

蛍光検出基礎知識 ~ 蛍光シグナルの数値化

Keyword : 光電子増倍管、CCD、階調数、バックグラウンド、数値化、飽和ピクセル

はじめに

今回は、蛍光検出基礎知識 ~ でご紹介した方法を基に実際の解析方法についてご紹介いたします。蛍光の検出には光電子増倍管 (Photomultiplier tube : PMT) または CCD (Charge-coupled device) が使用されます。どちらも蛍光物質から放出された光子エネルギーを電子エネルギーに変換・増幅し、測定可能なデジタルデータを作成します。このデータがソフトウェアによって検出可能な画像データに変換されます。本報では、ポリアクリルアミド電気泳動ゲルの蛍光検出を例に、電気泳動ゲルやプロットの解析における画像データの数値化、階調補正、バックグラウンド補正などの方法についてご紹介いたします。

画像のデジタル化

シグナル強度の数値化は各機器の読み取り階調数 (通常、bit 数が2の累乗) に基づきます。8 bit、12 bit、16 bit のデジタルファイルはシグナル強度を数値に置き換えるとそれぞれ 2^8 (= 256)、 2^{12} (= 4,096)、 2^{16} (= 65,536) 階調に相当します。階調数を大きくするほど、数値的に近接したシグナルの違いを区別することが可能になります (1)。なお、蛍光シグナル強度は任意の単位で表示されます (例 rfu: relative fluorescence units) (2)。

画像表示

画像解析ソフトウェアの基本的機能のひとつは画像を表示して階調調整を行い、得られたイメージの査定を行うことです。弊社のスキャナーで取込みを行ったイメージデータファイルは12 bit または16 bit のデジタルファイルとなり、4,096 または65,536 階調のグレースケールで表示することが可能です。一般的なプリンターや人の視覚は約256階調のグレースケールを区別できる程度であるため、解析ソフトウェアによりイメージ中の解析したい領域にあわせて階調を調整できることが重要です。一般に、解析ソフトウェアはオリジナルのイメージデータや定量的数値データに影響を与えることなく、コントラストや明るさの設定を変えて画像を見やすくすることができるように作られています。設定値を調節して画像を見やすくすることは非常に重要で、データが含まれない無駄な階調を表示しないことで、解析の精度を向上させることができます。

また、検出器のシグナル飽和によって取り込んだ画像が定量性を失っていないかどうかを確認することも重要です。シグナル飽和が起きている場合、画像イメージの数値化を正確に行うことができません (図1)。画像が飽和ピクセル値で構成されている場合には、検出器のPMT電圧の設定値を下げるか、その他の条件 (励起レーザーや蛍光フィルターの選択) を調整して再度画像データの取込みを行う必要があります (2)。

画像の校正

実験後、画像データの保存やプリントアウトをする時に、その画像に番号や注釈を付けることがあります。多くの画像解析ソフトウェアでは単純な校正や注釈の付加を行うことができ、画像データの出力も可能です。イメージ中のある一部分を詳細に見たい場合には、画像の倍率変更機能を用います (図2)。また、大きな画像ファイルをいくつかの画像ファイルに分割したり、保存前に全体的なファイルサイズを縮小する機能も備えています。

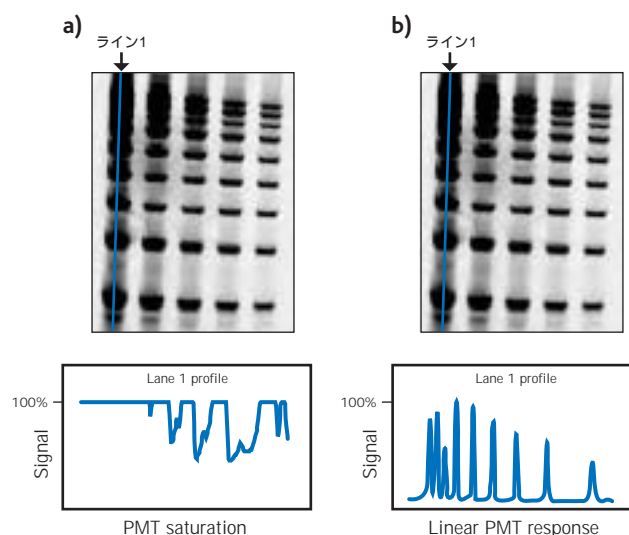


図1. 検出器の飽和によるデータへの影響

Cy5標識したサイズマーカーを10%ポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動し、Typhoon8600で検出しました。PMT電圧をそれぞれ (a) 1,000 V、(b) 500 V に設定してスキャンしました。それぞれのイメージのライン1は集光された蛍光シグナルに対するPMTの飽和状態を示しています。(a) で示した状態では検出器の飽和により正しく数値化できていないことがわかります。

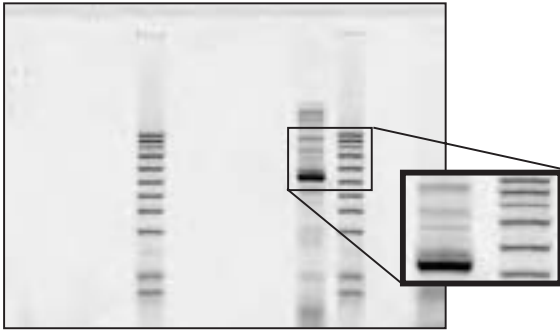


図2. 画像の詳細を見るための倍率変更機能

最近では、画像の回転や、ノイズとして検出されたゴミやほこり由来の蛍光を除去するフィルタリング機能を含むユーティリティソフトウェアもあります。また、画像の切り取りを行うツールを用いて画像ファイルの一部をクリップボードにコピーし、Microsoft Wordのような文書作成ファイルに貼り付けるなどデジタルデータならではの利点もあります。

数値化

電気泳動ゲル解析ではすべてのレーンあるいは個々のレーンに含まれるバンドごとのシグナル強度の積算値を算出します。弊社のソフトウェアでは、後述の3種類の数値化の方法が採用されています(表1)。

- レーンの断面化とそのカーブのエリアのシグナルの積算
- マニュアル操作によるサンプル領域設定とシグナルの積算
- ソフトウェアによる半オートサンプル検出とシグナルの積算

レーンの断面化による数値化の方法()では、各レーンに引いた垂直のラインを中心に各バンドに合わせて一定の幅を設定し、シグナルの1ピクセルあたりの平均値を基に計算を行います(表1)。この手法では、目的のシグナルすべてを含むように幅を設定するため正確性が向上します。ラインをグラフ化した後、各ピークを検出し、そのピークまたはカーブを積分し、エリアレポートとして結果を表示します(図3a)。

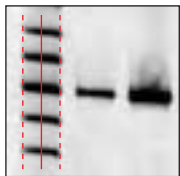
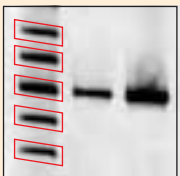
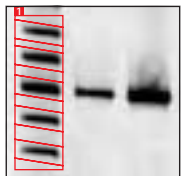
画像の一部(線で囲んだ範囲=オブジェクト)の数値化()やレーンの数値化の方法()では、解析を行う目的物(バンド、スポット、スロット等)を四角や丸やフリーハンドで囲みます。マニュアル操作(表1)か自動(表1)でのレーン・バンド認識機能を使用することができます。この方法では、解析に必要な領域を定義することができ、また数値化の前にバックグラウンド補正(次項参照)の方法をいくつか選択することができるため、レーンの断面化を行う方法()より柔軟性があります。オブジェクトで囲まれた領域内のピクセルはすべて数値化に使用されます。

手法ごとに表示される値は異なりますが、相対的な測定値は類似しています(図3a, b, c)。

バックグラウンド補正

ほとんどの画像解析ソフトウェアでは測定時にバックグラウンド補正を行うことを推奨しています。画像のバックグラウンドの性質は使用する蛍光試薬やサンプルマトリックス(ゲル、メンブレン、マイクロタイタープレート等)、サンプル自体の性質等、さまざまな要因により変化します。蛍光検出は非常に高感度なので、画像化時のバックグラウンドは、実験プロトコ

表1. シグナルの数値化における3つの方法

レーンの断面化 - エリア解析 -	オブジェクトの数値化 - ボリューム解析 -	レーンの数値化 - ボリューム解析 -
サンプルに沿ったラインの設定	マニュアル操作によるサンプル領域設定	サンプルに沿ったラインの設定
ピーク検出	個々のサンプルに対するオブジェクト設定	サンプルに対するオブジェクト設定
ラインに沿ったシグナルの積算	オブジェクト内のシグナルの積算	オブジェクト内のシグナルの積算
ライン上のカーブをもとに算出	ボリューム = オブジェクト内のシグナルの積算値	ボリューム = オブジェクト内のシグナルの積算値
利点: 簡単、速い	利点: 柔軟に対応可能、正確	利点: 速い、正確
		

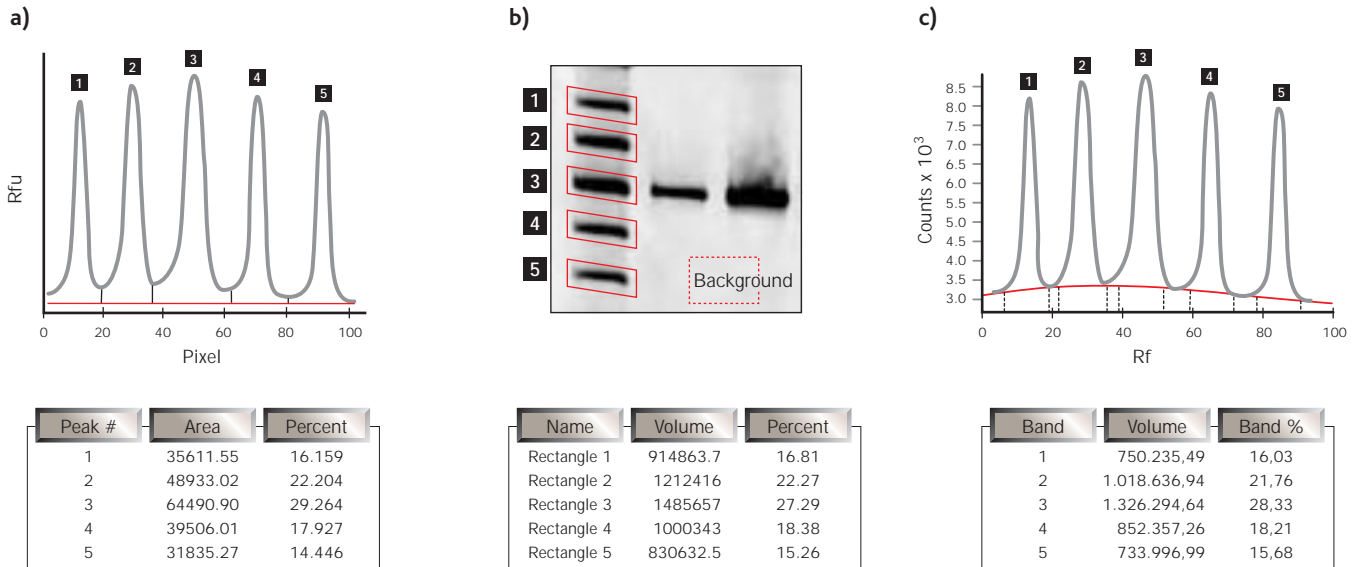


図3. エリア解析とボリューム解析の結果比較

- a) エリア解析。各レーンのピークを認識させ、ライン上の最小値をバックグラウンドとして差し引いて計算値を算出しました。
- b) ボリューム解析。マニュアル操作で囲った枠内のシグナルの積算値から、ある範囲を囲った領域のシグナルの平均値と各枠のピクセル数を掛け、その値をバックグラウンドとして各枠の総量から差し引いて計算値を算出しました。
- c) ボリューム解析。自動で囲った枠内のシグナルの積算値から、バックグラウンドとして各枠のライン上のピクセルのシグナルの最小値をとり、バックグラウンドとして差し引いて計算値を算出しました。

ルの確立における初期段階で考慮すべき問題です。蛍光検出を行う際には、サンプルや器具に汚れが付かないように細心の注意を払い、バックグラウンドを最小限に抑えるようにします。バックグラウンドノイズの性質は画像解析を行う前に確認することができます（図4）。バックグラウンドは通常下記のように分類することができます：

- 画像全体に均一なバックグラウンド
- 画像の一部に不均一なバックグラウンド
- スパイクノイズあるいはあるピクセルに限り高いシグナル強度を持ったバックグラウンド
- レーン毎に異なるバックグラウンド

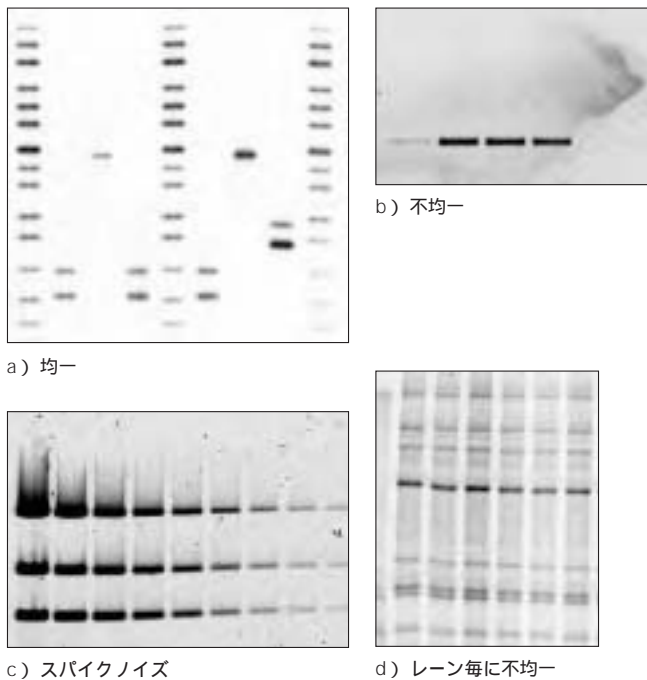


図4. バックグラウンドの分類

バックグラウンド補正の方法はサンプル領域ごとに計算する場合と画像全体で計算する場合があります。サンプル領域ごとに計算する場合、個々のバンドやスポット、スロットに対してその付近の数値をもとにバックグラウンドを計算します。この方法では、レーンの断面化を行いグラフ化した場合、グラフの谷どうしを結んでバックグラウンドを決定し、差し引きを行います。また、サンプル領域を個々に囲んだ場合は枠線をもとに各バックグラウンドを決定し差し引きます（図5a）。

画像全体で計算する場合、バックグラウンドのシグナル値は1つの画像に対してすべて等しく計算します。レーンの断面化を行いグラフ化した場合はある一定の数値で直線的にバックグラウンドを決定し計算します。また、サンプル領域を個々に囲んだ場合はある一定のエリアをバックグラウンドエリアとして設定し、1ピクセル当りの平均値をバックグラウンド値として決定し計算します（図5b）。

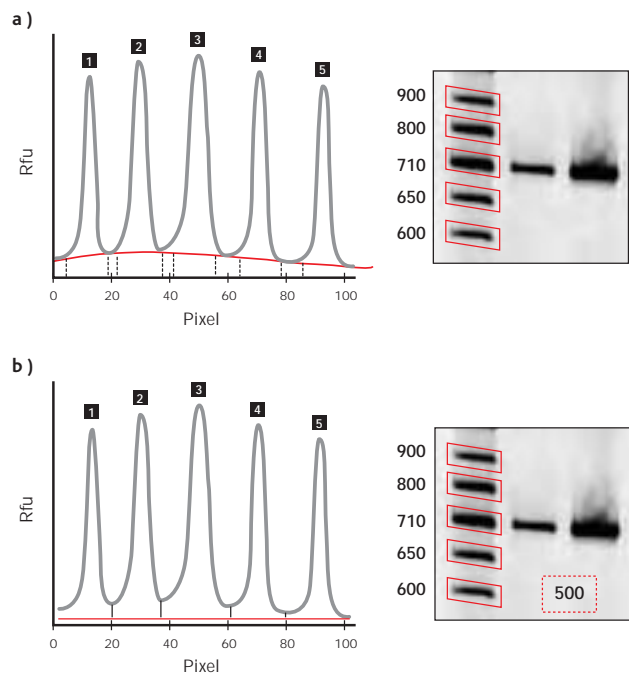


図5. バックグラウンド設定方法の比較

サンプル領域ごとに計算する場合と画像全体で計算する場合

- a) サンプル領域ごとにバックグラウンドを計算する場合
b) 画像全体でバックグラウンドを計算する場合

バックグラウンド補正の選択基準

バックグラウンドの性質を考慮し、最適な補正方法を選択します。例えば、あるイメージ中でバックグラウンドノイズの強度が全体で均一でない場合は、サンプル領域ごとに計算する方法を用います。この場合、それぞれの箇所に応じて異なるバックグラウンド値を用いて計算を行う方法が適しており、より定量的な値を得られる可能性が高くなります。逆にイメージ全体のバックグラウンドが均一な場合は、画像全体で計算する方法が適しています。バックグラウンド値を正確に算出するためには最適な方法を選択することが非常に重要です。また、バックグラウンドの値の平均値をとるか中央値をとるかでも定量結果に大きな影響がでます。例えば、スパイクノイズ(図4c)がオブジェクト内でバックグラウンドの一因になっている場合、平均値でバックグラウンドを算出すると値が実際よりも高くなってしまいます。この場合は、中央値を用いて計算を行った方がより定量性の高いデータを得ることができます。バックグラウンドとして設定するエリアは正確な定量を行ううえで非常に重要です。同様に、サンプル領域の囲み(バンドを定義するために使用しているライン、スポット、四角等)は定量結果に影響を与えます。

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 71-2156-91, 2003
2. 蛍光アプリケーション 蛍光検出の基礎知識
GE Healthcare. Code number 71-2116-91, 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 サンケンビルヂング

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。