

## 蛍光検出の基礎知識 ~ 蛍光フィルターの選択方法

Keyword : 蛍光フィルター、Long-Pass、Short-Pass、Band-Pass、ダイナミックレンジ、マルチカラーイメージング

はじめに

蛍光検出を行う際には蛍光を励起させるための励起波長と、ノイズを除去する蛍光フィルターの選択が重要になります。蛍光物質はその蛍光特有の励起波長によって励起されます。蛍光物質を効率よく励起させるには蛍光物質の最大励起波長と同じあるいは近接した励起光源波長を使用することが必要になります。また、蛍光の検出には適切な蛍光フィルターを選択する必要があります。バックグラウンドとなる散乱光や励起光を蛍光フィルターで除去することで、より鮮明な画像を得ることができるからです。ここでは、蛍光物質にあった蛍光フィルターの種類と選択方法について説明します。後半ではマルチカラーイメージングのフィルター選択方法について紹介します。

### 蛍光フィルターの種類

蛍光スキャナーやCCDカメラで使用されている蛍光フィルターは、ガラス表面を膜状にラミネートコーティングしたものです。表面コーティングされたフィルターはある一定の光を選択的に反射・透過することができます。蛍光フィルターには大きく分けて3つのタイプがあります。

Long-Pass (LP) フィルターは規定波長よりも短波長側の光をカットし、長波長側の光を透過させます。反射と透過の波形の傾きが急であればあるほど良質なLong-Passフィルターであるといえます(図1a)。Long-Passフィルターはカットオフポイント(フィルターを通したときに50%の効率で透過する光の波長)

にもとづいて名付けられています。たとえば、560LPというフィルターは、カットオフポイントが560 nmのLong-Passフィルターを意味します。

Short-Pass (SP) フィルターは規定波長よりも長波長側の光をカットし、短波長側の光を透過させます。Long-Passフィルターと同様にShort-Passフィルターもカットオフポイントによって名付けられています。たとえば、526SPというフィルターは、カットオフポイントが526 nmにあるShort-Passフィルターを示します(図1b)。

Band-Pass (BP) フィルターは一定の波長域の光のみ透過し、それ以外の短波長側および長波長側の光をカットします。Band-Passフィルターの名前は2種類の意味を持ちます。

透過光波長域の中心波長

FWHM(full-width at half-maximum transmission) :  
50%以上の光を透過する波長域の全長を示します。

たとえば、670BP30フィルターは透過光波長域の中心が670 nmであり、中心波長より $\pm 15$  nmの波長域の光(655 nm ~ 685 nm)を50%以上の効率で透過することを示します(図2)。20 nmから30 nmのFWHMを持つBand-Passフィルターはマルチカラーの画像取込みを含めた蛍光のアプリケーションに適しています。30 nm以上のFWHM値を持つフィルターは、より広い波長域から集光できるため、より多くの蛍光シグナルを検出できます。しかし、このようなフィルターは狭い波長間の蛍光の区別が困難なため、蛍光スペクトルが重複している場合は通常使用できません。極めて近接した蛍光スペクトルを持つ蛍

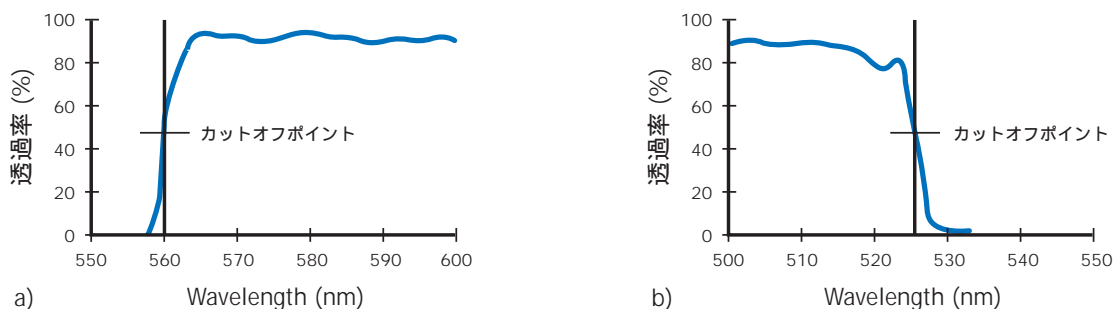


図1. 560 nmのLong-Passフィルター(a)と526 nmのShort-Pass フィルター(b)の波長特性。

光物質を使用する場合には、ある程度は透過光量を犠牲にしても30 nmより小さなFWHM値を持つフィルターが効果的です。

感度とダイナミックレンジにおける蛍光フィルターの役割  
フィルターは蛍光検出における感度（検出限界）とダイナミックレンジ（シグナルの最小値から最大値までで直線性が得られる範囲）に影響を与えます。バックグラウンドが高い場合、検出感度が低くなりまたダイナミックレンジも狭くなるため、鮮明な蛍光像を得ることが困難になります。たとえばゲルやメンブレンは広波長域にわたってバックグラウンドが検出されます。そこで、Band-Passフィルターを用いて目的の蛍光波長の前後の光を除去すればバックグラウンドを低くできるため鮮明な蛍光画像が得られます。また、サンプルの蛍光シグナルの減少を目的としてフィルターを使用する場合があります。サンプルの蛍光強度が強すぎる場合は、検出システムのダイナミックレンジを超えてしまうため蛍光スキャナーの場合、通常はPMT（Photo Multi Tube：光電子倍增管）の電圧を下げます。しかしそのシステムの最適条件範囲よりも低くPMTの電圧を設定した場合、PMT自体のダイナミックレンジが直線性を失ってしまい正確な検出ができなくなります。それ以上の蛍光シグナルの減少が必要な場合にはBand-Passフィルターを用いて検出する蛍光波長領域を制限することで蛍光シグナルを減少させることが可能になります。

## 蛍光色素とフィルターの選択ガイドライン

### シングルカラー イメージング

システムに搭載されている励起光源の波長が蛍光物質の最大励起波長に近接しているほど効率よく蛍光物質を励起することが

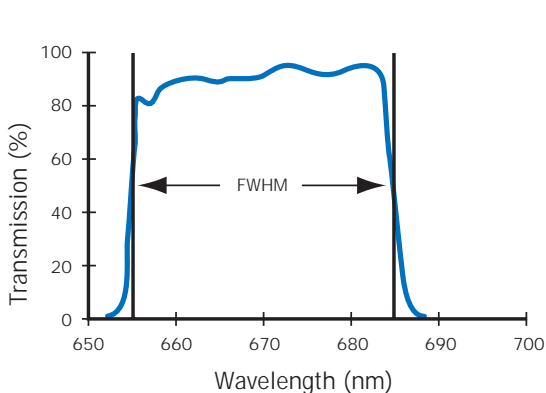


図2. 670BP30フィルターの透過波長  
FWHMが30 nmであることを示しています。

できます。しかし実際には蛍光物質の励起波長は広域に分布しており、蛍光物質によっては第二励起波長と呼ばれるピークを持つものもあります（1）。したがって励起光源の波長と蛍光物質の最大励起波長を必ずしも一致させる必要はありません。たとえばFluoresceinとCy3という蛍光物質の最大励起波長はそれぞれ495 nmと552 nmです（図3）。これらの蛍光物質に対して532 nmの波長で励起を行うと、Fluoresceinの最大励起波長からは40 nm、Cy3の最大励起波長からは20 nm離れている波長の光エネルギーを与えることになり非効率的であるように思われます。しかし励起光を強くすることで、両方の蛍光物質を励起することができます。一般的にはBand-Passかまたはその他の蛍光物質に至適な蛍光フィルターを用いることで、その感度やダイナミックレンジを改善することができます。図4はCy3の蛍光シグナルを580BP30または560 nmの蛍光フィルターを用いた場合の集光状態を示しています。

### マルチカラーイメージング

マルチカラーイメージングとは、異なる蛍光波長をもつ数種の蛍光物質で多重標識あるいは染色されたサンプルの検出を行うことです。マルチカラーを用いると、時間、コストおよび精度を改善できます。1色素標識の場合、1種類の実験系で同じ作業を複数回繰り返す必要がでできます。たとえば、2種類の異なる組織から得られたサンプルの遺伝子発現解析を1色素のみでそれぞれのサンプルを標識してメンブレン上でハイブリダイゼーションを行う場合、一度サンプルをハイブリダイズしてデータを取った後にリプロービングを行い、異なるサンプルを再度ハイブリダイズするか、あるいは2枚の同じメンブレンを準備してそれぞれの別々にサンプルをハイブリダイズして解析を行う必要があります。しかし2色の異なる蛍光物質を用いてそれぞれのサンプルを標識した場合、同じメンブレンにハイブリダ

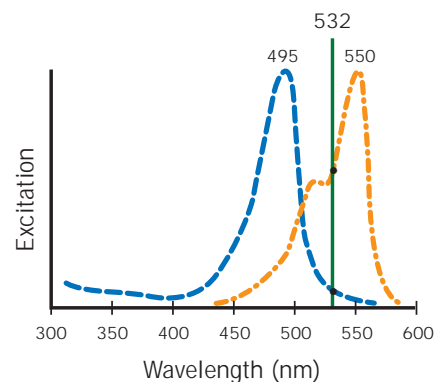


図3. 532 nmレーザーを用いたFluoresceinとCy3の励起波長  
Cy3の励起波長（---○---）とFluoresceinの励起波長（---●---）及びYAGレーザー（緑）を示しています。

イズして同時に解析を行うことが可能です。こうして2種類の異なるサンプルについて、1枚のメンブレン上、同一条件でハイブリダイズするため、実験的なエラーを軽減することができます。

また、マルチカラーイメージングはDNAフラグメント解析や二次元電気泳動のマルチカラー解析であるEttan DIGEなど、さまざまなアプリケーションで多重標識の利点を生かすことができます。

### マルチカラーイメージングにおける蛍光物質の選択

複数の蛍光物質を用いた実験系をたてる際には、使用できる蛍光物質の励起波長と蛍光フィルターを考慮する必要があります。使用する検出システムの励起光源が蛍光物質の励起波長内に入っているかどうかを確認します。さらにそれぞれの蛍光物質の蛍光波長が分離可能かどうかを確認します。ほとんどの蛍光物質の場合、蛍光波長はある程度重複（クロストーク）します。クロストークを最小限に抑えるためには各蛍光物質の蛍光波長に最適な蛍光フィルターを選択することが重要です。図5では重複した2種類の蛍光シグナルをBand-Passフィルターを用いて分離している一例を示しています。良い結果を得るためには、使用する蛍光物質のそれぞれの最大蛍光波長が最低でも30 nm以上離れているものを選択する必要があります。複数の蛍光物質を用いた実験系では蛍光フィルターの選択の幅が広いほどアプリケーションの幅が広がります。また、蛍光物質の蛍光波長に合わせた狭い領域のみ透過するBand-Passフィルターは、マルチカラーイメージングに必要不可欠です。

### ソフトウェア

多重標識サンプルのイメージ検出において、各蛍光物質のイメージから他の蛍光シグナルのクロストークと考えられるシグナルを修正し、より定量的なイメージを得るためにソフトウェアを利用した解析は不可欠です。

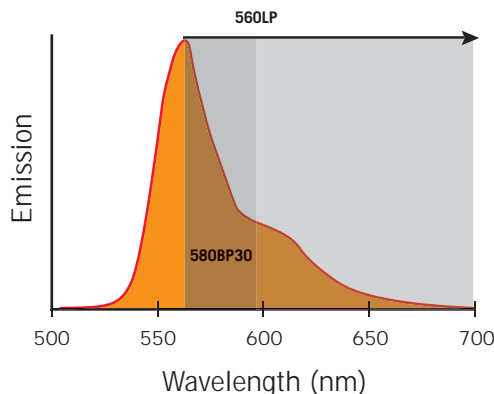


図4. Cy3の励起波長(オレンジ)及び580BP30(濃いグレー)と560LP(薄いグレー)の蛍光フィルター波長

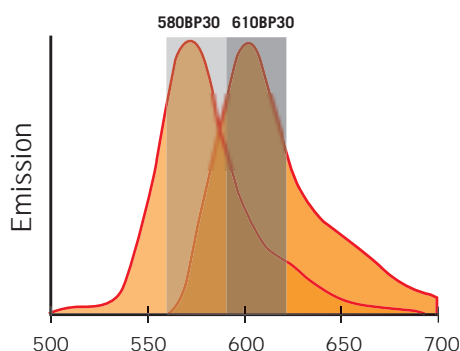


図5. TAMRA (オレンジ)とROX (赤)の蛍光波長  
TAMRA の検出には580BP30 (濃いグレー)フィルターを用い、ROXの検出には610BP30 (薄いグレー)のフィルターを用いています。

### 参考文献

- 1 蛍光アプリケーション 蛍光検出の基礎知識 ,  
GE Healthcare, code number 71-2111-91, 2003

GEヘルスケア バイオサイエンス株式会社

本社 〒169-0073  
東京都新宿区百人町3-25-1 サンケンビルディング

お問合せ：バイオダイレクトライン

TEL : 03-5331-9336 FAX : 03-5331-9370  
e-mail : Tech-JP@ge.com



ISO 9001:2000認証取得

Home Page <http://www.gehealthcare.co.jp/lifesciences>

掲載されている製品の名称、仕様、価格などは、予告なく変更される場合がありますのであらかじめご了承ください。