

蛍光検出用語集1（蛍光検出基礎知識 ～ より）

milestoneでは、これまで蛍光画像解析基礎講座と題して蛍光画像解析に関する基本的な知識・考え方をご紹介してまいりました。今回は、これまでの基礎講座の中から蛍光画像解析のポイントとなる用語をまとめてご紹介します。

用語一覧

励起光 (excitation light)	1
蛍光 (emitted light ; 放射光)	1
最大励起波長	1
(maximum excitation)	
ストークシフト (Stokes shift)	1
蛍光強度 (輝度 ; brightness)	2
吸光係数 (extinction coefficient ;)	2
量子収率 (quantum yield ;)	2
環境効果 (environmental effects)	2
フォトブリーチング	2
(photobleaching ; 蛍光退色)	
光電子増倍管	3
(Photo multiplier tube : PMT)	3
蛍光フィルター (Optical filter)	3
ロングパスフィルター (Long Pass filter) ...	3
ショートパスフィルター (Short Pass filter) ..	3
Band Passフィルター	3
FWHM	4
(full-width at half-maximum transmission)	
マルチカラーイメージング	4
(multi-color imaging)	
クロストーク (cross-talk)	4

励起光 (excitation light)

蛍光色素を励起させる光を励起光といいます。励起光の波長分布は励起スペクトルによって表されます。このスペクトルは、ある蛍光物質にさまざまな波長の励起光を照射したときに放出される一定波長の蛍光の強度をプロットして作成します。励起スペクトルは吸収スペクトルと同一または極めて近似しているため、蛍光色素メーカーなどが公表している吸収スペクトル値 (図1a) をそのまま利用できます。

蛍光 (emitted light ; 放射光)

蛍光とは励起光によるエネルギーを受けた蛍光物質が放出する光のことで、その波長分布は蛍光スペクトルとよばれます。蛍

光スペクトルは蛍光の波長に対し相対的な蛍光強度をプロットして作成されます。(実際の蛍光スペクトル測定では、波長と強度が一定に維持された励起光を光源として用います。)

最大励起波長 (maximum excitation)

励起スペクトルの中でもっとも強い蛍光の放出が得られる波長 (ピーク波長) が蛍光色素の最大励起波長になります。

ストークシフト (Stokes shift)

励起スペクトルと蛍光スペクトルのピーク波長間の差はストークシフト (Stokes shift) と呼ばれています。この波長差は、蛍光放出以前の励起状態の際に放出されたエネルギーが熱エネルギーに変換されたために生じます (図2)。

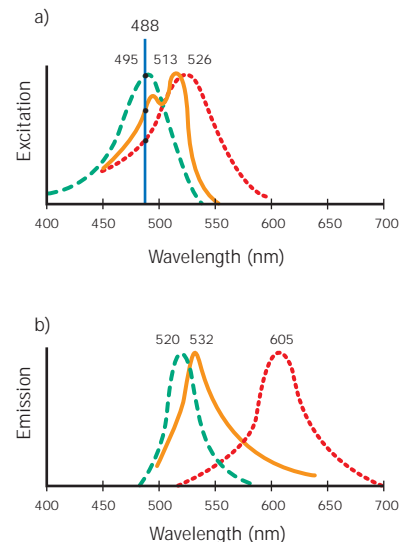


図1. 吸収スペクトル (a) と蛍光スペクトル (b)

フルオレセイン (---), DNA結合TOTO (—), DNA結合 エチジウムプロマイド (····) を示します。各スペクトルのピークは同一になるよう標準化されています。それぞれのピークには最大吸収あるいは最大蛍光を示す波長が記載されています。488 nmレーザーのスペクトルが3つの吸収スペクトルと重なる位置を示しました。(これらのスペクトルパターンは弊社の収集データや参考文献1,2に基づいて作成しました。)

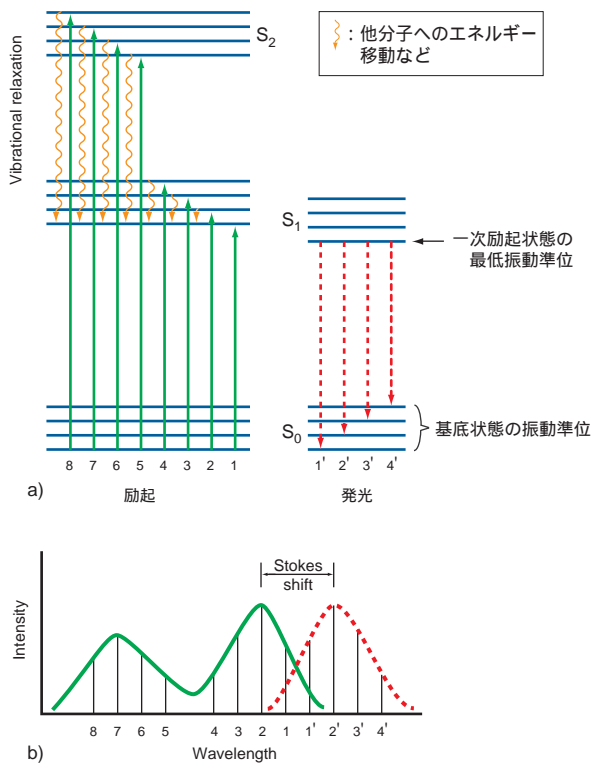


図2. 励起光蛍光を説明するエネルギー準位の模式図 (a) と励起スペクトルと蛍光スペクトルの模式図 (b)

実線 (緑) が励起スペクトル、破線 (赤) 蛍光スペクトル。
参考文献3より抜粋。© W. H. Freeman and Company の許可を得て転載。

蛍光強度 (輝度 ; brightness)

蛍光物質によって、放出される蛍光強度 (輝度) が異なります。蛍光強度はそのまま感度に影響を与えるため蛍光物質にとって非常に重要なポイントです。蛍光強度は蛍光物質の特性である、吸光係数と量子収率に比例します。したがって蛍光強度が同等であっても、吸光係数や量子収率がまったく異なる場合もあります。

また、入射光の強さにも影響を受けます。理論的には入射光量を上げると励起される蛍光物質が増加しますが、入射光量を上げすぎると、蛍光破壊が起こり蛍光強度が減衰あるいは消失します。

蛍光強度は通常、rfu (relative fluorescence units ; 相対蛍光単位) などの任意単位で表示されます

表1. 一般的な蛍光物質の量子収率例 :

一般的な蛍光物質	
フルオレセイン	0.9
Cy5	0.3

吸光係数 (extinction coefficient ;)

蛍光物質の吸光係数とは蛍光物質に吸収される特定波長の光量を意味します。モル吸光係数は光路1 cmあたりの1 M蛍光色素溶液の光学濃度として定義されます。有用な蛍光物質では、このモル吸光係数が10,000以上を示します。

量子収率 (quantum yield ;)

量子収率とは励起光と蛍光の変換効率を示します。量子収率は以下の公式から得ることができます。

$$\frac{\text{放出された光子数}}{\text{吸収された光子数}}$$

量子収率は0(非蛍光性物質) から1(効率100%の蛍光性物質) までの値をとります。通常、量子収率の測定には、吸収スペクトルのピーク波長が用いられます。

環境効果 (environmental effects)

蛍光物質の量子収率や励起スペクトルおよび蛍光スペクトルが環境から受ける影響を環境効果といいます。環境条件としては温度、イオン濃度、pH、励起光の強度、リガンドとの共有結合、非共有結合性の相互作用 (例. エチジウムブロマイドと二本鎖DNAとのインターカレーション) などがあります。この特性を応用したpH感受性蛍光試薬によるレセプター解析の例もあります。

フォトブリーチング (photobleaching ; 蛍光退色)

環境効果の一つで、励起蛍光色素分子でまれにみられる化学反応をさします。この反応は、励起状態にある蛍光物質が基底状態に比べて化学的に活性化され不安定になるために起こります。この反応の結果、蛍光分子は最終的に低蛍光性の構造になります。フォトブリーチングの進行は個々の蛍光物質のフォトブリーチングに対する感受性や化学的な環境、励起光の強度、励起光の照射時間、スキャンの繰返し数に依存します。

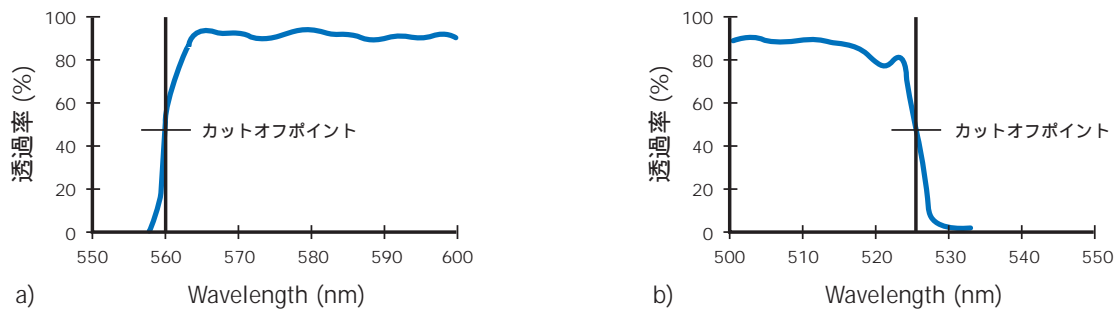


図3. 560 nmのLong-Passフィルター(a)と526 nmのShort-Pass フィルター(b)の波長特性。

光電子増倍管 (Photo multiplier tube : PMT)

光電子増倍管は蛍光や放射線の検出に用いられている装置の一つです。

低強度光の検出には、光電子増倍管が有効です。PMTに十分なエネルギーを持つ光が入射すると、陰極から電子が放出され、電子は電流として増幅されます。これら受光素子の電流は、入射光の強度に比例します。

蛍光フィルター (optical filter)

蛍光検出を行う際にノイズを除去する波長選択型の光学フィルターを総称して蛍光フィルターと呼びます。蛍光物質はその蛍光特有の励起波長によって励起されるため、蛍光を効率よく検出する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ます。

ロングパスフィルター (Long Pass filter)

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るほど良質なLong-Passフィルターであるといえます。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(図3a)。

ショートパスフィルター (Short Pass filter)

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3b)。

Band Passフィルター

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。一般にBand Passフィルターの名前には透過光波長域の中心波長およびFWHM(full-width at half-maximum transmission)が含まれます。たとえば、670BP30フィルターとは中心波長が670 nm、FWHMが30 nmのBand passフィルターを示します(図4)。

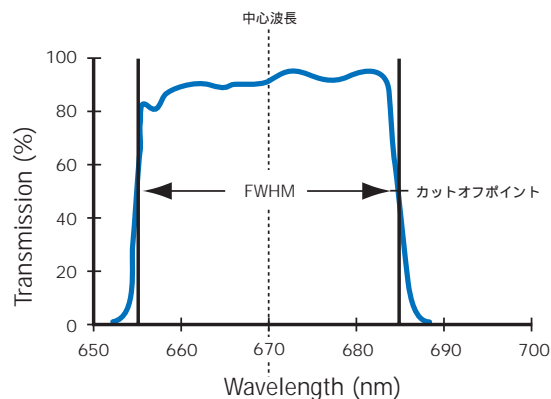


図4. 670BP30フィルターの透過波長

透過波長域の中心波長が670 nm、FWHMが30 nmであることを示しています。

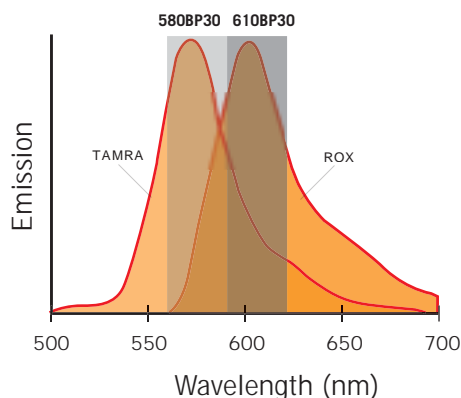


図 5. TAMRA (オレンジ)とROX (赤)の蛍光波長

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。

FWHM (full-width at half-maximum transmission)

波長選択型の光学フィルターが50%以上の光を透過する波長域の全長を示します。

幅の広い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より小さなFWHM値を持つフィルターの方が効果的です。

マルチカラーイメージング (multi-color imaging)

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。1種類の実験系で同じ作業を複数回繰り返す必要の

ある1色素標識と異なり、多重標識により、時間、コストおよび作業の手間を軽減します。また、1枚のメンブレン上、同一の条件でハイブリダイズなどの操作を行えるため、実験間の誤差を排除します。

クロストーク (cross-talk)

マルチカラーで検出する場合に、蛍光波長が重複することをクロストークと呼びます。

図5は蛍光波長が重複した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例です。

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。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。

参考文献

1. Haugland, R. P., Introduction to Fluorescence Techniques, in *Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals*, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR, pp.1-4 (1996)
2. Rye, H. S. *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 20, 2803-2812 (1992)
3. Cantor, C. R. and Schimmel, P. R., *Biophysical Chemistry Part 2*, W. H. Freeman, pp. 433-465 (1980).

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。