

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特許公報(B2)

(11) 特許番号

特許第6581707号
(P6581707)

(45) 発行日 令和1年9月25日(2019.9.25)

(24) 登録日 令和1年9月6日(2019.9.6)

(51) Int. Cl.	F I	
GO 1 N 21/64 (2006.01)	GO 1 N	21/64 Z
GO 2 B 5/26 (2006.01)	GO 2 B	5/26
GO 2 B 5/28 (2006.01)	GO 2 B	5/28
C 1 2 M 1/00 (2006.01)	C 1 2 M	1/00 A
C 1 2 Q 1/6869 (2018.01)	C 1 2 Q	1/6869 Z
請求項の数 21 (全 12 頁) 最終頁に続く		

(21) 出願番号	特願2018-181228 (P2018-181228)	(73) 特許権者	501387839
(22) 出願日	平成30年9月27日 (2018.9.27)		株式会社日立ハイテクノロジーズ
(62) 分割の表示	特願2014-150334 (P2014-150334) の分割		東京都港区西新橋一丁目24番14号
原出願日	平成26年7月24日 (2014.7.24)	(74) 代理人	100091720
(65) 公開番号	特開2019-12082 (P2019-12082A)		弁理士 岩崎 重美
(43) 公開日	平成31年1月24日 (2019.1.24)	(72) 発明者	石塚 隼司
審査請求日	平成30年9月27日 (2018.9.27)		東京都港区西新橋一丁目24番14号 株 式会社 日立ハイテクノロジーズ内
		(72) 発明者	加藤 宏一
			東京都港区西新橋一丁目24番14号 株 式会社 日立ハイテクノロジーズ内
		(72) 発明者	庄司 智広
			東京都港区西新橋一丁目24番14号 株 式会社 日立ハイテクノロジーズ内
最終頁に続く			

(54) 【発明の名称】 核酸分析装置、および核酸分析方法

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】

試薬や試料を送液する送液機構と、送液される流路を有する基板と、前記基板を設置するステージと、塩基伸長反応を行う温調機構と、蛍光を検出し、蛍光画像を観察する検出部を備える核酸分析装置において、

前記検出部は、光源と、所定の波長域を通過させる複数の光学フィルタと、対物レンズと、励起光を反射させ、蛍光を通過させる第1のダイクロイックミラーと、蛍光色素から発した蛍光を色素毎に異なる割合で分離する第2のダイクロイックミラーと、分離後にそれぞれの蛍光を検出する少なくとも2つの2次元センサとを備え、

前記基板は、前記各2次元センサにて画像上に検出されるマークを有し、前記各2次元センサにて取得した画像の画像位置合わせを、画像上に検出される基板のマークを用いて行い、前記マークを基準として視野内の領域を複数に分割し、分割した領域毎に前記第1および前記第2のダイクロイックミラーの分光特性の分離比率変化の計算値を用いて蛍光色素解析を行うことを特徴とする核酸分析装置。

【請求項2】

請求項1において、

前記視野内の分割した領域毎に前記第1および前記第2のダイクロイックミラーの分光特性の分離比率変化の計算値は、各ダイクロイックミラーの設計値から算出した各色素の分離比率と、各輝点から得られた各色素の分離比率を比較することにより得られることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 3】

請求項 1 において、

前記第 1 のダイクロイックミラーと、前記第 2 のダイクロイックミラーは、光軸に対して同じ方向へ傾けて配置されていることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 4】

請求項 1 において、

上記複数の光学フィルタは、少なくとも短波長域にバンドを持つ第 1 のフィルタと長波長域にバンドを持つ第 2 のフィルタを備え、

さらに、これらのフィルタを切り替える切替機構を備える核酸分析装置。

【請求項 5】

請求項 4 において、

上記第 1 のフィルタは、500nm 付近にピークを持つフィルタであり、少なくとも 2 種類の短波長域の蛍光色素を同時に励起可能なバンドを持つことを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 6】

請求項 5 において、

上記第 1 のフィルタは、480nm ~ 520nm にバンドをもち、蛍光色素 FAM と Cy 3 を同時に励起可能であることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 7】

請求項 4 において、

上記第 2 のフィルタは、600nm 付近にピークを持つフィルタであり、少なくとも 2 種類の長波長域の蛍光色素を同時に励起可能なバンドを持つことを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 8】

請求項 7 において、

上記第 2 のフィルタは、580nm ~ 620nm にバンドをもち、蛍光色素 Texas Red と Cy5 を同時に励起可能であることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 9】

請求項 1 において、

上記第 2 のダイクロイックミラーにおいて、蛍光色素ごとに特定の比率で反射光および透過光に分離して上記各 2 次元センサで検出することを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 10】

請求項 9 において、

上記第 2 のダイクロイックミラーにおいて、550nm 付近および 630nm 付近に緩やかなエッジをもち、エッジ付近に蛍光ピークを持つ任意の蛍光色素に対して反射光および透過光に分離する核酸分析装置。

【請求項 11】

請求項 10 において、

上記第 2 のダイクロイックミラーは、FAM、Cy3、Texas Red、Cy5 の 4 種類の蛍光色素をそれぞれ固有の割合で分離可能であることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 12】

請求項 4 において、

光学フィルタの切替を実施することにより、4 種類の異なる蛍光色素を検出する核酸分析装置。

【請求項 13】

請求項 1 において、

上記 2 次元センサを用いて、同一の視野を同露光時間にて撮影する核酸分析装置。

【請求項 14】

請求項 1 に記載の蛍光観察装置において、

前記光源は白色 LED または、Xe ランプであることを特徴とする核酸分析装置。

【請求項 15】

請求項 1 に記載の蛍光観察装置において、

10

20

30

40

50

上記２次元センサによって同時に撮影した輝点の比率を算出することによって蛍光色素の種類を特定することを特徴とする核酸分析装置。

【請求項１６】

請求項１に記載の蛍光観察装置において、

前記温調機構は、ステージに設置され、前記基板を加熱及び冷却を行うことを特徴とする核酸分析装置。

【請求項１７】

試薬や試料を送液する送液機構と、送液される流路を有する基板と、前記基板を設置するステージと、塩基伸長反応を行う温調機構と、蛍光を検出し、蛍光画像を観察する検出部を備える核酸分析装置を用いた核酸分析方法において、

10

前記検出部は、光源と、所定の波長域を通過させる複数の光学フィルタと、対物レンズと、励起光を反射させ、蛍光を通過させる第１のダイクロイックミラーと、蛍光色素から発した蛍光を色素毎に異なる割合で分離する第２のダイクロイックミラーと、分離後にそれぞれの蛍光を検出する少なくとも２つの２次元センサとを備えた核酸分析装置を用いた核酸分析方法であって、

前記基板は、前記各２次元センサにて画像上に検出されるマークを有し、前記各２次元センサにて取得した画像の画像位置合わせを、画像上に検出される基板のマークを用いて行い、前記マークを基準として視野内の領域を複数に分割し、分割した領域毎に前記第１および前記第２のダイクロイックミラーの分光特性の分離比率変化の計算値を用いて蛍光色素解析を行い、得られた蛍光色から核酸配列を決定することを特徴とする核酸分析方法。

20

【請求項１８】

請求項１７において、

前記視野内の分割した領域毎に前記第１および前記第２のダイクロイックミラーの分光特性の分離比率変化の計算値は、各ダイクロイックミラーの設計値から算出した各色素の分離比率と、各輝点から得られた各色素の分離比率を比較することにより得られることを特徴とする核酸分析方法。

【請求項１９】

請求項１７に記載の核酸分析方法であって、

上記複数の光学フィルタは、短波長域にバンドを持つ第１のフィルタと長波長域にバンドを持つ第２のフィルタを備え、

30

これらのフィルタを切り替えることを特徴とする核酸分析方法。

【請求項２０】

請求項１７に記載の核酸分析方法であって、

核酸の塩基伸長反応に使用される反応液は、蛍光標識された塩基と塩基伸長のためのポリメラーゼを含み、核酸の塩基伸長反応は１塩基伸長後、塩基の蛍光標識を切断する工程を含むことを特徴とする核酸分析方法。

【請求項２１】

請求項２０に記載の核酸分析方法であって、

核酸の１塩基伸長反応後、伸長した前記塩基の蛍光色画像を取得し、前記塩基の蛍光標識を切断する工程を含むことを特徴とする核酸分析方法。

40

【発明の詳細な説明】

【技術分野】

【０００１】

本発明は、複数の光学フィルタを用いて蛍光観察による核酸分析を行う装置および核酸分析方法に関する。

【背景技術】

【０００２】

次世代シーケンサの計測は、多数の微小反応場が固定されたフローセルを用いて行われる。フローセル上に固定された微小反応場にて化学反応を行い、蛍光観察を行うことに

50

より、目的とするDNAの塩基配列の解析が可能になる。フローセルは多数の微小反応場を固定したスライドガラス程度の大きさの消耗品であり、反応試薬の置換を行えるように注入口や排出口をもつ流路が構造をとっている。フローセルに必要な酵素や蛍光標識されたヌクレオチドなどの試薬を流し入れることにより、塩基伸長反応が行われる。これらの反応は必要に応じて適切な温度に制御する必要がある。フローセルは温調を行うことが可能なヒートブロックに密着して配置されているため、フローセルのもう片側に対物レンズを配置する。対物レンズを介してフローセルに固定された反応場に励起光を照射し、蛍光を検出する。この蛍光をCCDカメラやCMOSカメラなどの2次元センサで捉えることにより、蛍光画像として塩基情報を入手することができる。

【0003】

フローセルの反応場の領域は一般に、対物レンズにて測定できる視野よりも大きい。対物レンズは固定されており、固定された対物レンズの光軸に対してフローセルの位置を駆動させることでフローセルの測定領域全域で蛍光画像の撮影を行う。例えばフローセルの反応領域が35mm×4mmである場合は、フローセル140mm²の領域を蛍光画像として取得することが可能である。対物レンズの視野はおよそ1mm²であるため、フローセルをXYステージに固定し、一定距離駆動させることにより、隣接したパネルを逐次蛍光観察していく。

【0004】

次世代シーケンサにおいて重要視される指標のひとつとしてスループットがある。スループットとは単位時間あたりに解析できる総塩基数であり、これを増加させるために技術開発が進んでいる。スループットを向上させるためには大きく二つの方針がある。ひとつは、フローセルに固定する反応場の大きさを縮小し、密に配置することで一度の撮影あたりに取得可能な塩基情報を増加させることである。従来では、ランダム配置によって反応場の固定を行っている。今日では、反応場の小型化とパターン配置することによって、より密に充填することが可能になっている。もう一方として、蛍光観察を行う時間の短縮がある。次世代シーケンサでは、各塩基に対応した4種類の蛍光色素が用いられている。それぞれの色素に対応した励起光の照射、蛍光の分離が必要である。従来では、各色素に対応した4種類のフィルタセットを用いて検出を行うことが一般的である。この方式では、4種類の励起光と励起光と蛍光を分離するためのダイクロイックミラー、蛍光用のフィルタと少なくとも12種類の光学素子を用いることと、各フィルタセットを切り替えるための機構が必要である。蛍光観察の時間に関して、例えば、1色の撮影時間を200ms、測定するパネル数を140パネルとすると、およそ蛍光撮影だけで2分の時間を要する。スループットの向上には、これらの読み取り時間をより短縮することが必要である。特許文献1では、複数枚のダイクロイックミラーにて蛍光を分離し、2台の2次元センサによって撮影することによって、一度の撮影にて2色の色素を同時に読み取ることができる。この方式を用いることでフィルタセットの切替を行う機構を単純化するとともに、蛍光撮影に要する時間をおよそ半分まで短縮することができる。しかし、複数枚のダイクロイックミラーの分光特性の変化が大きな問題になる。ダイクロイックミラーに対する入射光の角度が変化することで分光特性が変化するため、測定視野内の一部の領域について目的とする分光特性を得ることができなくなる可能性がある。

【先行技術文献】

【特許文献】

【0005】

【特許文献1】US2012/027305

【発明の概要】

【発明が解決しようとする課題】

【0006】

蛍光の分離および色素の特定の精度はダイクロイックミラーの光学特性に依存する。ダイクロイックミラーへの入射角度が変化することに伴い、光学特性には変化が生じる。そのため、各ダイクロイックミラーの配置によって測定視野内で分析不可となる領域が生じる。本発明では、視野全域にて複数の蛍光色素を同時に観察し、精度よく色素の特定を行

10

20

30

40

50

い、得られた蛍光色から核酸配列を決定することができる核酸分析装置の構成及び分析方法を提供する。

【課題を解決するための手段】

【0007】

上記課題を解決するために、試薬や試料を送液する送液機構と、送液される流路を有する基板と、前記基板を設置するステージと、塩基伸長反応を行う温調機構と、蛍光を検出し、蛍光画像を観察する検出部を備える核酸分析装置において、

前記検出部は、光源と、所定の波長域を通過させる複数の光学フィルタと、対物レンズと、励起光を反射させ、蛍光を通過させる第1のダイクロイックミラーと、蛍光色素から発した蛍光を色素毎に異なる割合で分離する第2のダイクロイックミラーと、分離後にそれぞれ

10

の蛍光を検出する少なくとも2つの2次元センサとを備え、
前記基板は、前記各2次元センサにて画像上に検出されるマークを有し、
前記各2次元センサにて取得した画像の画像位置合わせを、画像上に検出される基板のマークを用いて行い、前記マークを基準として視野内の領域を複数に分割し、分割した領域毎に前記第1および前記第2のダイクロイックミラーの分光特性の分離比率変化の計算値を用いて蛍光色素解析を行うことを特徴とする核酸分析装置および、分析方法を提供する。

【発明の効果】

【0008】

本発明によれば、ダイクロイックミラーによって分離した蛍光を2台のカメラで撮影し、各カメラで撮出される各点の輝度の比率を元にして色素の特定を行う。色素を特定する際に、測定視野を複数に分割して分割視野毎に解析を行うことで、全視野で精度よく色素の特定を行うことが可能になり、特定された蛍光色の配列が決定され、最終的に塩基配列が決定可能となる。

20

【0009】

複数の蛍光色素を同時に蛍光検出が可能になる。また、測定視野の全域で精度よく色素の特定を行うが可能になるため、装置スループットが向上する。前述した以外の課題、構成及び効果は、以下の実施形態の説明により明らかにされる。

【図面の簡単な説明】

【0010】

【図1】実施例に係わる核酸分析装置の構成例を示す図

【図2】実施例に係わる核酸分析装置の検出部の構成例を示す図

【図3】対物レンズを介した光線に関する図

【図4】実施例に係わるダイクロイックミラーの分光特性変化例を示す図

【図5】実施例に係わる蛍光波長と分光例を示す図

【図6】実施例に係わる蛍光色素の分光例を示す図

【図7】実施例に係わる視野絞りの例を示す図

【図8】実施例に係わるフローセルマークの例を示す図

【発明を実施するための形態】

【0011】

以下、図面に基づいて、本発明の実施の形態を説明する。なお、本発明の実施の態様は、後述する実施例に限定されるものではなく、その技術思想の範囲において、種々の変形が可能である。

40

【実施例1】

【0012】

図1を用いて核酸分析装置100の概要を説明する。核酸分析装置は複数の試薬が保持される試薬容器101を収容する試薬冷却保管庫102と、試薬容器101に保持される試薬を送液する反応試薬送液機構103とDNA断片が結合した流路を有するフローセル104と、フローセル内でDNA断片と試薬の反応を促進させる温調機構105と、DNA断片に取り込まれた蛍光を検出する検出部106とから構成される。事前に調整されたフローセル104は送液機構103によ

50

って各反応液が送液される。必要に応じて温調機構105によって加熱及び冷却することにより、フローセル内で伸長反応をし、蛍光を発する。検出部106において、蛍光検出を行い、塩基配列の決定を行う。反応後余分なサンプルや試薬は、廃液タンク109に収容される。

【0013】

本発明の核酸分析装置を用いて様々な核酸分析を実施することができる。例えば、DNA配列決定やハイブリダイゼーションを行うことが可能である。特に本発明に関わる核酸分析装置100を用いてDNA配列決定を行うことが可能である。各反応試薬をフローセル内に送液することにより、フローセルに固定されたDNA断片に蛍光色素を含む塩基を結合させる。反応液には、蛍光標識された4種類の塩基及びポリメラーゼが含まれている。各塩基はそれぞれ FAM, Cy3, Texas Red, Cy5で蛍光標識されている。反応液には、伸長反応が効率的に行なわれるように塩濃度、マグネシウム濃度およびpHが最適化されている。反応溶液中にはポリメラーゼが含まれており、DNA断片に相補的な蛍光ヌクレオチドが1塩基だけ取り込まれる。2塩基目の伸長が発生しないのは、1塩基目の蛍光色素に2塩基目の色素の伸長を阻害する物質が結合しているからである。1塩基が取り込まれた後、浮遊する蛍光ヌクレオチドを洗浄により除去する。

10

【0014】

検出部106にて蛍光色素に励起光を照射し、蛍光観察を行う。その後、蛍光部分を切断し、さらに伸長反応を行い、蛍光観察を再度実行する。これらを繰り返すことにより、4色の蛍光色の配列が決定され、最終的に塩基配列が決定される。この方法により、1サイクルで数十～数百bpの解析を行うことができ、1ランで数十Gbpのデータを解析することが可能である。

20

【0015】

本発明の核酸分析装置100は、2枚のダイクロイックミラーにより蛍光を分離し、2台の二次元カメラを用いて検出を行う。

【0016】

検出部106は、図2に示すように、励起光照射部201と励起蛍光用ダイクロイックミラー202と対物レンズ203と蛍光フィルタ204と色分離用ダイクロイックミラー205とチューブレレンズ206および207と二次元イメージセンサ208および209とから構成される。励起光照射部201は白色光源220とコリメートレンズ221と複数枚の光学フィルタを収容したフィルタ切替機構222から構成される。白色光源としては、Xeランプや白色LEDなど高輝度の白色光を出射可能な光源を用いる。また、必要に応じて光源を冷却するための冷却機構を備える。コリメートレンズ221は、光源から出射された光を集光し、平行光へと変換する。光源とコリメートレンズの間には、光源の光を均一にするためにライトガイドを挿入する。ライトガイドとしては液体ライトガイドやライトパイプなどを使用することができる。本実施例では白色光源としてマルチアレイLEDを用い、ライトパイプを用いて出射光を均一化している。フィルタ切替機構222は、複数枚の光学フィルタを収納し、それぞれのフィルタに切り替えることで、白色光から励起光として使用する波長域の光を透過させる。本実施例では、短波長域に単一のバンドを持つ光学フィルタと長波長域に単一のバンドを持つ光学フィルタの二種類を収容し、それぞれのフィルタに切り替える機構を備える。フィルタの切り替えの機構としては、例えばモータ、ソレノイドなどを用いることが可能である。

30

40

【0017】

励起光照射部200では、白色光源から出射された光がコリメートレンズにより並行光に変換され、その後フィルタ切替機構222に備え付けられている光学フィルタを透過することで、励起光として使用する波長域の平行光を出射する。励起光照射部から出射された光は、励起蛍光用ダイクロイックミラー202へと入射する。励起蛍光用ダイクロイックミラーは、光軸に対して45度の角度で設置される。2つの波長域でバンドを持ち、入射した励起光を反射、蛍光を透過させる。励起蛍光用ダイクロイックミラーにより反射した励起光は対物レンズ203に入射する。対物レンズ203はZ軸方向に駆動するZステージ210に取り付けられている。Zステージの駆動によりフローセル104の測定面にピント合わせを実施する

50

。フローセル104内の蛍光色素より発せられた蛍光は再度対物レンズを通過し、励起蛍光用ダイクロイックミラー202を透過する。透過した蛍光は、蛍光フィルタ204によって特定のバンドのみ透過する。その後、蛍光は色分離用ダイクロイックミラー205へと入射する。色分離用ダイクロイックミラー205は4つの色素から蛍光波長に対して、緩やかな光学特性をもつ。そのため、蛍光色素から発した蛍光は、色素ごとに異なる割合で色分離用ダイクロイックミラー205を透過または反射する。透過光および反射光は、それぞれチューブレンズ206および207により集光され、2次元カメラ208および209に結像する。2次元カメラ208および209の直前にフィールドフラットナ211および212を配置することにより、光学性能を向上させることが可能である。色分離用ダイクロイックミラー205の光学特性により、測定視野の輝点から発せられた蛍光は、異なる輝度で検出される。各2次元カメラで撮影された蛍光画像の輝点の蛍光強度比を求めることにより、4色のうちいずれの蛍光色素であるか特定が可能になる。

10

【0018】

本実施例では、図2に示すように励起蛍光用ダイクロイックミラー及び色分離用ダイクロイックミラーの配置は光軸に対して同一の方向をもって配置される。

【0019】

対物レンズ203を通過した蛍光は、完全な並行光ではなく、対物レンズにて測定可能な視野の位置に依存してある角度もっている。例えば、FN26、倍率20倍の対物レンズの測定可能な視野は1.3mmの領域であるが、図3に示すように、視野中心部の光線301を基準とすると、視野端では最大で4.2度の角度がついた光線302および303となる。ダイクロイックミラーの光学特性は入射角度に依存して特性に変化が生じる。図4に一例を示す。45度で入射した場合の特性401と比較して49度で入射する光303は短波長側透過域が変化した特性402に、41度で入射する光302は長波長側透過域が変化した特性403に変化する。2枚のダイクロイックミラーを互い違いに配置すると、例えば、励起蛍光用ダイクロイックミラーに49度で入射した光線は、色分離用ダイクロイックミラーに対して41度で入射する。各ダイクロイックミラーに生じる特性変化はそれぞれ短波長・長波長を反対の波長方向に変化するため、測定視野の一部についてすべての蛍光が透過または反射してしまう。そのため、色分離用ダイクロイックミラー205にて異なる比率で蛍光を分離することができなくなり、色素の特定ができなくなる。1視野の撮影で解析可能な領域が減少する。

20

【0020】

本実施例では、4色の蛍光ヌクレオチドとしてFAM, Cy3, Texas Red, Cy5を用いる。500nm付近にピークを持つ光学フィルタを用いることにより、FAM, Cy3の二つを同時に励起、蛍光観察を行う。また、600nm付近にピークをもつ光学フィルタを用いることにより、Texas Red, Cy5の二つを同時に励起、蛍光観察を実施する。一例としてFAMとCy3の場合の各ダイクロイックミラーの分光特性と蛍光の特性について図5に示す。励起蛍光分離ダイクロイックミラーを透過したFAMの蛍光は、色分離用ダイクロイックミラーによって透過光603と反射光604に分離され、検出される。その後、色分離用ダイクロイックミラーを透過した蛍光は、図6.に示すように各蛍光色素に対して、緩やかな特性を持つダイクロイックミラーにて透過光と反射光に分離される。色分離用各色素における透過と反射の比率は、FAMで50:50, Cy3で30:70, TxRで70:30, Cy5で5:95というようになっている。分離の比率は任意であるが、色素間で同じ比率を取らないようにすることで、より精度よく色素の特定が可能である。

30

40

【実施例2】**【0021】**

励起光照射部のコリメートレンズの前に視野絞りを入れることが可能である。一度の撮影で計測する視野304は四角形であるため、そのまま励起光を照射すると、図7に示す対物レンズの最大視野701の領域を照射する。視野絞りの挿入することで、測定視野の領域702のみを照射することが可能になる。測定視野以外への照射は測定対象としている蛍光色素の退色を生じさせるため、測定視野以外への照射は極力なくすることが重要である。視野絞りの挿入によって、測定視野外の蛍光色素の退色を抑えることが可能である。しぼり外周

50

部への励起光をしっかりと遮断するために、励起光照射部のコリメートレンズとしては、クリティカル照明または、ケーラ照明を用いる。

【実施例3】

【0022】

本装置では、二つのカメラによって検出した蛍光の比率を算出することで色素の特定を行う。検出の方法は次の通りである。まず、2つのカメラによって取得した蛍光画像から同じ輝点の抽出を行う。次に、抽出した各点の輝度情報からそれぞれの比率を算出する。その後、算出した輝度の比率を元にして蛍光色素の特定を行う。フローセルには、図7に示すように、各測定視野内に位置検出用のマーク801をもっている、図7には十字のマーク等を記載しているがこの形状及び個数は任意の数をとることができる。このマークは、各パネルに必ず測定されるようにパターン化されている。カメラにて検出される画像上で、マークの領域は蛍光がないダークの領域として検出される。パターン認識などを用いてマークの位置の検出が可能である。本実施例では、マーク位置座標を元にして、各カメラにて取得した蛍光画像から同一輝点の抽出を行う。各輝点について、透過側または反射側で検出された光の強度比を算出する。輝点抽出の方法及び各点の輝度の算出の方法は、様々であるが、ガウシアンフィッティングを行うことによって輝点の中心座標、輝度を算出することが可能である。

10

【0023】

各色素での分離比率は、フィルタ及びダイクロイックミラーの特性に依存して変化するため、ダイクロイックミラーの設計値から算出した各色素の分離比率と各輝点から得られた比率を比較することにより輝点の色素を特定することができる。

20

【0024】

ダイクロイックミラーに入射する光の角度によってダイクロイックミラーの分光特性は変化する。図3に示す光線301～303のように視野の位置に依存して入射角度が異なる。視野全域を同じ比率で分離すると、視野端に位置する輝点の解析精度が悪くなる。そこで、視野をいくつかの領域に分けてそれぞれの領域にて異なる比率で分離することで視野全域を精度よく分離を行うことが可能である。視野の分割には、例えば視野内のマークを基準として16分割し、分割した領域毎にダイクロイックミラーの分光特性の変化を考慮した計算値を用いることにより、精度よく色素の特定を行うことが可能である。

【符号の説明】

30

【0025】

- 100 核酸分析装置
- 101 試薬容器
- 102 試薬保管庫
- 103 送液機構
- 104 フローセル
- 105 温調機構
- 106 検出部
- 107 XYステージ
- 108 送液用シリンジ
- 109 廃液部
- 201 励起光照射部
- 202 励起蛍光用ダイクロイックミラー
- 203 対物レンズ
- 204 蛍光フィルタ
- 205 色分離用ダイクロイックミラー
- 206、207 チューブレンズ
- 208、209 2次元カメラ
- 210 Zステージ
- 212、213 フィールドフラットナ

40

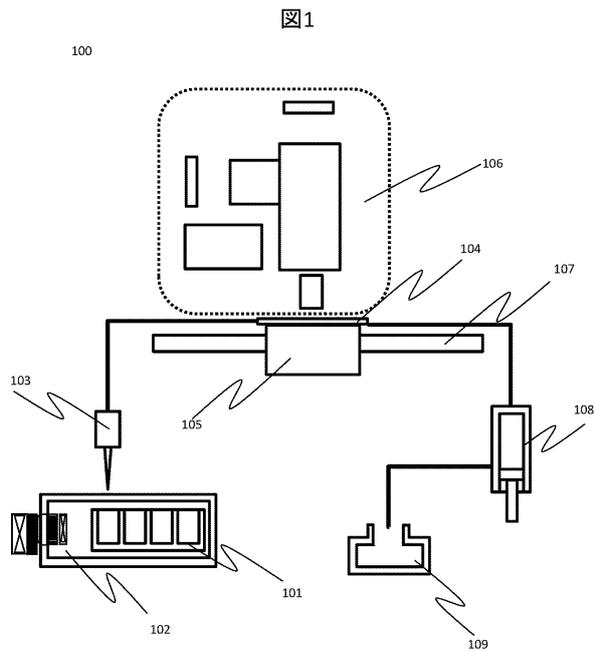
50

- 2 2 0 光源
- 2 2 1 コリメートレンズ
- 2 2 2 フィルタ切替機構
- 3 0 1 視野中心部からの光線
- 3 0 2、3 0 3 視野端からの光線
- 3 0 4 計測視野
- 4 0 1 45度入射に対する分光特性
- 4 0 2 49度入射に対する分光特性
- 4 0 3 41度入射に対する分光特性
- 5 0 1 励起蛍光用ダイクロイックミラーの分光特性
- 5 0 2 色分離用ダイクロイックミラーの分光特性
- 5 0 3 FAMの蛍光特性
- 5 0 4 Cy3の蛍光特性
- 6 0 1 FAMの蛍光分離を示す図
- 6 0 2 Cy3の蛍光分離を示す図
- 6 0 3 FAMの蛍光で透過側に結像する波長域
- 6 0 4 FAMの蛍光で反射側に結像する波長域
- 6 0 5 Cy3の蛍光で透過側に結像する波長域
- 6 0 6 Cy3の蛍光で反射側に結像する波長域
- 7 0 1 対物レンズで撮影可能な最大視野
- 7 0 2 視野絞り挿入時の照射領域
- 8 0 1 測定視野内マーク

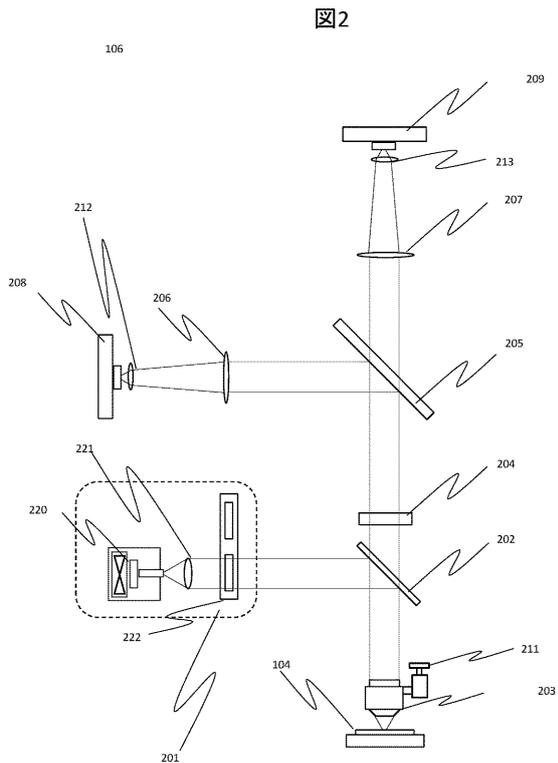
10

20

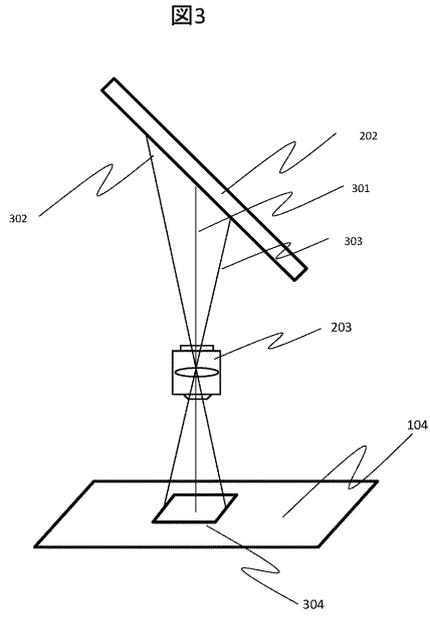
【図1】



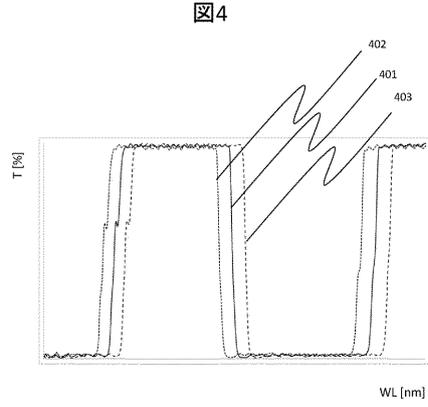
【図2】



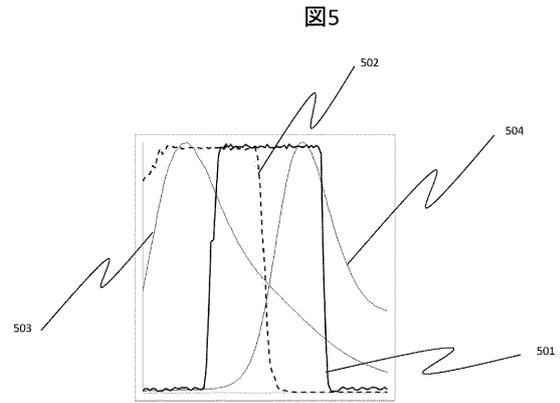
【 図 3 】



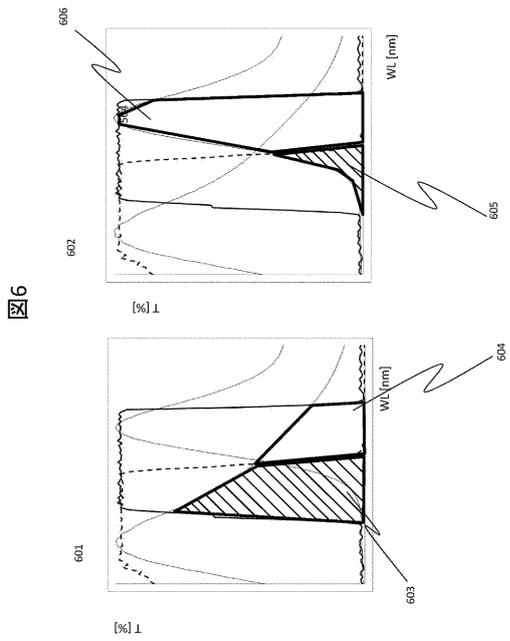
【 図 4 】



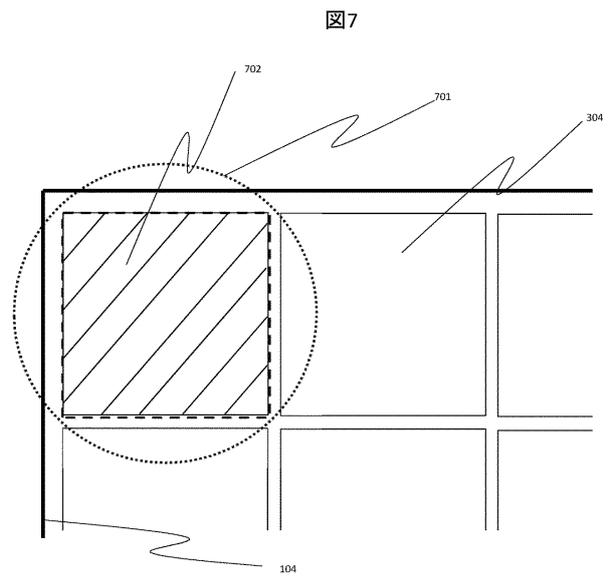
【 図 5 】



【 図 6 】

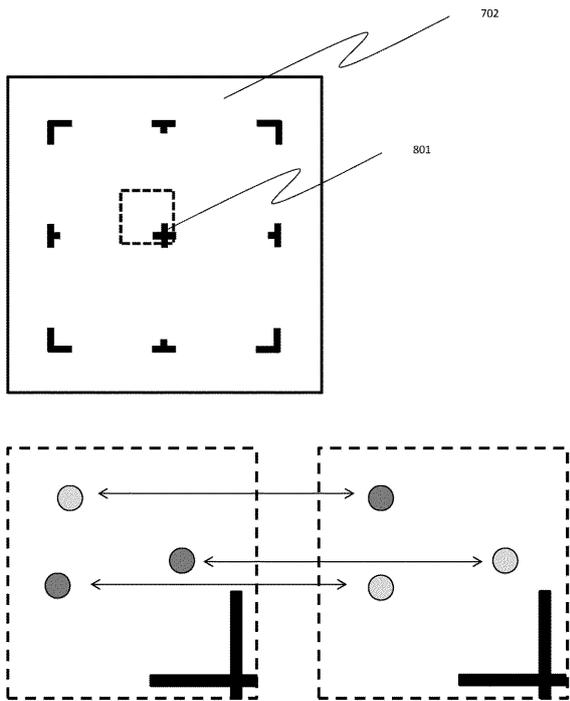


【 図 7 】



【 図 8 】

図8



フロントページの続き

(51)Int.Cl. F I
G 0 2 B 5/20 (2006.01) G 0 2 B 5/20

審査官 横尾 雅一

(56)参考文献 特開2011-27706(JP,A)
特開2012-245014(JP,A)
米国特許出願公開第2003/0174324(US,A1)
特開2007-60354(JP,A)
米国特許出願公開第2004/0195497(US,A1)
特開平4-301994(JP,A)
特開2007-225381(JP,A)
米国特許第5631734(US,A)

(58)調査した分野(Int.Cl., DB名)

G 0 1 N 2 1 / 6 2 - 2 1 / 7 4
C 1 2 M 1 / 0 0 - 3 / 1 0
C 1 2 Q 1 / 0 0 - 3 / 0 0
G 0 2 B 5 / 2 0 - 5 / 2 8
G 0 1 N 3 3 / 4 8 - 3 3 / 9 8