

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載
 【部門区分】第6部門第1区分
 【発行日】平成29年4月6日(2017.4.6)

【公開番号】特開2014-160068(P2014-160068A)
 【公開日】平成26年9月4日(2014.9.4)
 【年通号数】公開・登録公報2014-047
 【出願番号】特願2014-23470(P2014-23470)
 【国際特許分類】

G 0 1 N 1/28 (2006.01)
 H 0 1 J 37/20 (2006.01)
 H 0 1 J 37/28 (2006.01)
 H 0 1 J 37/317 (2006.01)

【F I】

G 0 1 N 1/28 L
 G 0 1 N 1/28 J
 G 0 1 N 1/28 K
 G 0 1 N 1/28 G
 H 0 1 J 37/20 E
 H 0 1 J 37/20 F
 H 0 1 J 37/28 B
 H 0 1 J 37/28 Z
 H 0 1 J 37/317 D

【手続補正書】

【提出日】平成29年3月2日(2017.3.2)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0005

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0005】

細胞内におけるGFPのX-Y-Z位置を正確に(例えば10nmの正確さで)決定することができる場合には、P o Iの位置も同様の正確さで分かることが明らかである。蛍光を発しているGFPは光学顕微鏡によって観察することができ、そのため、試料中の観察可能な構造体に対するP o Iの位置を知ることができる。次いで、電子顕微鏡では蛍光を見ることはできないが、電子顕微鏡を使用して、光学顕微鏡で可能な拡大倍率よりもはるかに高い拡大倍率でその構造体の画像を形成することができる。GFP、染料、量子ドットなどのさまざまな蛍光マーカから非常に正確な位置情報を獲得する先行技術のいくつかの技法が提案されており、いくつかのケースでは、この情報が獲得されることが示されている。本出願の譲受人に譲渡された、参照によって本明細書に組み込まれるBuijsse他の「Method of Localizing Fluorescent Markers」という名称の米国特許第7,317,515号明細書の中で提案されている1つの技法では、荷電粒子ビームが試料の表面を走査し、この荷電粒子ビームは、蛍光マーカに当たったときにマーカを傷つけ、蛍光を消す。このとき、蛍光マーカの位置は、蛍光が消えたときの荷電粒子ビームの位置に対応するであろう。荷電粒子ビームは、マーカを照明するレーザよりもはるかに小さな点に集束することができ、荷電粒子ビームの走査中の任意の時点における荷電粒子ビームの位置は非常に正確に決定されるため、蛍光マーカの位置、したがってP o Iの位置も同様の正確さで決定されるであろう。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0042

【補正方法】変更

【補正の内容】

【0042】

本発明のいくつかの実施形態によれば、標本を分析するシステムは、真空チャンバと、真空チャンバ内の試料の表面上に集束電子ビームを走査する電子ビーム・カラムと、試料の画像を形成するために、電子ビームの衝突に反応して試料から放出された2次電子を検出する電子検出器と、試料中のマーカの蛍光発光を引き起こす波長の光で真空チャンバ内の試料を照明し、試料中の蛍光マーカからの蛍光を検出する光学系と、試料の表面に蒸気を局所的に供給するための蒸気の供給源であって、この蒸気が、真空内における蛍光マーカの活性を増大させ、同時に真空チャンバ内のより低いバックグラウンド圧力を維持する蒸気の供給源とを備える。

【手続補正3】

【補正対象書類名】特許請求の範囲

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】

試料を処理する方法であって、

a. 前記試料を真空チャンバ内に置くステップと、

b. 前記真空チャンバを排気するステップと、

c. 前記試料の新たな表面を露出させるステップと、

d. 前記新たな表面に蒸気を局所的に供給することにより、前記新たな表面の蛍光マーカを照明し、前記真空チャンバ内のバックグラウンド真空圧力を維持するステップであり、前記バックグラウンド真空圧力が前記新たな表面の局所蒸気圧よりも低いステップと、

e. 前記新たな表面の前記蛍光マーカの光学画像を取得するステップと、

f. ステップcからeを繰り返すステップと

を含む方法。

【請求項2】

露出させたそれぞれの新たな表面の電子ビーム画像を形成するステップをさらに含む、請求項1に記載の方法。

【請求項3】

前記試料の新たな表面を露出させるステップが、

前記試料に向かって集束イオン・ビームを導くこと

前記試料に向かってレーザ・ビームを導くこと

マイクロトームを使用して前記試料を切削すること

のうちの少なくとも1つによって材料を除去するステップを含む、請求項1または2に記載の方法。

【請求項4】

前記新たな表面に蒸気を局所的に供給するステップが、ナノ毛細管を使用して液体を供給するステップを含む、請求項1から3のいずれか一項に記載の方法。

【請求項5】

前記光学画像を取得するステップの前に、前記ナノ毛細管を前記新たな表面に接触させて前記ナノ毛細管から液体の流れを生じさせるステップと、

前記電子ビーム画像を形成するステップの前に、前記ナノ毛細管と前記新たな表面の間の接触を解くステップと

をさらに含む、請求項4に記載の方法。

【請求項6】

前記電子ビーム画像を合成して前記試料の3次元表現を形成するステップをさらに含む、請求項2から5のいずれか一項に記載の方法。

【請求項7】

前記新たな表面に蒸気を局所的に供給するステップが、ガス注入システムによって蒸気を供給するステップを含む、請求項1から6のいずれか一項に記載の方法。

【請求項8】

約 -20°C よりも低い温度まで前記試料を冷却するステップをさらに含む、請求項1から7のいずれか一項に記載の方法。

【請求項9】

約 60°C よりも高い温度まで前記試料を加熱するステップをさらに含む、請求項1から8のいずれか一項に記載の方法。

【請求項10】

前記新たな表面の前記局所蒸気圧が 1×10^{-2} ミリバールよりも高く、前記真空チャンバ内の前記バックグラウンド真空圧力が 5×10^{-3} ミリバールよりも低い、請求項1から9のいずれか一項に記載の方法。

【請求項11】

真空チャンバ内で顕微鏡法によって試料を調べる方法であって、

蛍光マーカを有する試料を前記真空チャンバ内に置くステップと、

1×10^{-2} mbarよりも低い圧力まで前記真空チャンバを排気するステップと、

前記蛍光マーカの蛍光発光を

蒸気を前記蛍光マーカに供給することによって前記真空チャンバ内の前記バックグラウンド圧力よりも高い値まで前記蛍光マーカのところの蒸気圧を局所的に増大させることであって、前記蒸気圧を局所的に増大させることが排気された前記真空チャンバにおける前記蛍光マーカの活性を増大させることと、

照明の放射が前記蛍光マーカを励起するよう、前記真空チャンバの前記バックグラウンド圧力より前記蒸気圧が高い値である間に前記試料を前記放射によって照明することと

によって引き起こすステップと、

前記蛍光マーカから発せられた光を検出するステップとを含む方法。

【請求項12】

蒸気を前記蛍光マーカに供給することが、ナノ毛細管から液体を分配することを含み、前記液体が蒸発して前記蒸気を供給する、請求項11に記載の方法。

【請求項13】

前記ナノ毛細管から前記液体を分配することが、直径 $20 \mu\text{m}$ 未満のナノ毛細管から液体を分配することを含む、請求項12に記載の方法。

【請求項14】

前記試料の画像を走査電子顕微鏡法を使用して形成するステップをさらに含む、請求項11から13のいずれか一項に記載の方法。

【請求項15】

前記試料から材料を除去することによって前記試料の新たな表面を繰り返し露出させるステップと、

次いで、

蒸気を前記新たな表面に供給することによって、前記新たな表面のところの蒸気圧を、前記真空チャンバの前記バックグラウンド圧力より高い値まで上昇させるステップ、

照明の放射が前記新たな表面の蛍光マーカを励起するよう、前記真空チャンバの前記バックグラウンド圧力より前記蒸気圧が高い値である間に前記試料を前記放射によって照明するステップ、

前記蛍光マーカから発せられ、検出された光を用いて、前記試料を画像化するステップ、および

前記試料の画像を走査電子顕微鏡法を使用して形成するステップを繰り返すステップとをさらに含む、請求項 1 4 に記載の方法。

【請求項 1 6】

露出させた新たな表面の画像を合成して前記試料の 3 次元表現を形成するステップをさらに含む、請求項 1 5 に記載の方法。

【請求項 1 7】

- 20 °C よりも低い温度まで前記試料を冷却するステップをさらに含む、請求項 1 1 から 1 6 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 8】

60 °C よりも高い温度まで前記試料を加熱するステップをさらに含む、請求項 1 1 から 1 7 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 1 9】

前記蛍光マーカへの前記蒸気の供給による前記蛍光マーカのところの局所圧力が 1×10^{-2} ミリバールよりも高く、前記真空チャンバ内の前記バックグラウンド圧力が 5×10^{-3} ミリバールよりも低い、請求項 1 1 から 1 8 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 0】

ナノ毛细管から液体を分配することが、前記蛍光マーカに向かって前記液体を輸送する溝の中に前記液体を供給することを含む、請求項 1 2 から 1 9 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 2 1】

顕微鏡法によって標本を分析するシステムであって、真空チャンバと、前記真空チャンバ内の試料の表面上に集束電子ビームを走査する電子ビーム・カラムと、前記試料の画像を形成するために、前記集束電子ビームの衝突に反応して前記試料から放出された 2 次電子を検出する電子検出器と、前記試料中の蛍光マーカの蛍光発光を引き起こす波長の光で前記真空チャンバ内の前記試料を照明し、そこから発して検出された蛍光を用いて前記試料を画像化する光学系と、蒸気を、前記試料の前記表面に、前記蛍光マーカの活性を増大させるに十分で、前記真空チャンバ内のより低いバックグラウンド圧力を維持する圧力で、局所的に供給するための蒸気の供給源とを備えるシステム。

【請求項 2 2】

前記蒸気の前記供給源が、蒸発する液体を分配するナノ毛细管である、請求項 2 1 に記載のシステム。

【請求項 2 3】

前記蒸気の前記供給源がガス注入システムである、請求項 2 1 に記載のシステム。

【請求項 2 4】

前記試料を処理する集束イオン・ビーム・カラムをさらに備える、請求項 2 1 から 2 3 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 5】

前記試料を処理するレーザをさらに備える、請求項 2 1 から 2 4 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 6】

前記試料を処理するマイクロトームをさらに備える、請求項 2 1 から 2 5 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 2 7】

60 °C よりも高い温度まで前記試料を加熱することができる加熱器をさらに備える、請求項 2 1 から 2 6 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 28】

- 20 °C よりも低い温度まで前記試料を冷却することができる冷却器をさらに備える、請求項 21 から 27 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 29】

前記真空チャンパ内の運転圧力が 1×10^{-4} ミリバールよりも低い、請求項 21 から 28 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 30】

局所的に供給された前記蒸気による局所圧力が 1×10^{-2} ミリバールよりも高く、前記真空チャンパ内の前記バックグラウンド圧力が 5×10^{-3} ミリバールよりも低い、請求項 21 から 29 のいずれか一項に記載のシステム。

【請求項 31】

前記光学系は、前記蛍光マーカに蛍光を発生させる照明放射に前記試料の面を露出させた後、前記面の光学画像を記録するように構成され、

前記電子ビームカラムは、前記光学画像が記録された後、前記面の電子ビーム画像を取得するように構成され、

前記光学画像および前記電子ビーム画像の一部を同様のスケールに変換し、前記光学画像および前記電子ビーム画像の特徴部分を合成画像上で見ることができるよう、前記光学画像と前記電子ビーム画像の位置を合わせるように構成されている、

請求項 21 に記載のシステム。

【請求項 32】

前記蛍光マーカの非活性化を防ぎまたは前記蛍光マーカを再活性化させるのに十分に、前記蛍光マーカを含む関心領域の近くの蒸気圧を増大させ、

前記蒸気圧を増大させた後、前記光学系を用いて前記関心領域を光学画像化するように構成されている、

請求項 21 に記載のシステム。