらに含んで成る、請求項 52 に記載の分光器。 30

【請求項 54】

前記第 2 の吸収フィルタからの光を受光し、前記第 2 の検出器まで前記光を透過させるように位置づけされた第 6 の光ファイバをさらに含んで成る、請求項 52 に記載の分光器。

【請求項 55】

前記第 1 の光ファイバが前記第 1 の集光素子と直交関係にある、請求項 52 に記載の分光器。

【請求項 56】

前記第 1 の光ファイバが前記第 1 の集光素子と線形の関係にある、請求項 52 に記載の分光器。 40

【請求項 57】

前記励起源がレーザーである、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 58】

前記励起源がマルチラインレーザーである、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 59】

試料チャンバをさらに有して成る、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 60】

前記試料チャンバがフローチャンバを含む、請求項 29 に記載の分光器。

【請求項 61】

励起光減衰装置をさらに有して成る、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 6 2】

前記励起光減衰装置がニュートラルデンシティフィルタ、シャッタ、音響光学カップラ、ポッケルスセル又はそれらの組合せを含んで成る、請求項 1 に記載の分光器。

【請求項 6 3】

単色光源、

前記単色光源により発出された光を試料上に集束させる光集束装置、

光を検出する能力をもつ検出器、

前記検出器に結合され、前記光源により励起された試料により発出された光を受光するように位置づけられた光ファイバ、及び

前記検出器に結合され、前記検出器で受光したデータを処理し、自己相関データ、相互相関データ又はそれらの組合せを含むデータを提供する能力をもつ相関器、を有して成る、ポータブル式蛍光相関分光器。

10

【請求項 6 4】

携帯用ケース、及び

前記携帯用ケース内に配置された請求項 1 に記載のポータブル式蛍光相関分光器を有して成る物品。

【請求項 6 5】

携帯用ケース、及び

前記携帯用ケース内に配置された請求項 3 に記載のポータブル式蛍光相関分光器を有して成る物品。

20

【請求項 6 6】

液体試料が中を流れることのできるチャンバをさらに有し、前記分光器の共焦点面が前記チャンバ内に含まれるように該チャンバが位置づけされている、請求項 6 3 に記載の分光器。

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【0001】

本発明は、蛍光相関分光法に関する。

【背景技術】

30

【0002】

本出願は、2003年4月8日付の米国仮出願第60/461,394号、2002年12月2日付の米国仮出願第60/430,273号及び2002年8月1日付の米国仮出願第60/400,503号に対する優先権を主張するものである。

【0003】

蛍光相関分光法(FCS)は、少量例えばフェムトリットルの試料中の分子を検出するのに使用されてきた単一分子検出方法である。FCSは、研究される試料の体積を共焦点面のものに制限するために共焦点光学系を利用する技術である。共焦点面は、システムの光学コンポーネントによって画定される。図1は、試料のレーザービーム照明を受けた体積(ボリューム)を例示している。レーザービームのくびれ部に重ね合わされた形でボックスが示されている。該システムの光学コンポーネントは、レーザービームのくびれ部に共焦点面を位置づけるように機能する。照明された共焦点体積内へ及びそこから外への蛍光標識された粒子の拡散は、蛍光強度変動に関するデータを生成する。試料内の粒子についての情報はこのデータから抽出することができる。

40

【0004】

FCSにおいては、焦点外の光を低減させ、画像検出を焦点内の光の所望の焦点面(すなわち、像平面とも呼ばれる試料平面)に制限するために光学系が利用される。励起体積/すなわち共焦点体積)は、高アパーチャ数の対物レンズの解像度の限界まで集束されたレーザービームで該体積を照明することによって最小限におさえられる。対物レンズの共役像平面内にそして検出器の前に視野ピンホール(すなわちアパーチャ)を設置すること

50

によって、焦点外の光は除去される。焦点外の光を除去することで、検出体積は、物体が焦点合せされる平面に制限される。物体面の上又は下の平面からの信号は、共役像平面の上か又は下のいずれかで集束され、こうして、これらの信号は、焦点合せされた画像が通過できるアパーチャの場所に起因して低効率で収集されたものとなる。問題の試料中にある蛍光標識された粒子は、共焦点体積の像平面に粒子が存在する場合にのみ検出される。

【0005】

FCSは、生物物理学、生化学、及び細胞生物学において用いられる技術である。FCSは単一分子のレベルでの事象を研究するために使用可能である。マクロ分子の拡散時間及び相互作用、蛍光標識された粒子の絶対濃度、そして化学反応の反応速度を、FCSを用いて測定することができる。FCSの応用分野には、リガンド受容体結合、タンパク質-タンパク質及びタンパク質-DNA相互作用、及び蛍光標識された粒子の凝集に関係する研究も含まれていた。FCSの理論及び応用分野は、Rigler, R (1995年), 「蛍光相関, 単一分子検出及び多数スクリーニング、バイオテクノロジーにおける応用分野」、J. Biotechnol 41 (2-3): 177-86; Schwille, P. (2001), 「蛍光相関分光法及び細胞内の応用分野に対するその将来性」 Cell Biochem Biophys 34 (3): 383-408; 及び Hess, S.T., S. Huang, et al. (2002), 「蛍光相関分光法の生物学的及び化学的応用分野: そのレビュー」 Biochemistry 41 (3): 697-705 を含めたさまざまな参考文献中に記述されている。

10

【0006】

標準的なFCS分光器は、エピ蛍光顕微鏡又は共焦点顕微鏡を含むように構成される。これらの構成は比較的大きく、ユーザーは顕微鏡を焦点合せし調整し、かつ使用前に分光器のさまざまなコンポーネントを心合せする必要がある。

20

【発明の開示】

【0007】

1つの形態において、本発明は、励起源、励起源により発出された光を受光するべく位置づけられた少なくとも1つの集光素子(例えばレンズ、光ファイバ又はそれらの組合せ)、励起源により励起された試料により発出された光を受光するように位置づけられた、光検出用検出器、及び検出器で受光したデータを処理し、自己相関データ、相互相関データ又はそれらの組合せを含むデータを提供するための、該検出器に結合された相関器、を含むポータブル式蛍光相関分光器を特徴とする。1つの実施形態においては、該分光器は、検出器に光を透過させるように位置づけられた吸収フィルタをさらに含んで成り、該吸収フィルタは、励起源によって発出された光の波長よりも大きい波長をもつ光を透過させる。その他の実施形態においては、集光素子は、光ファイバを含んでいる。いくつかの実施形態においては、光ファイバは、励起源に結合されている。その他の実施形態においては、該分光器は、励起源により励起された試料によって発出された光を受光するように位置づけられたアパーチャをさらに含んでいる。1つの実施形態においては、集光素子は、集束レンズを含む。

30

【0008】

その他の実施形態においては、該分光器は、試料体積中で励起源により発出された光を集束するべく位置づけられた第2の集光素子をさらに含む。いくつかの実施形態においては、該分光器は、励起源及び第1の集光素子に結合された光ファイバをさらに含む。

40

【0009】

その他の実施形態においては、該分光器は、試料チャンバ及び第2の集光素子をさらに含み、第1の集光素子は、前記試料チャンバ内に配置された第1の端部をもつ光ファイバを含み、第2の集光素子は光ファイバの第1の端部上に焦点合わせされている。もう1つの実施形態においては、試料チャンバはフローチャンバを含んでいる。

【0010】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、第2の集光素子を通して透過された光を受光し検出器まで光を透過させるように位置づけられた吸収フィルタをさらに含んでいる。1つの実施形態においては、前記集光素子には、励起源に結合された第1の光ファイバ

50

が含まれており、該分光器は、励起源によって励起された試料が発出した光を受光するように位置づけられた第2の光ファイバをさらに含んでいる。もう1つの実施形態においては、第2の光ファイバは前記第1の光ファイバと直交関係にある。1つの実施形態においては、第2の光ファイバは前記第1の光ファイバと線形の関係にある。

【0011】

その他の実施形態においては、該分光器は、第2の集光素子をさらに含んで成り、第1の集光素子は第2の集光素子と直交関係にある。もう1つの実施形態においては、該分光器は、第2の集光素子をさらに含んで成り、第1の集光素子は第2の集光素子と線形の関係にある。

【0012】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、第2の光ファイバからの光を受光し検出器まで光を透過させるように位置づけられた吸収フィルタをさらに含む。その他の実施形態においては、該分光器は、アパーチャからの光を受光し、検出器まで光を透過させるように位置づけられた吸収フィルタをさらに含む。もう1つの実施形態においては、該分光器は、吸収フィルタから検出器まで光を透過させるように位置づけられた第3の光ファイバをさらに含んでいる。

【0013】

1つの実施形態においては、集光素子は励起源に結合された第1の光ファイバを含み、該分光器は、前記第1の光ファイバの端部が中に延びている試料チャンバ、第2の集光素子、及び第2の集光素子からの光を受光し、検出器に光を透過させるように位置づけられた吸収フィルタ、をさらに含んでいる。いくつかの実施形態においては、第2の集光素子は光ファイバの端部上に焦点合わせされている。その他の実施形態においては、第2の集光素子は、レンズを含んでいる。

【0014】

その他の実施形態においては、該分光器は、励起源から光を受光するように位置づけられた第1のダイクロマティックミラー、ダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけられた第2の集光素子、第1のアパーチャ、ダイクロマティックミラーを通しかつ第1のアパーチャを通して透過させられた光を受光するように位置づけられた第3の集光素子、及び第3の集光素子を通して透過させられた光を受光するように位置づけられた第2のダイクロマティックミラー、をさらに含み、第1の検出器は、第2のダイクロマティックミラーから反射された光及びダイクロマティックミラーを通して透過させられた光のうち少なくとも1つを受光するように位置づけされている。

【0015】

1つの実施形態においては、該分光器は、第2のダイクロマティックミラーから反射された光及びダイクロマティックミラーを通して透過させられた光のうち少なくとも1つを受光するように位置づけられた第1の吸収フィルタをさらに含む。

【0016】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、第2のダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光するように位置づけられた第2の吸収フィルタ、ダイクロマティックミラーにより反射された光を受光するように位置づけされている第1の吸収フィルタ、及び第2の吸収フィルタを通して透過させられた光を受光するように位置づけられた第2の検出器、をさらに含んでいる。

【0017】

その他の実施形態においては、該分光器は、第1のダイクロマティックミラーから反射された光を受光し、光を第2の集光素子まで透過させるように位置づけられた第1の反射ミラーをさらに含んでいる。1つの実施形態においては、該分光器は、第1のダイクロマティックミラーから反射された光を受光し光を第2の集光素子まで透過させるように位置づけられた第1の反射ミラーをさらに含んでいる。

【0018】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、第1のダイクロマティックミラーにより

10

20

30

40

50

透過させられた光を受光し第1のアーチャー上に光を集束させるように位置づけされた第4の集光素子をさらに含んでいる。

【0019】

もう1つの実施形態においては、第2の集光素子は、無限補正済み対物レンズであり、第4の集光素子はチューブレズを含んでいる。

【0020】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、励起源から光を受光するように位置づけされた第1のダイクロマティックミラー、第1のダイクロマティックミラーにより反射された光を受光するように位置づけされた第2の集光素子、ダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光するように位置づけされた第3の集光素子、第3の集光素子を通して光を受光するように位置づけされた第2のダイクロマティックミラー、第1のアーチャー及び第1の光ファイバのうちの少なくとも1つを含んで成る第1のコンポーネント、及び第1のコンポーネントを通して第2のダイクロマティックミラーから反射された光及び該第1のコンポーネントを通し第2のダイクロマティックミラーを通過して透過させられた光のうちの少なくとも1つを受光するように位置づけされた第1の検出器、をさらに含んでいる。1つの実施形態においては、該第1のコンポーネントは第1のアーチャーである。もう1つの実施形態においては、該第1の検出器は、第1のコンポーネントを通して前記第2のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされており、該分光器は、第2のアーチャー及び第2の光ファイバのうちの少なくとも1つを含む第2のコンポーネント、及び第2のダイクロマティックミラー及び該第2のコンポーネントを通過して透過させられた光を受光するように位置づけされた第2の検出器、をさらに含んでいる。

10

20

【0021】

1つの実施形態においては、該第1のコンポーネントは第1のアーチャーであり、該第2のコンポーネントは第2のアーチャーである。もう1つの実施形態においては、該第1のコンポーネントは第1の光ファイバであり、該第2のコンポーネントは第2の光ファイバである。

【0022】

その他の実施形態においては、該分光器は、第2のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた第1の吸収フィルタをさらに含んでいる。

30

【0023】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、第2のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた第1の吸収フィルタ、及び第2のダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光するように位置づけされた第2の吸収フィルタをさらに含んでいる。1つの実施形態においては、第1のコンポーネントは、第1の吸収フィルタを通して透過させられた光を受光し、第1の検出器まで光を透過させるように位置づけされた第1の光ファイバを含んでいる。

【0024】

その他の実施形態においては、該分光器は、第2の吸収フィルタを通過する光を受光し、第2の検出器まで前記光を透過させるように位置づけされた第2の光ファイバをさらに含んでいる。

40

【0025】

その他の実施形態においては、該分光器は、第1のダイクロマティックミラーから反射された光を受光し第2の集光素子まで光を透過させるように位置づけされた反射ミラーをさらに含んでいる。

【0026】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、励起源により発出された光を受光するように位置づけされた第1のダイクロマティックミラー、第1のダイクロマティックミラーから反射された光を受光するように位置づけされた第2の集光素子、および第1のダイクロマティックミラーを通して透過させられた光を受光し検出器まで光を透過させるように

50

位置づけされた第1の吸収フィルタ、をさらに含んでいる。

【0027】

その他の実施形態においては、該分光器は、第1の吸収フィルタからの光を受光し検出器まで光を透過させるように位置づけされた光ファイバをさらに含んでいる。

【0028】

その他の実施形態においては、該分光器は、第1の吸収フィルタからの光を受光し検出器まで光を透過させるように位置づけされたアパーチャをさらに含んでいる。

【0029】

その他の実施形態においては、該分光器は、第1のダイクロマティックミラーにより反射された光を受光し第2の集光素子まで光を反射させるように位置づけされた第1の反射ミラーをさらに含んでいる。 10

【0030】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、励起源によって励起された試料により発出された光を受光するように位置づけされた第1の光ファイバ、第1の光ファイバからの光を受光するように位置づけされたビームスプリッタ、ビームスプリッタに結合された第3の光ファイバ、前記第3の光ファイバからの光を受光するように位置づけされた第1の吸収フィルタ、ビームスプリッタに結合された第4の光ファイバ、第4の光ファイバからの光を受光するように位置づけされた第2の吸収フィルタ、及び第2の吸収フィルタからの光を受光するように位置づけされた第2の検出器、をさらに含んでおり、第1の検出器は第1の吸収フィルタからの光を受光するように位置づけされている。 20

【0031】

1つの実施形態においては、該分光器は、第1の吸収フィルタからの光を受光し第1の検出器まで光を透過させるように位置づけされた第5の光ファイバをさらに含んでいる。

【0032】

もう1つの実施形態においては、該分光器は、第2の吸収フィルタからの光を受光し、第2の検出器まで光を透過させるように位置づけされた第6の光ファイバをさらに含んでいる。

【0033】

いくつかの実施形態においては、第1の光ファイバは、第1の集光素子と直交関係にある。 30

【0034】

その他の実施形態においては、第1の光ファイバは、第1の集光素子と線形関係にある。1つの実施形態においては、励起源は、レーザーである。1つの実施形態においては、励起源は、マルチラインレーザーである。

【0035】

いくつかの実施形態においては、該分光器は、さらに試料チャンバを含む。1つの実施形態においては、試料チャンバは、フローチャンバを含む。

【0036】

その他の実施形態においては、該分光器は、励起光減衰装置をさらに含んでいる。1つの実施形態においては、励起光減衰装置は、ニュートラルデンシティフィルタ、シャッタ 40、音響光学カップラ、ポッケルスセル又はそれらの組合せを含んでいる。

【0037】

もう1つの実施形態においては、ポータブル式蛍光相関分光器は、単色光源、単色光源により発出された光を試料上に集束させる光集束装置、光を検出する能力をもつ検出器、検出器に結合され、光源により励起された試料により発出された光を受光するように位置づけされた光ファイバ、及び検出器に結合され、検出器で受光したデータを処理し、自己相関データ、相互相関データ又はそれらの組合せを含むデータを提供する能力をもつ相関器、を含んでいる。

【0038】

もう1つの実施形態においては、本発明は、携帯用ケース及び該携帯用ケース内に配置 50

された本明細書で開示されているポータブル式蛍光相関分光器を含んで成る物品を特徴としている。

【0039】

その他の態様においては、本発明は、本明細書で記述されているポータブル式蛍光相関分光器を用いる方法において、蛍光体を含む試料を励起させる段階を含む方法に特徴を有している。1実施形態においては、該方法はさらに、励起を検出しかつ場合によっては該励起を分析する段階を含んでいる。

【0040】

本発明は、ポータブル式蛍光相関分光器に特徴を有する。FCS分光器は、携帯用ケース内にフィットできるように既存のFCS分光器に比べて小型、コンパクトかつ軽量となるように構築可能であり、携帯用ケースに類似した態様で移動可能である。FCS分光器は、試料体積内の固定平面に焦点が設定されるような固定ステージモードで作動可能である。FCSは、ユーザーの調整及び心合わせが相対的に最小である状態でかつ比較的簡単に作動できるFCS分光器を提供するように構成可能である。

10

【0041】

その他の特長及び利点は、好ましい実施形態の以下の記述及び特許請求の範囲を添付図面と合わせて考慮することにより明白となるだろう。なお、図面中、同一の参照番号は類似の要素を特定している。

【0042】

用語解説

20

本発明に関連して、以下の用語は次の通りの意味をもつ。

【0043】

「光ファイバ」という語は、光を搬送できる少なくとも1つのファイバを意味する。

【0044】

「マルチモード光ファイバ」という語は、光の多重波長を搬送できる少なくとも1つのファイバを意味する。

【0045】

「単一モード光ファイバ」という語は、光の単一波長を搬送できる少なくとも1つのファイバを意味する。

【0046】

「集光素子」という語は、光を相対的により小さい体積に圧縮する素子を意味する。

30

【発明を実施するための最良の形態】

【0047】

図2～図5は、DPSSLレーザー10、x-yマイクロメーターポジション上に位置づけられた集光レンズ12、ND(ニュートラルデンシティ)フィルタ14、ダイクロマティックミラー16、100%反射ミラー18、一次対物レンズ20、x-yマイクロメーターポジション上に位置づけられたピンホールサイズのアパーチャ22、x-yマイクロメーターポジション25上に取付けられた二次対物レンズ26、第2のダイクロマティックミラー28、第1の吸収(エミッション)フィルタ30、第2の吸収(エミッション)フィルタ32、各々がコネクタ34a、34b(例えばFCコネクタ及びSMAコネクタを含めた任意の適切な光ファイバコネクタ)を介して該吸収フィルタに接続されx-y-zマイクロメーターポジション27a、27bに結合された2つのマルチモード光ファイバ38、36、及び検出器40を含むFCS分光器2を例示している。作動中、DPSSLレーザー10は532nmの波長をもつ単色光を発する。532nmの光は集束レンズ12まで透過され、このレンズは、光が対物レンズ20の背面焦点面を満たすようにレーザービームを拡大する。対物レンズに到達する前に、光はNDフィルタ14を通過し、このフィルタは、試料(図示せず)に到達する光の所望量を達成するように光を減衰させる。なお試料は、対物レンズ20の焦点面内に位置づけられている。対物レンズ20に到達する前に、減衰された光は次に第1のダイクロマティックミラー16まで移行し、このダイクロマティックミラーは、異なる波長の光を透過させまた反射することができるという特

40

50

性を有している。ダイクロマティックミラー 16 の特性は、ミラーがレーザーから来る 532 nm 光の 98% を反射し、蛍光すなわち 553 nm より大きい波長を有する光の形で試料から発出された光の 90 ~ 100% を透過させるように選択される。532 nm の波長をもつ反射光は次いで、到来する光の経路の平面に対し 45° の角度で取付けられた 100% 反射ミラー 18 まで透過させられる。ミラー 18 は光を一次対物レンズ 20 まで反射する。ミラー 18 に透過された光の 100 パーセントが一次対物レンズ 20 に対し反射される。光は、対物レンズ 20 に位置づけられた試料上で小さい集束ビームを形成する対物レンズの背面焦点面を満たす。この配置では、対物レンズ 20 は 160 mm という固定管長を有する。

【0048】

対物レンズ 20 において、共焦点体積（ボリューム）内に位置づけられた試料（図示せず）が蛍光を発出するかぎり、発出された蛍光は、対物レンズ 20 を通って下へと、取付けられたミラー 18 まで戻る。取付けられたミラー 18 は、第 1 のダイクロマティックミラー 16 まで光路に沿って蛍光の 100% を反射し戻す。553 nm よりも大きい波長をもつ発出された蛍光はダイクロマティックミラー 16 を通して透過され、一次対物レンズ 20 の肩部から 160 mm の距離だけ離隔されたピンホールサイズのアパーチャ 22 を通して集束される。

【0049】

蛍光は次に、光路内においてピンホールサイズのアパーチャ 22（すなわち像平面）上に焦点合せされている二次対物レンズ 26 まで移行する。蛍光は二次対物レンズ 26 を通って、光路に対し 45° の角度で取付けられている第 2 のダイクロマティックミラー 28 まで移行する。ダイクロマティックミラー 28 は、620 nm 未満の波長をもつ蛍光を反射し、620 nm より大きい波長を有する蛍光を透過させる。620 nm 未満の波長をもつ蛍光は、吸収フィルタ 30 までそしてこれを通して走行する。吸収フィルタ 30 は、575 nm ~ 615 nm の波長をもつ蛍光を選択し透過させる。透過された蛍光は次に、FC コネクタ 34 により所定の位置に維持され x - y - z マイクロメータポジション上に取付けられる直径 1 mm のマルチモード光ファイバ 36 の中に入る。x - y - z マイクロメータポジションは、集束された画像の正確な場所を保証することができる。蛍光は光ファイバ 36 に沿って第 1 のフォトン検出器 40 a まで搬送される。

【0050】

620 nm より大きい波長を有する蛍光は、ダイクロマティックミラー 28 を通って走行する。吸収フィルタ 32 は 615 nm から 650 nm までの波長を有する蛍光を選択し透過させる。透過された蛍光は次に、FC コネクタ 34 により所定の位置に維持され x - y - z マイクロメータポジション上に取付けられた直径 1 mm のマルチモード光ファイバ 36 内に入る。蛍光は光ファイバ 38 に沿って第 2 のフォトン検出器 40 b まで搬送される。検出器 40 a、40 b からの出力は、相互相関及び自己相関が行なわれるデジタルハードウェア相関器まで送られる。次にデータは USB ケーブルを介してコンピュータまで転送される。

【0051】

例えばレンズ、光ファイバ及びピンホールサイズのアパーチャを含めた FCS 分光器のさまざまなコンポーネントが x - y マイクロメータポジション 24 上に配置され、分光器の光路を心合せするべく 2 つの方向に各コンポーネントが移動できるようにするためのマイクロメータ調整機構を含んでいる。最適な結果、データ及びデータ分析を得るために分光器の光路を心合せすることが好ましい。

【0052】

検出器 40 a 及び 40 b は、BNC 接続を通して接続されているケーブルを介してハードウェア相関器まで送られる正の TTL パルスを出力する。該相関器は、検出器 40 a 及び 40 b から受信したデータを収集し分析する。1 つの有用な相関器は、12.5 ナノセカンドという理論上のサンプリング時間を有し、BNC コネクタを介して光電子増倍管モジュールから 2 つの TTL 入力を受け入れる、Correlator.com から入手可能な FLEX

10

20

30

40

50

2 K 1 2 x 2 マルチプルタウ外部デジタル相関器である。もう1つの適切な相関器は www.alvghmbh.de からの ALV デジタル相関器である。

【0053】

FCS 分光器は、USB ポートを伴うデスクトップ又はラップトップ型コンピュータからランできるデータ収集及びデータ分析ソフトウェアを含む。ソフトウェアは、検出器 40 a、40 b から受信したデータを分析し、統計パラメータと共にコンピュータスクリーン上にデータを表示する。

【0054】

FCS 分光器は、自己相関モード、相互相関モード又はそれらの組合せで利用可能である。自己相関は、共焦点体積内での単一の蛍光粒子の持続性を測定する。相互相関は、2つの異なる蛍光プローブについての2つの波長における蛍光強度の各変動の間の相関関係を測定する。相関器内のプログラムは、検出器から受信したデータを分析し操作し、かつ自己相関又は相互相関を実施するためにさまざまなアルゴリズムを利用する。これらのアルゴリズムは、以下の関係式に基づくものである。

10

【0055】

自己相関は、標識づけされた粒子が検出体積（ボリューム）内に及びそこから外へ拡散するにつれての蛍光強度の変動を時間的に相関する。蛍光強度変動の統計学的分析は、経時的な蛍光強度における時間的相関関係の崩壊を示す自己相関曲線を結果としてもたらず。自己相関関数は、以下の式から求められる：

【0056】

20

【数1】

$$G(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I(t) * \delta I(t+\tau) \rangle}{\langle I \rangle^2}, \quad (1)$$

【0057】

なお式中、 I は、平均 $\langle I \rangle$ を中心とする強度の偏差を意味している。

30

【0058】

相互相関は、同じ共焦点体積の中で検出可能な別個の励起及び発光特性をもつ2つの異なる蛍光標識を導入することによって標準的な自己相関 FCS を拡張する。それは2つの識別可能な標識の強度変動を時間的に相関する。同じマクロ分子上のこれらの蛍光標識の同時発生は、短かい時点における振幅 R の変化として検出され、相互相関関数の振幅は、2重標識された蛍光粒子の濃度に正比例する。相互相関関数は、以下の式から求められる：

【0059】

【数2】

40

$$r(\tau) = \frac{\langle \delta I_i(t) * \delta I_j(t+\tau) \rangle}{SD_i * SD_j} \quad (2)$$

【0060】

等式2の相関関数は、一般に統計において使用される形態である。相関関数は、完全相互相関については1になり、そして相互相関無しの場合には0になる。手段としては、自己相関関数についての等式1と類似の形で相互相関関数を定義づけする方が簡単である。

50

【 0 0 6 1 】

【 数 3 】

$$R(\tau) = 1 + \frac{\langle \delta I_i(t) * \delta I_j(t+\tau) \rangle}{\langle I_i \rangle * \langle I_j \rangle} \quad (3)$$

【 0 0 6 2 】

この形態は、進行中のデータストリームから実時間で計算するのにより単純なものであり、 $I_i = I_j$ である場合には $R(\tau) = G(\tau)$ であるというさらなる利点をもつ。

【 0 0 6 3 】

相関についての緩和時間は、拡散といったようなランダム化の確率論的なプロセスに関係し、一方、強度変動の規模は、確率論的プロセスに参与する分子又は粒子の数に関係する。自己相関関数は、これらの変動を分析し、拡散係数、凝集状態化学濃度、化学反応速度及び溶解状態ならびに生きた細胞の原形質膜中のマクロ分子の化学量論についての情報を生成するために使用されてきた。

【 0 0 6 4 】

FCS分光器により生成されたデータから、例えば粒子間の相互作用の有無、粒子拡散時間、粒子相互作用の化学量論、相互作用する粒子の濃度及び粒子間の相互作用の反応速度を含めたさまざまな付加的情報を得ることができる。

【 0 0 6 5 】

溶解状態の試料についての3次元(3D)自己相関関数に対し得られたデータを適合させるために非線形回帰が使用される。3D自己相関関数は等式4に対応する。

【 0 0 6 6 】

【 数 4 】

$$G(\tau) = 1 + \left(\frac{1}{N} \left(1 - T + T \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_r}\right) \right) \right) \left(\sum_i \frac{F_i}{\left(1 + \frac{\tau}{\tau_{D_i}} \right) \left(1 + \frac{\tau}{K^2 \tau_{D_i}} \right)^{1/2}} \right) \quad (4)$$

【 0 0 6 7 】

パラメータの推定値が、拡散する粒子種 i についての粒子数 (N)、3重項状態分数 (T)、3重項状態相関時間 (τ_r)、粒子分数 (F_i) 及び拡散時間 (τ_{D_i}) について計算される。 $K = \sqrt{z^2 + x^2}$ (z 及び x はそれぞれ z 及び x 方向での $\exp(-2)$ ビーム半径である) として構造パラメータ K^2 は、別途決定され、各適合(フィット)について一定に保たれる。

【 0 0 6 8 】

上述の通り、チャンネル36及び38からのフォトン計数值、自己相関及び相互相関データは、USBポートを介してコンピュータに転送される。USBポートは、ハードウェア相関器からコンピュータまでデータを転送するためのインタフェースとして役立つ。自己相関及び相互相関データを獲得し分析するために書かれたコンピュータプログラムは、コンピュータのオペレーティングシステムに依存している。

【 0 0 6 9 】

FCS分光器は、携帯用ケース43内にフィットするように構築され得、また携帯用電源例えばバッテリーを含めた適切な電源に結合され得る。

10

20

30

40

50

【0070】

その他の実施形態も本特許請求の範囲内に入る。例えば図6は、図2のピンホールサイズのアパーチャ22が図2のFCS分光器内のその位置から除去された、FCS分光器のもう一つの実施形態を例示している。この構成では、1つの画像が、共役像平面内の試料平面で形成され、図2内のピンホールサイズのアパーチャ22が以前に占めていた領域の中に精確に位置づけされている。こうして、ピンホールサイズのアパーチャ22を除去することができ、対物レンズ26を像平面上に焦点合せすることができる。共焦点体積は、検出器40に導く光ファイバ34上にz軸焦点平面内のより多くの迷光が画像形成されることになるため、図2のFCS分光器の共焦点体積に比べてわずかに大きいものであり得る。

10

【0071】

図7は、FCコネクタ34によって図2のピンホールサイズのアパーチャ22が以前に占有していた領域内に位置づけされた状態で維持されている光ファイバ42を含むようにFCS分光器が構成されている、FCS分光器の1つの実施形態を例示している。かかる構成は、FCS分光器が自己相関モードで機能することを可能にする。光ファイバ42はピンホールサイズのアパーチャとして役立ち、単一の検出器40まで蛍光信号を搬送する。

【0072】

もう一つの実施形態においては、図2のFCS分光器は、二次対物レンズ26の代りに非球面レンズを含んでいる。非球面レンズは、二次対物レンズ26の場所に位置づけされている。本明細書に記述されるさまざまなFCS分光器において、二次対物レンズを非球面レンズで置換することが可能である。

20

【0073】

その他の実施形態においては、FCS分光器のいくつかの実施形態のうちの任意の実施形態のレンズ12を2レンズ式ビーム拡大系又はネガティブ色消しダブレットレンズで置換することが可能である。

【0074】

図8は、FCS分光器が光路内に位置づけされたチューブレンズ44を含んでいるという点を除いて、図2のものに類似したFCS分光器を例示している。分光器内にチューブレンズ44を包含させることにより、無限補正光学素子の実現が可能になる。無限補正光学素子は、固定された管長のレンズ系に存在する或る種のサイズ/距離上の制約を無くし、所望の場所で画像焦点を達成するための付加的な光学素子の使用を可能にする。

30

【0075】

図9は、2つのピンホールサイズのアパーチャ116、120を含み、対物レンズを含まない無レンズFCS分光器を例示している。第1のピンホールサイズのアパーチャ116はレーザー10と試料の間に位置づけされており、第2のピンホールサイズのアパーチャ120は試料と検出器140の間に位置づけされている。第1のピンホールサイズのアパーチャ116は迷光を光源から排除する。第2のピンホールサイズのアパーチャ120は、励起された試料から発出された蛍光迷光を排除する。検出器140は、発出された蛍光がアパーチャ120を通過した後、試料から発出済み蛍光のフォトンを集めるのに用いられる。レーザー10からの光は、光ファイバ114を介して試料118まで透過させられる。レーザー10による励起に起因して試料により発出された蛍光は、光ファイバ122を介して試料から検出器140まで搬送される。照明114及び検出ファイバ122は互いに90°の角度で方向づけされている。この場合、試料チャンバ118はキュベットである。

40

【0076】

図10は、照明114及び検出ファイバ122が互いに90°の角度ではなく互いに列方向に方向づけされている無レンズFCS分光器を例示している。試料118は第1のピンホールサイズのアパーチャ116と第2のピンホールサイズのアパーチャ120の間に位置づけされている。

50

【0077】

図11は、ピンホールサイズのアパーチャ116、120が試料チャンバ124にすぐ隣接して位置づけられ、かくして試料チャンバがアパーチャ116と120の間にはさまれるようになっている、図10内に例示されたFCS分光器の第2の実施形態を例示している。試料チャンバ124は、2つのピンホールサイズのアパーチャ116、120の間に収納されてもよいし、又は以下に記述するようにフローチャンバとして構成されていてもよい。

【0078】

代替的には、図9~11に例示されているアパーチャ116、120は除去することもでき、そして光ファイバがピンホールサイズのアパーチャとして役立つこともできる。代替的には、アパーチャとして役立つ光ファイバとアパーチャの任意の組合せを包含するようにFCS分光器を構成することもできる。

【0079】

図12は、試料118が発出する蛍光に付随する波長について選択的である吸収フィルタ128を保持する、付加的チャンバ130を含むFCS分光器を例示している。チャンバ130は、光ファイバ122、133をチャンバ130に結合するFC接続部125、126を含んでいる。吸収フィルタ128は、光路内に位置づけられている。光ファイバ114、122は、相互に対して90°の方向性で構成されているものとして例示されている。代替的には、光ファイバは互いに列方向に構成されてよい。第3の光ファイバ132が光を検出器140に透過させる。

【0080】

図13は、図12の無レンズFCS分光器に修正を加えたものを例示している。FCS分光器は、ビームスプリッタ127、2つの吸収フィルタ130a、130b及び2つの検出器140a、140bを含んでいる。ビームスプリッタ127は、相互相関モードでの検出器の使用を可能にする。2つの吸収フィルタ130a、130bは、発出された蛍光の特定の波長を選択する能力をもつ。列をなすビームスプリッタ127は蛍光信号を2つのチャンネルに分割し、その各々を個別に自己相関技術を用いて、又はそれと一緒に相互相関技術を用いて分析することが可能である。光の2つのチャンネルは次に別々に第1の光ファイバ136a及び第2の光ファイバ134aまで移行し、その後それぞれ付随する吸収フィルタ130a、130bまで移行する。吸収フィルタは、光ファイバ134b、136bを通して予め定められた波長の光を検出器140a、140bまで選択的に透過させる。

【0081】

FCS分析により提供された量的パラメータを得るため、近接場(ニアフィールド)走査型光学顕微鏡(NSOM)をFCS検出と組み合わせることができる。図14は、一般化された近接場セットアップを例示している。レーザー10からの光は、アルミ被覆された先端をもつテーパがかかった端部174を有する光ファイバ172を通して透過させられる。該先端は、例えば50nm以下といった適切な直径を有するように研磨されることができる。先端176は、試料を照明するためのプローブ176として機能する。対物レンズ180がこのプローブ176上で焦点合せされる。液体試料178が、顕微鏡の焦点平面を通過する。溶液がプローブのそばを通るにつれて、FCSデータ分析のため顕微鏡を通してフォトンが収集される。プローブにおいてレーザー光により励起された時点で試料により発出された蛍光は対物レンズ180を通過し、次に吸収フィルタ182を通過して検出器140まで移行する。

【0082】

試料チャンバ内に試料を設置することにより、共焦点体積に試料を位置づけることができる。試料チャンバは、例えば単一ウェル及び多重ウェルを含むさまざまな構成を有することができる。試料チャンバは、1つのコントロール(例えばベースライン情報を得るため)、多数の試料、多数のコントロール及びそれらの組合せを包含できる。有用なチャンバは光学的に透明なキュベットを含む。

10

20

30

40

50

【0083】

もう1つの実施形態においては、FCS分光器は、共焦点体積内に位置づけられたフローチャンバを含んでいる。フローチャンバは、ある体積の試料を収容するように寸法決定された試料チャンバ、試料が試料チャンバ内にもたらされる入力端、そして試料チャンバから外に試料が移行するときに通る出力端を含んでいる。管類が試料タンクを入力端に、そして出力端を廃棄物容器に結合している。管類、入力端、試料チャンバ及び出力端は連続した管であっても、又多数の管及びその他のコンポーネントを含んでいてもよい。適切なフローチャンバは、例えば、毛細管類、キュベット、円筒形フローセル、及びフラットフローセルを含む。図15、16、17a及び17bは、各々が入口及び出口ポート156、158を含むフラット矩形フローセル152、154及び円筒形フローセル150を含むさまざまなフローセル構成を例示している。

10

【0084】

本明細書で記述するFCS分光器構成の各々は、フローチャンバを含むか、又はフローチャンバを利用するように構成することができる。チャンバを通る試料の流れはポンプを用いて達成でき、ここで流速は研究中の粒子の拡散時間よりも大きい。フローチャンバが非確率論的なフローモードで機能するように構成されている場合には、2重標識された粒子の一致性及び粒子数についての情報を得ることができる。この情報は、相互相関研究及び一致性分析のために使用可能である。FCS分光器内で電気泳動フローも実現でき、この場合、研究対象の粒子の相対的電気泳動時定数についての情報を得ることができる。

【0085】

システムは、パルス化フローモードで機能するように構成することもできる。この構成では、観察体積内への及びそこから外への試料のパルス化された移動を伴ってフローチャンバが実現される。パルス化されたフローは、ポンプで、又は電気泳動フローを用いて達成できる。パルス化フローモードでは、試料は観察体積内にパルス送りされ、FCS検出が発生し、試料は該体積から外に流されて新しい試料と交換される。パルス化フローモードでは、時定数についての情報を得ることが可能である。

20

【0086】

図18は、入力管142に結合された入力端及び出力管144に結合された出力端を含むフローチャンバ146を含むFCS分光器の1つの実施形態を例示している。試料は、入力管類142を通過して試料チャンバ146内に、そして出力管類144を通過して外に流れる。フローチャンバ146は、図14において構成されているように使用することもできるし、そうでなければ図9、12及び13で記述されているように90°の角度でこれを使用することもできる。フローチャンバはまた、図13において構成されているように相互相関とも組合せることができる。

30

【0087】

図19は、2つのピンホールサイズのアパーチャ116、120の間にフローチャンバが配置されている図15の試料領域の代替的構成を例示している。試料は、入口管142を通してチャンバに供給され、出口管144を通してチャンバから除去することができる。

【0088】

本発明が、532nmの波長をもつレーザー発出単色光に関して記述されてきた。レーザーは、所望の任意の励起波長を発出するように選択され得る。利用可能な波長は、選択されたレーザーのタイプによって左右されることになる。適切なレーザーは、例えばアルゴン及びアルゴン/クリプトンレーザーを含めたイオンレーザーを含み、約457nm~568nmの波長で多重レーザーラインを生成する。イオンレーザーは、単一ライン、同調可能な多重ライン又は同時多重ラインであり得る。1つの適当なパワーレベルが選択される。適切なパワーレベルとしては、例えば約1mW、少なくとも約2mW、約5mW、少なくとも20mW、20mW~30mW、1mW~10W、又さらには30mW~10Wが含まれる。単一の波長を使用すべきである場合には、ヘリウム-ネオン(HeNe)レーザーが、543nm又は635nmのいずれかの波長をもつ光を発出する。その他の

40

50

適切なレーザーとしては、固体ダイオードレーザーが含まれる。市販の固体ダイオードレーザーは、例えば数ミリワット (mW) から数十mWまでを含めたさまざまなパワーレベルで430nm、473nm、488nm、490nm、532nm、633nm及び658nmの波長の可視レーザーラインを含めた、紫外線 (UV) から赤外線 (IR) までの波長をもつ光を発出する能力をもつ。選択されたレーザーは好ましくは、好ましくは3%未満のピーク間雑音といった、FCSの応用分野に対して十分な安定性を示す。

【0089】

分光器について、レーザーを光源として記述してきた。もう1つの適切な光源は、発光ダイオード (LED) である。LEDは連続波光源又はパルス化光源として用いることができる。

【0090】

適切なファイバとしては、偏光維持ファイバ及び波長最適化単一モードファイバ (例えば488nm及び/又は514nmに対して最適化されたファイバ) が含まれる。

【0091】

選択的に反射性の、選択的に透過性のミラーは、例えば試料内の蛍光標識の励起及び発光波長を含めたシステム内で利用される励起及び発光の両方の所望波長に基づいて選択可能である。

【0092】

データは、コンピュータスクリーン上で表示されているものとして記述されているが、例えばラップトップ型スクリーン及びチャート式記録計を含めた任意の適切な表示装置へと送ることもできる。

【0093】

その他の実施形態も特許請求の範囲内に入る。

【図面の簡単な説明】

【0094】

【図1】 蛍光標識された粒子を含む液体試料体積上に集束されたレーザービームのくびれ部を例示する図である。

【図2】 蛍光相関分光器の1実施形態の概略図である。

【図3】 図2の概略図のミラー及び対物レンズの側面概略図である。

【図4】 上方から撮った蛍光相関分光器の斜視図の写真である。

【図5】 携帯用ケース内に配置され、ラップトップ型コンピュータに結合された、図4の分光器の写真である。

【図6】 蛍光相関分光器の第1の変形実施形態の概略図である。

【図7】 蛍光相関分光器の第2の変形実施形態の概略図である。

【図8】 蛍光相関分光器の第3の変形実施形態の概略図である。

【図9】 蛍光相関分光器の第4の変形実施形態の概略図である。

【図10】 蛍光相関分光器の第5の変形実施形態の概略図である。

【図11】 図10の2つのピンホールサイズのアパーチャの間の試料チャンバの位置づけの変形実施形態の概略図である。

【図12】 蛍光相関分光器の第6の変形実施形態の概略図である。

【図13】 蛍光相関分光器の第7の変形実施形態の概略図である。

【図14】 蛍光相関分光器の第8の変形実施形態の概略図である。

【図15】 フローチャンバの一実施形態の正面図である。

【図16】 フローチャンバの他の実施形態の正面図である。

【図17a】 フローチャンバのさらに他の実施形態の正面図である。

【図17b】 90度回転させた図17aのフローチャンバの左側面図である。

【図18】 蛍光相関分光器の第9の変形実施形態の概略図である。

【図19】 2つのアパーチャの間に位置づけされた図18の試料フローチャンバの一変形実施形態の概略図である。

10

20

30

40

【 図 1 】

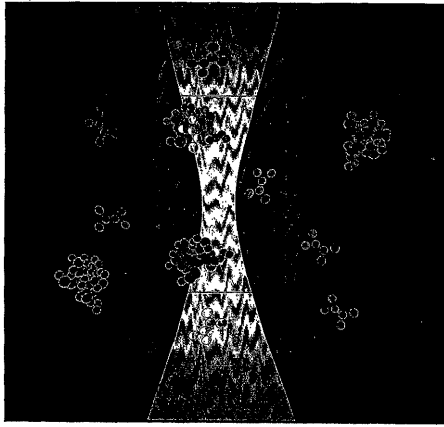


Fig. 1

【 図 2 】

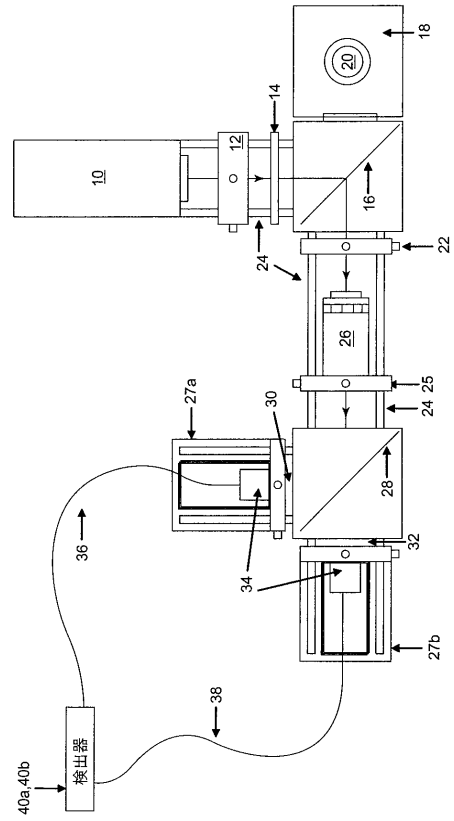


Fig. 2

【 図 3 】

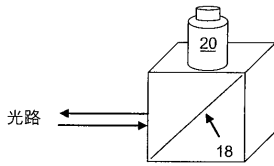


Fig. 3

【 図 5 】

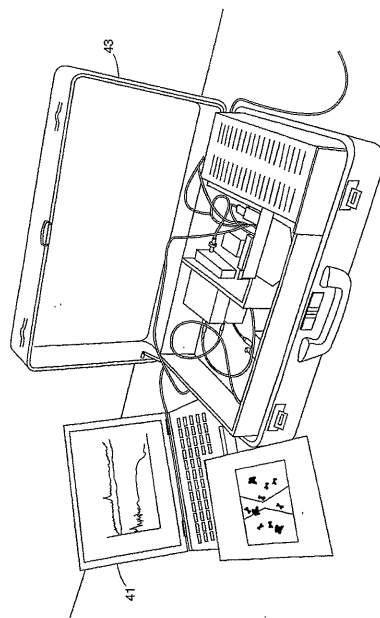


Fig. 5

【 図 4 】

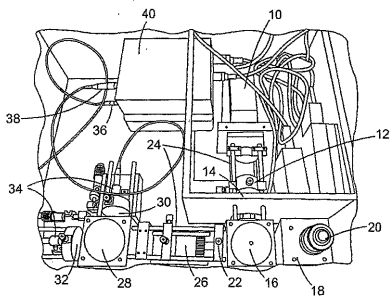


Fig. 4

【 図 6 】

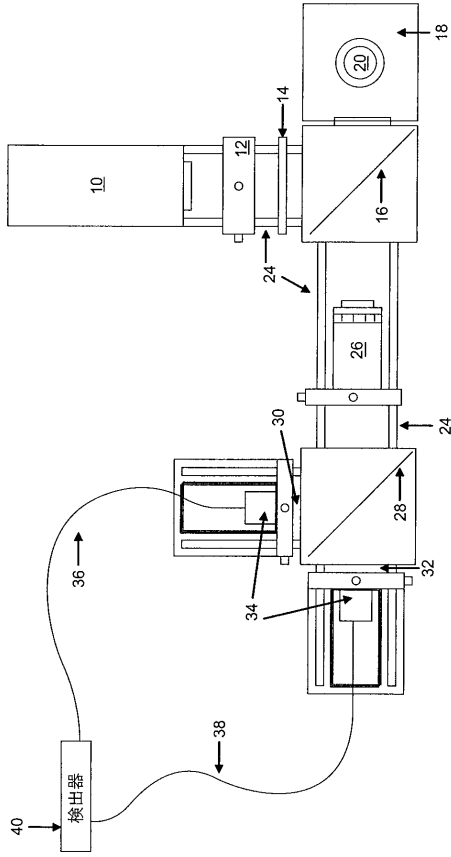


Fig. 6

【 図 7 】

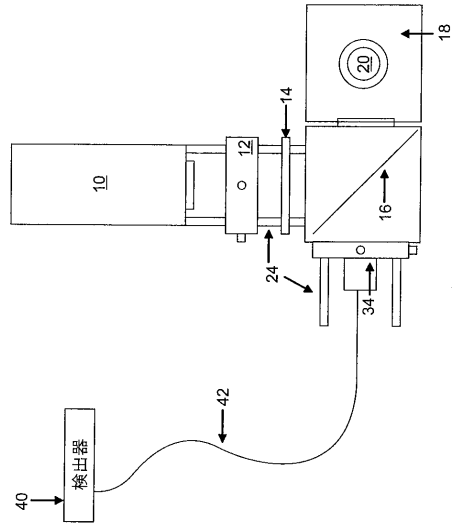


Fig. 7

【 図 8 】

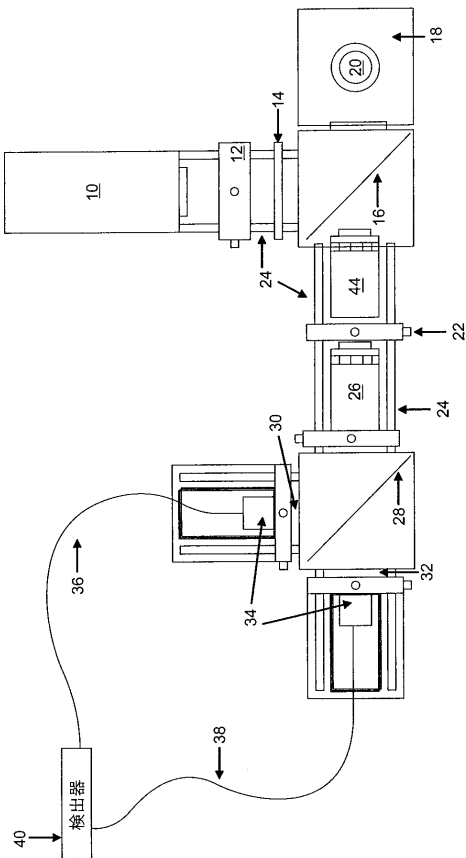


Fig. 8

【 図 9 】

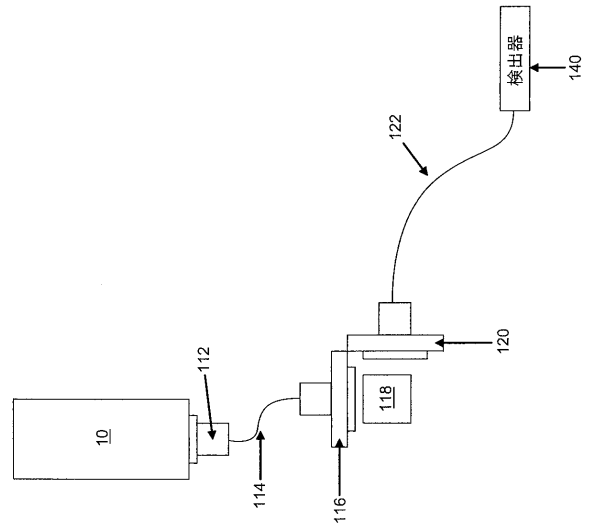


Fig. 9

【 図 1 0 】

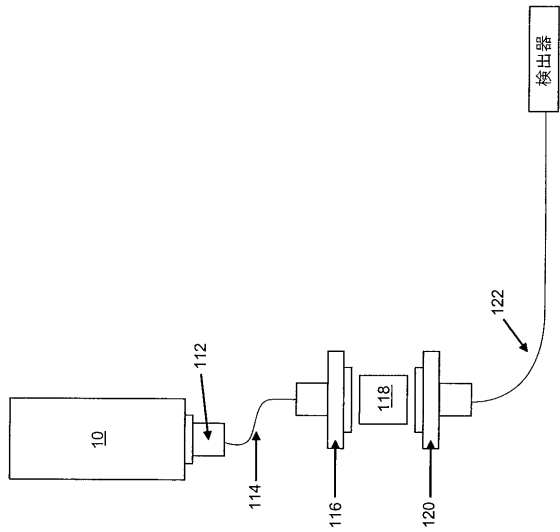


Fig. 10

【 図 1 1 】

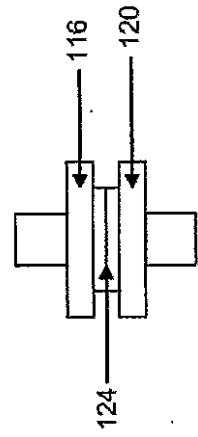


Fig. 11

【 図 1 2 】

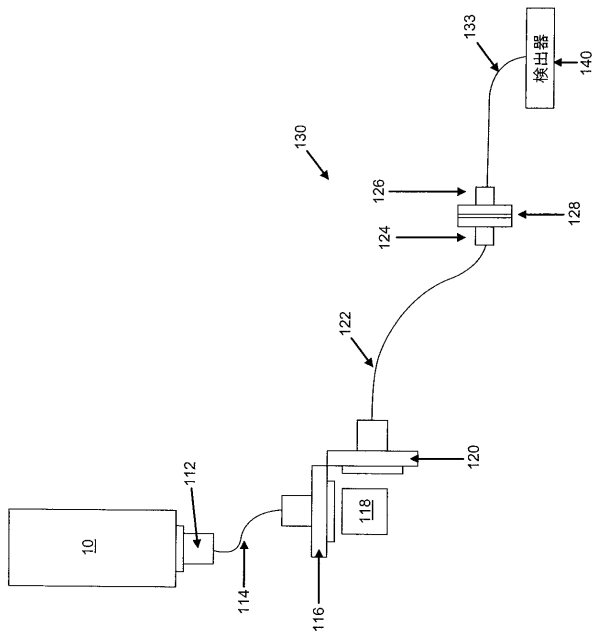


Fig. 12

【 図 1 3 】

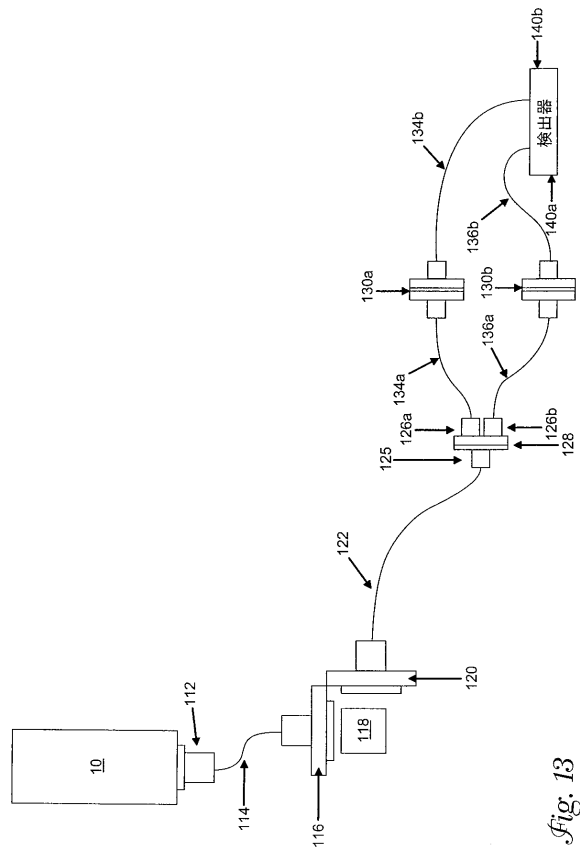


Fig. 13

【 図 1 4 】

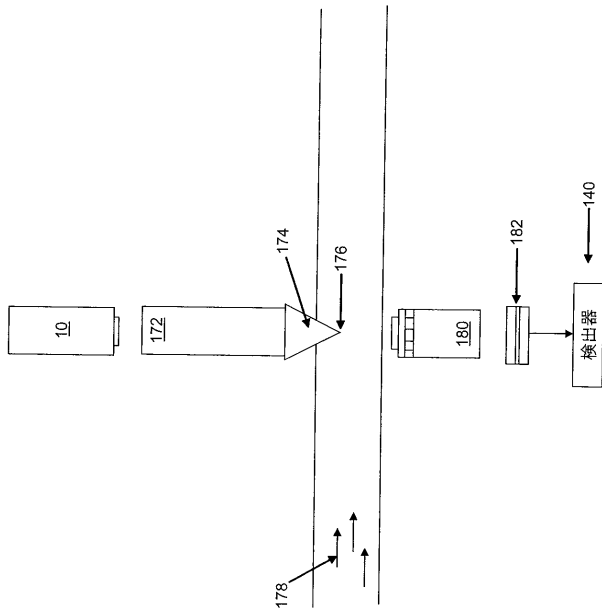


Fig. 14

【 図 1 5 】

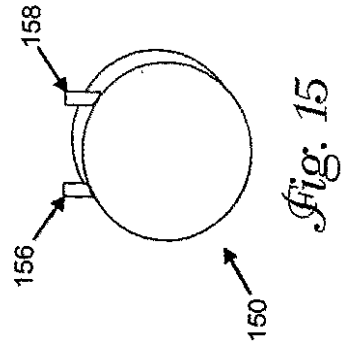


Fig. 15

【 図 1 6 】

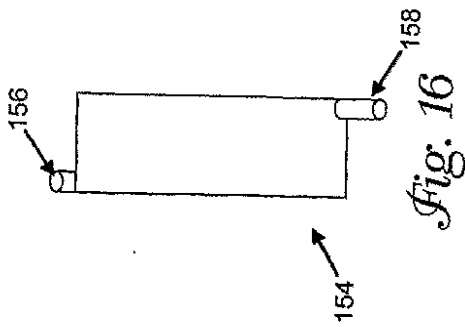


Fig. 16

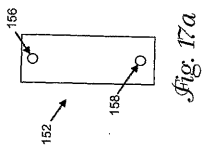


Fig. 17a

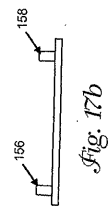


Fig. 17b

【 図 1 8 】

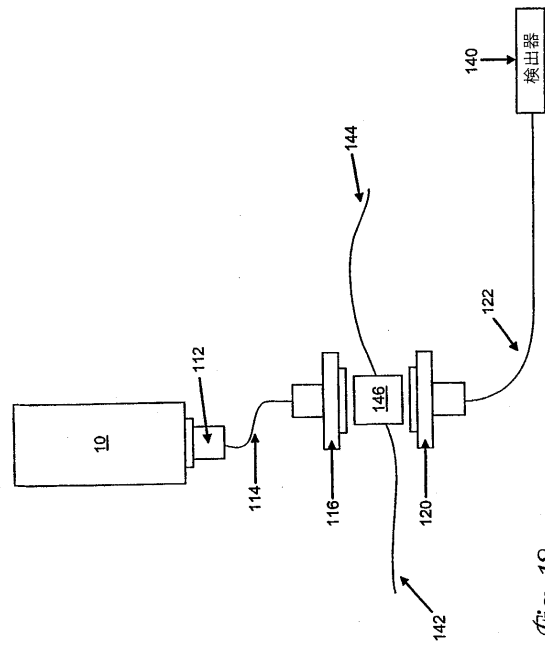


Fig. 18

【 図 19 】

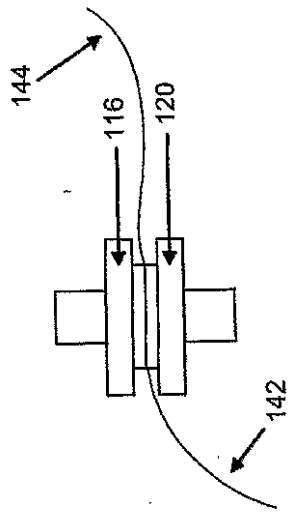


Fig. 19

【 国際調査報告 】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 03/24369

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 7 601N21/64 601J3/44		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 7 601N 601J		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used) WPI Data, PAJ, EPO-Internal		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	EP 0 697 590 A (BASF AG) 21 February 1996 (1996-02-21)	1,63
Y	the whole document	2-62, 64-66
Y	DE 100 35 190 A (MAX PLANCK GESELLSCHAFT) 7 February 2002 (2002-02-07) * paragraphs '0026!'-'0028!'; figure 1 *	2-62, 64-66
Y	US 6 200 818 B1 (EIGEN MANFRED ET AL) 13 March 2001 (2001-03-13) * column 8, lines 39-53; column 10, lines 10-26; figures 6 and 11 *	2-62, 64-66
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report	
9 December 2003	18/12/2003	
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016	Authorized officer Hoogen, R	

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/US 03/24369

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>FOLDES-PAPP Z ET AL: "Detection of single molecules: solution-phase single-molecule fluorescence correlation spectroscopy as an ultrasensitive, rapid and reliable system for immunological investigation" JOURNAL OF IMMUNOLOGICAL METHODS, ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V., AMSTERDAM, NL, vol. 260, no. 1-2, 1 February 2002 (2002-02-01), pages 117-124, XP004332566 ISSN: 0022-1759 * section 2.3; figure 2 *</p> <p>-----</p>	<p>2-62, 64-66</p>

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No.

PCT/US 03/24369

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
EP 0697590	A	21-02-1996	DE 4429239 A1 22-02-1996 EP 0697590 A1 21-02-1996 JP 8068694 A 12-03-1996
DE 10035190	A	07-02-2002	DE 10035190 A1 07-02-2002 AU 8969001 A 05-02-2002 WO 0208732 A1 31-01-2002 EP 1303750 A1 23-04-2003
US 6200818	B1	13-03-2001	DE 19757740 A1 08-07-1999 AT 208037 T 15-11-2001 DE 59802005 D1 06-12-2001 DK 1042664 T3 11-03-2002 WO 9934195 A1 08-07-1999 EP 1042664 A1 11-10-2000

フロントページの続き

(81)指定国 AP(GH,GM,KE,LS,MW,MZ,SD,SL,SZ,TZ,UG,ZM,ZW),EA(AM,AZ,BY,KG,KZ,MD,RU,TJ,TM),EP(AT, BE,BG,CH,CY,CZ,DE,DK,EE,ES,FI,FR,GB,GR,HU,IE,IT,LU,MC,NL,PT,RO,SE,SI,SK,TR),OA(BF,BJ,CF,CG,CI,CM,GA, GN,GQ,GW,ML,MR,NE,SN,TD,TG),AE,AG,AL,AM,AT,AU,AZ,BA,BB,BG,BR,BY,BZ,CA,CH,CN,CO,CR,CU,CZ,DE,DK,DM,DZ, EC,EE,ES,FI,GB,GD,GE,GH,GM,HR,HU,ID,IL,IN,IS,JP,KE,KG,KP,KR,KZ,LC,LK,LR,LS,LT,LU,LV,MA,MD,MG,MK,MN,M W,MX,MZ,NO,NZ,OM,PH,PL,PT,RO,RU,SD,SE,SG,SK,SL,TJ,TM,TN,TR,TT,TZ,UA,UG,UZ,VN,YU,ZA,ZM,ZW

(74)代理人 100108383

弁理士 下道 晶久

(74)代理人 100082898

弁理士 西山 雅也

(72)発明者 ブルスコ,ディラン エー.

アメリカ合衆国,マサチューセッツ 01541,プリンストン,イースト プリンストン ロード 220

(72)発明者 ウルフ,デビッド イー.

アメリカ合衆国,マサチューセッツ 01776,サドベリー,コンコード ロード 285

Fターム(参考) 2G043 BA16 CA03 DA05 EA01 FA02 FA03 HA01 HA02 HA05 HA09

HA11 HA15 JA02 KA02 KA05 KA08 KA09 LA02 NA01