

平成 22 年 6 月 4 日現在

研究種目： 若手研究 (B)
 研究期間： 2008 ~ 2009
 課題番号： 20710098
 研究課題名 (和文) 偏光した励起光と光導波路型基板を用いた蛍光の超高感度検出
 研究課題名 (英文) Highly sensitive detection of fluorescence with an optical waveguide substrate and polarized excitation light

研究代表者
 秋元 卓央 (AKIMOTO TAKUO)
 東京工科大学・応用生物学部・講師
 研究者番号： 90367194

研究成果の概要 (和文) : 金属と誘電体で作製した光導波路型基板上で蛍光を観察すると、通常のガラス基板上で観察した場合と比較し、蛍光を 100 程度強く観察することができる。本研究では、光導波路型基板での蛍光の増強が励起光の偏光に強く依存することを利用した、高感度な蛍光検出装置の開発を行った。この結果、約 10 倍程度の測定感度の向上と S/N 比の向上に成功した。また、本方法を用いて、蛍光標識タンパク質の検出を行ったところ、約 10 倍感度良く測定することに成功した。

研究成果の概要 (英文) : Fluorescence from an optical waveguide substrate fabricated with a metal and a dielectric was known to be enhanced more than 100 factors. It has been found in recent year that the fluorescence enhancement depends on the polarization of excitation light. Motivated by this finding, we attempted to develop an instrument for highly sensitive detection of fluorescence employing the polarization dependence of the optical waveguide substrate. As a result, approximately 10-times increase of the sensitivity and S/N ratio could be achieved.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	800,000	240,000	1,040,000
2009 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	1,600,000	480,000	2,080,000

研究分野：バイオセンサー

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ材料、ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：バイオチップ、蛍光

1. 研究開始当初の背景

蛍光を高感度に検出することは生体分子などを高感度に検出するための、重要な技術である。

蛍光を高感度に検出する方法として、図 1

に示すような、スライドガラス上に金属、透明な誘電体の順に薄膜を積層した、光導波路型基板が報告されている。光導波路型基板上で蛍光を観察すると、蛍光の強度は誘電体の膜厚に依存し、最大で 100 倍以上になると報

告されている。

そこで我々は、光導波路型基板を生体分子の高感度検出に応用するために、光導波路型基板の基礎的な性質を調べてきた。この結果、光導波路型基板上で効率よく蛍光を増強させるためには、励起光の偏光が重要であることを突き止めた。すなわち、光導波路型基板に対しに平行に偏光する励起光で蛍光は増強され、光導波路型基板に垂直に偏光する励起光では蛍光は増強されないことがわかった。

一方で、生体分子を高感度に検出するためには、弱い蛍光を感度良く検出するだけでなく、背景光を抑え S/N 比の高い測定しなければならない。光導波路基板は励起光の金属での反射により、背景光が高くなり S/N 比が小さくなることが予想された。しかし、我々は光導波路基板の蛍光増強の偏光依存性を利用すれば、高い S/N 比での測定が可能になると考えた。

そこで本研究では、光導波路型基板での蛍光増強の励起光の偏光依存性に着目した高感度かつ S/N 比の高い生体分子の検出装置の開発を行うこととした。

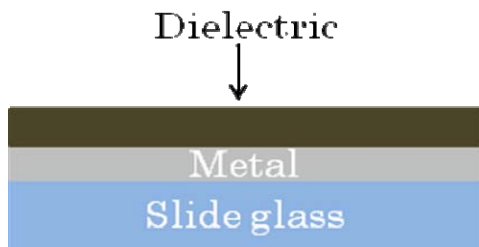


図 1 光導波路型基板の模式絵

2. 研究の目的

光導波路型基板での蛍光増強の励起光の偏光特性に着目した、高感度かつ S/N 比の高い蛍光の検出方法の開発を行う。具体的には、光導波路型基板上の蛍光物質を偏光した励起光を用いて励起し、これによる蛍光の偏光と、励起光の偏光の違いに着目した高感度かつ S/N 比の高い蛍光検出装置の開発を行う。

また、本方法を用いて、蛍光標識のタンパク質の検出を行い、通常ガラス基板を用いる検出方法と本方法を比較し、本方法の優位性を調べる。

3. 研究の方法

(1) 蛍光物質と蛍光増強度の関係

光導波路型基板は金属に Ag、誘電体に Al_2O_3 を用いて作製し、作製した光導波路型基板上での蛍光増強度を、さまざまな蛍光物質を用いて調べた。具体的には、Fluorescein, Rhodamine B, Cy3, Cy5 を用いた。この結果より、蛍光物質ごとに最大の蛍光増強度と、

そのときの誘電体の膜厚に関する知見を得た。そしてこの結果を、以降の実験条件に適用した。なお本研究では、蛍光増強度は「光導波路型基板での蛍光強度」を「ガラス基板での蛍光強度」で除算したものと定義した。(2) 高感度かつ、高い S/N 比の装置を開発するために、図 2 に示す装置を作製し、光導波路型基板に蛍光物質を塗布し、偏光した励起光を照射した。そして、検出器直前での蛍光の偏光と、励起光の偏光を詳しく調べた。

具体的には、Polarizer 1 により励起光の偏光を y 軸方向への直線偏光とした。そして、検出器直前での蛍光の偏光と励起光の偏光を、Polarizer 2 を用いてそれぞれ調べた。この結果より、検出器直前での励起光の偏光と蛍光の偏光の違いに着目した、蛍光の高感度かつ S/N 比の高い検出装置の開発を行った。

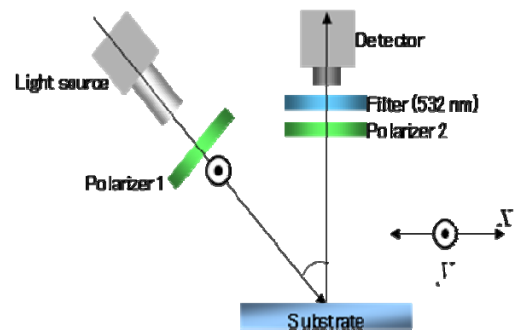


図 2 測定装置の模式絵

(3) 光導波路型基板表面に 3 アミノプロピトリメトキシシランを用いてアミノ基を修飾し、ここにグルタルアルデヒドを用いてタンパク質を固定化した。本研究では、測定対象として、Cy3 標識の goat 由来の IgG を用いた。すなわち、抗 goat IgG 抗体を光導波路型基板表面に固定化し、Cy3 標識の goat IgG の検出を行った。また、同様の実験をガラス基板を用いて行い、測定感度の比較を行った。

4. 研究成果

(1) 蛍光物質と蛍光増強度の関係

様々な蛍光物質を用いた場合の、 Al_2O_3 の厚みと蛍光増強度の関係を図 3 示す。図 3a は Fluorescein と Cy5 の結果であり、図 3b は Rhodamine B と Cy3 の結果である。

図 3a の結果より、励起・蛍光波長の長い Cy5 のほうが、Fluorescein よりも厚い Al_2O_3 の膜厚で蛍光増強が極大となることがわかる。一方図 3b の結果より、励起・蛍光波長がほぼ等しい Rhodamine B と Cy3 では、蛍光増強が極大となる Al_2O_3 の膜厚はほぼ等しいことがわかる。

すなわちこれらの結果より、蛍光増強度は Al_2O_3 の厚みに依存して変化し、蛍光増強度が極大となる Al_2O_3 の膜厚は、蛍光物質に依存することがわかる。具体的には、励起・蛍光波長が長い蛍光物質ほど、厚い Al_2O_3 の膜厚で蛍光増強度が極大になることがわかる。

一方で蛍光増強度の極大値は蛍光物質によらず 30 倍程度であった。また、蛍光増強度と蛍光物質の励起・蛍光波長の間の顕著な規則性は、本実験からは観察できなかった。

これらの結果より、次の実験では安価で退色しにくい Rhodamine B を蛍光物質として利用し、 Al_2O_3 の膜厚は 110 nm とし実験を行った。

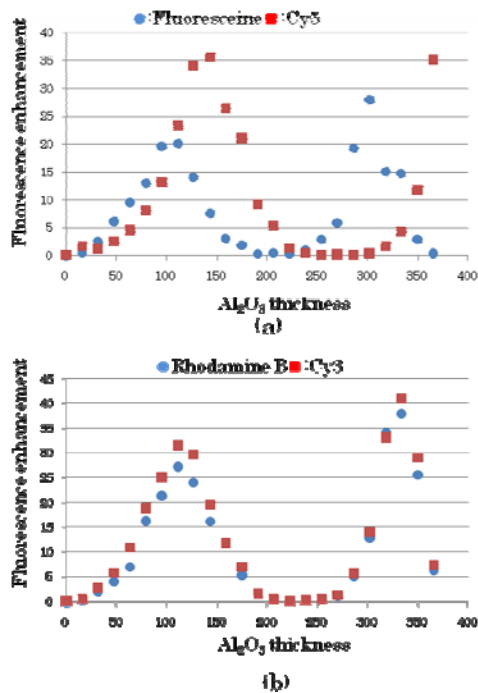


図3 蛍光増強と Al_2O_3 の膜厚の関係

(2) 励起光の偏光と蛍光の偏光の関係

図4に検出器直前での励起光の偏光と蛍光の偏光を調べた結果をそれぞれ示す。図の横軸はPolarizer 2の回転角度を示し、0度は図2でx軸方向への偏光を示し、 ± 90 度はy軸方向への偏光を示す。

図4より励起光は光導波路型基板で反射した後も偏光を維持し、y軸方向に偏光していることがわかる。一方で蛍光はほぼ無偏光であることがわかる。すなわち、検出器直前では、励起光はy軸方向に偏光しているが、蛍光は無偏光であると結論付けられる。

これらの結果から、Polarizer2を0度に設定することで、最も効率よく励起光が検出器に入射することを抑制できると期待できる。

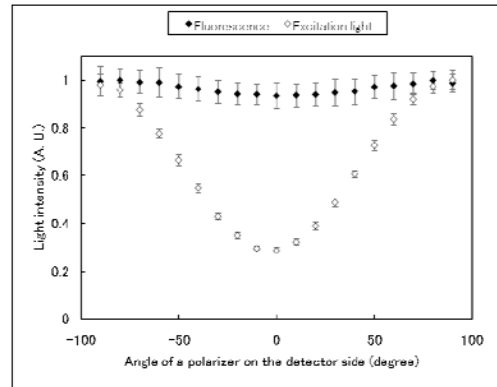


図4 励起光と蛍光の偏光

つぎに、同じ装置でガラス基板上と光導波路型基板に塗布した蛍光物質をそれぞれ測定し、蛍光増強度とPolarizer2の角度の関係調べた。また、ガラス基板と光導波路型基板の両方で、S/N比を測定し、光導波路型基板におけるS/N比の増加の割合を求めた。このときNは、蛍光物質が塗布されていない背景光の強さとした。またS/N比の増加の割合は「光導波路型基板でのS/N比」を「ガラス基板でのS/N比」で除算することで求めた。この結果を図5に示す。

図5より、蛍光増強度はPolarizer2の回転角度に関わらずほぼ一定の15倍であることがわかる。これは、蛍光はほぼ無偏光であるという先の結果を踏まえると妥当な結果である。

一方で、S/N比は回転角度が0度の場合最大約12倍であり、 ± 90 度では最小3倍程度である。これは、偏光板を0度にしたことにより、光導波路型基板で反射した励起光が遮断され、背景光が抑制されたことが理由である。

以上の結果より、Polarizer2の回転角度を0度に設定することで、通常ガラス基板と比較し、蛍光を約15倍強く観察でき、また、S/Nを12倍高く観察できることがわかった。

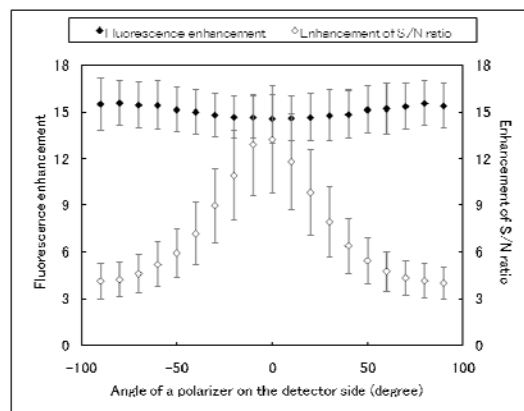


図5 蛍光増強度とS/N比の偏光角依性

(3) 光導波路型基板を用いた蛍光標識タンパク質の測定

ここでは、Cy3 で標識した IgG を光導波路型基板と先の装置を用いて測定し、ガラス基板を用いる方法との比較を行った。またここでは、IgG の標識が容易なため、蛍光物質として Rhodamine B と励起・蛍光波長の近い Cy3 を用いた。

はじめに、光導波路型基板への最適な固定化抗体の濃度を求めるために、光導波路型基板上に異なる濃度の抗 goat IgG 抗体を固定化した。ついで、100 $\mu\text{g/ml}$ の Cy3 標識の goat IgG を光導波路型基板上で反応させ、洗浄後蛍光強度を測定した。

この結果を図 6 に示す。この結果より、蛍光強度は抗 goat IgG 抗体濃度に依存することがわかった。また、抗 goat IgG 抗体濃度は 100 $\mu\text{g/ml}$ 以下では、いずれの濃度でも実験に支障がないことがわかった。このため、以降の実験では、固体化する抗 goat IgG 抗体の濃度は 50 $\mu\text{g/ml}$ とした。

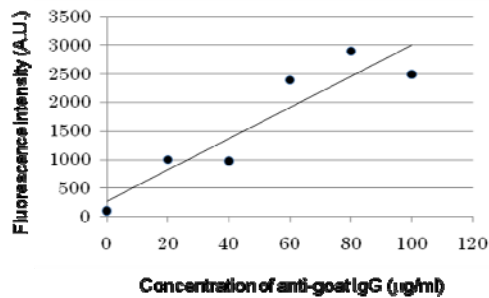


図 6 固定化抗体濃度を蛍光強度の関係

つぎに同様の方法で 50 $\mu\text{g/ml}$ の抗 goat IgG 抗体を光導波路型基板とガラス基板に固定化し、Cy3 標識の goat IgG の測定を行った。また、コントロールとし、Cy3 標識の rabbit IgG を用いた。このとき、Cy3 標識の goat IgG と Cy3 標識の rabbit 由来の IgG 濃度はともに 100 $\mu\text{g/ml}$ とした。

結果を図 7 に示す。この結果より特異的に Cy3 標識の goat IgG が測定できていることがわかる。また、光導波路型基板とガラス基板で得られた Cy3 標識の goat IgG 蛍光強度を比較すると、この時の蛍光増強度は約 10 倍であることがわかる。

先の結果では、蛍光増強度は 15 倍であった。抗体の測定の場合は蛍光増強度が減少しているが、これは、抗体の大きさにより、蛍光物質が光導波路型基板から離れてしまったことが原因と考えられる。このため、 Al_2O_3 の膜厚を制御することで、今後 15 倍程度の蛍光増強度を達成できると期待される。

一方、今回の実験では、光導波路型基板とガラス基板の間で S/N 比の顕著な違いは観測されなかった。これは Cy3 標識の IgG の濃度が高かったため、S 成分が十分大きく、S/N 比に違いが現れなかったことが原因と考えられる。

本来は、低い濃度での Cy3 標識の IgG を測定し、S/N 比の比較を行う必要があるが、今回の研究では時間の制約から、この実験については達成できなかった。

今後は、Cy3 標識の IgG を測定した場合の光導波路型基板とガラス基板の間で S/N 比の比較を行う予定である。

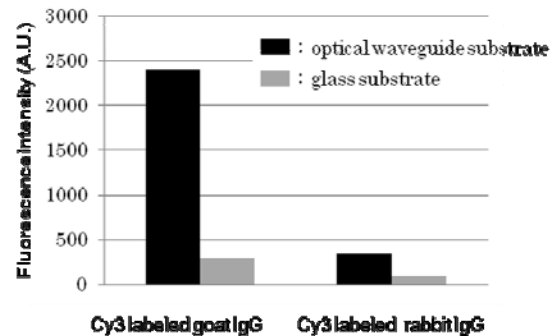


図 7 Cy3 標識 IgG の測定結果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

1. Takuo Akimoto and Mitsuru Yasuda, Fluorescence enhancement and reflection of the excitation light observed with a multilayered substrate, Appl. Opt., 49, 80-85 (2010). 査読有り
2. Takuo Akimoto, Mitsuru Yasuda, and Isao Karube, Effect of the polarization and incident angle of excitation light on the fluorescence enhancement observed with a multilayered substrate fabricated by Ag and Al_2O_3 , Appl. Opt., 47, 3789-3794 (2008). 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. 江藤 広基・柏木 賢人・安田 充・秋元 卓央、積層構造基板を用いた蛍光タンパク質を発現する大腸菌の高感度検出、日本化学会、近畿大学、2010年3月28日
2. 安田 充、秋元 卓央、軽部 征夫、多層膜基板での偏光した励起光の反射が与える蛍光増強への影響、応用物理学会、筑波大学、2009年3月31日

3. 安田 充、秋元 卓央、軽部 征夫、Ag
と Al_2O_3 で作製した多層膜基板を用いた
蛍光標識 DNA の高感度検出、応用物理学
会、中部大学、2008 年 9 月 3 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋元 卓央 (AKIMOTO TAKUO)
東京工科大学・応用生物学部・講師
研究者番号：90367194