409 多波長蛍光の同時検出による高効率 DNA チップ検出装置の開発

Simultaneous detection of multi-line fluorescence for DNA micro array scanner

○学 Munkhbayer Nurzed (茨城大大学院) 林 照剛 (茨城大)

正 前川 克廣 (茨城大) 永野伸一 (茨城大学大学院)

Munkhbayer Nurzed, Hayashi Tertake, Maekawa Katsuhiro, Nagano Shinichi

Ibaraki University, 4-12-1 Nakanarusawa, Hitachi 316-8511

The present paper suggests a new method for high speed and precise detection of fluorescent signals. Only one detecting device is needed for detecting multi-color signals. Different frequency is attached each signals. We can simultaneously distinguish each fluorescent signal by using frequency analysis. This paper describe about a feasibility of this method.

Key words: flow cytometry, fluorescent,

1. はじめに

近年、複数種の細胞や DNA を異なる蛍光を発する蛍光色素でそれぞれラベリングし、マルチカラー蛍光解析を行う蛍光色素多重染色法が実用化され、複数パラメータの計測に利用されている¹⁾。この技術は、細胞の分類や DNA 発現解析等に有効であるが、蛍光測定サンプル数が非常に多く、測定に長時間を要することから、測定速度の向上が強く求められている。

本研究では、マルチカラー蛍光信号を周波数空間で測定することにより、SN 比の向上を実現し、さらにそれぞれの蛍光信号を一台の検出装置で同時検出する方法を提案している。本手法により、蛍光測定精度の向上とマルチパラメータ計測時の測定時間の短縮が見込まれる。

本報では本手法の妥当性を検証するため、基礎的なシミュレーションおよび実験を行った結果について報告する。

2. 蛍光信号の周波数空間検出原理

蛍光物質の濃度と蛍光強度の間には物質の濃度が小さい範囲では、近似的に比例関係式が成り立つことが知られている。この場合、蛍光強度 F は、入射光強度を I_0 、モル吸光係数を ε 、物質の濃度を c 、光路長を d とすると次式で与えられる²⁾。

$$F = I_0 \phi \times 2.303 \varepsilon c d \quad (1)$$

蛍光は一般に $10^{-7} \sim 10^{-10}$ s の短い寿命を持つ³⁾ ことから入射光 I_0 に強度変調を加え周期性を与えれば、式 (1) より発生する蛍光 F も入射光の周期に対応した周期性を示す。

この周期性を持つ蛍光信号を同時に検出し、周波数解析を行えば、蛍光信号の周波数スペクトルが得られる。

例えば Cy3, Cy5 という 2 種類の蛍光色素を励起する場合、励起波長としてそれぞれ 543nm, と 633nm の 2 つの光源が使用される。各光源にそれぞれ ω_1 , ω_2 の周期で強度変調を加えれば、各色素が励起され得られる蛍光信号は ω_1' , ω_2' となる。したがって、蛍光強度 F の時間関数 $F(t)$ をフーリエ変換すれば、周期 ω_1' , ω_2' の位置にスペクトルが確認できることから、一台の検出装置で 2 色励起蛍光を同時に独立して検出できる。

3. 本研究の特徴

従来手法では、マルチカラー蛍光検出を実現するために、各色の蛍光をそれぞれ測定する、もしくは、複数の受光装置

と波長選択フィルターにより各蛍光を同時に測定するという方法がとられていた。しかし、前者は測定時間の長さが、後者は測定装置の複雑さが問題とされていた。

本手法では、2 種類以上の蛍光信号についても、周波数解析によって、各信号成分を独立して検出できる。これは、1 回の測定で、しかも単一の受光装置で、複数の蛍光信号を同時検出できることを意味しており、装置の簡略化と測定の高速度を両立させることができる。

4. 周波数空間検出シミュレーション

Fig1 (a), (b), (c) に、周期 ω_1 , ω_2 , ω_3 の 3 つの周期を持つ信号を合成した信号とそれぞれの周波数解析結果を

Fig.1 Fourier analysis of multi-frequency signals

示す。合成信号のフーリエ変換後の周波数スペクトルを観察すると各周波数に対応したピークが独立して検出できることから、合成信号を単一装置で検出した場合でも、各周波数成分の独立検出が実現できることが確認できる。

5. 周期強度光生成実験装置

周波数信号検出を実現するため、液晶を用いて蛍光励起光に強度変調を与え、周期強度光を生成する実験を行った。実験装置の概要を Fig. 2 に示す。

Fig. 2 Schematic of frequency signal detection

波長488nmのArイオンレーザ(Coherent Inc. Inova304C)の光束径は、レンズL1およびL2からなるコリメータ光学系により1.5mmから5.0mmへと拡大される。拡大された入射光の強度は、偏光子P1, P2, および液晶素子LCDからなる可変強度変調マスクにより制御することができる。マスク透過率の制御は、LCDに接続するPC上から行い、透過光の強度をPowermeter(ネオアーク(株)PM-371)によって測定する。

使用した液晶素子の解像度は800×600pixel、画素サイズは一辺33 μ mである。光線の進行方向がz軸となるように、座標軸を設定し、偏光子P1の吸収軸をx軸方向に設定し、y方向に偏光した光を透過させる。偏光子P2の吸収軸は、P1と直交するようにy軸方向に設定し、液晶素子による可変強度変調マスクを構成している。

6. 液晶素子の電気光学効果測定結果

Fig. 2の光学系において、制御PCから、0～255までの異なる階調を液晶上に出し、光透過率の変化を測定した結果をFig. 3に示す。階調値は黒の出力が0で遮光を意味し、白の出力が255で光透過を意味する。0から255までは、その数値に応じて光の透過量が增大する。

Fig. 3 Electro-optical effect of LCD panel

Fig. 3から、階調250付近で透過光強度が最大となり、液晶素子の入射光強度透過率は最大で70%弱となることがわかる。また、階調100～200の間で、階調値に応じた透過光強度の増大が見られることから、白から黒までの中間調表示により、光透過量を制御し周期強度光を生成できる。そこで、100～200の階調を利用して、1階調の表示時間変化させて、4つの周期の信号を作製した。Fig. 3に作製した4つの周期信号を液晶に出し、入射光強度を測定した結果を示す。それぞれ、各階調の表示時間は、200ms, 150ms, 100ms, 50msとしている。Fig. 3からわかるように液晶に同一階調を表示する時間を短縮することで、その周期を制御

Fig. 3 Multi-frequency signals for incident light

することができる。Fig. 4に上記4信号の合成結果を示す。さらにFig. 5に合成信号のフーリエ解析による周波数スペクトルを示す。Fig. 5の結果から、時間空間でその識別が困難な周期的信号を周波数空間で容易に、識別できることがわかる。したがって、入射光強度に対応した蛍光信号を周波数空間で検出できれば、複数信号を同時検出しても、各信号を独立して検出することが可能となる。

Fig. 4 Synthesis of four frequency signals

Fig. 5 Fourier transformation of synthesis signal

7. おわりに

液晶マスクを利用して周期的入射光を作製し、4つの異なる周期的信号からなる合成信号を作製した。さらに、高速フーリエ変換によって、この信号の周波数スペクトルを観察し、各信号成分に対応したスペクトルが周波数空間で独立して観察できることを確認した。

今後は、作製した信号により蛍光を励起し、蛍光信号の周波数独立識別の妥当性を検証する。

参考文献

- 1) 天神美夫, 応用サイトメトリ, 医学書院, 2000, p353
- 2) 猪飼篤, 生物学基礎コース 分析・計測法, 丸善, 1998, p57
- 3) 速解光サイエンス辞典, オプトロニクス社, 1998, p205