

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23510138

研究課題名(和文) 積層構造基板における蛍光と背景光の偏光の違いを利用したタンパク質の超高感度検出

研究課題名(英文) Highly sensitive protein detection using polarization of fluorescence and background light of multi-layered substrate

研究代表者

秋元 卓央 (AKIMOTO, Takuo)

東京工科大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：90367194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：はじめに、偏光した励起光を用いた場合の積層構造での蛍光と背景光の偏光を詳しく調べた。この結果、背景光は偏光しているのに対して蛍光は無偏光であることがわかった。これより、TE偏光した光を励起光源とし、これと直交する成分の蛍光を検出する蛍光検出装置を作製した。この装置を用いることで、蛍光を100倍程度感度良く観察することができた。また、この方法を応用した装置を用いてCy3標識アビジンの検出を行ったところ、24倍感度良く検出することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：Polarization of fluorescence and background light from a multi-layered substrate were firstly investigated in case that a polarized light was used as an excitation light. As a result, the fluorescence was found not to be polarized although the background light was polarized. Irradiation of TE excitation light and detection of fluorescence polarized perpendicular to the excitation light were employed for a newly developed fluorescence detection instrument. Approximately 100-fold sensitivity improvement for fluorescence detection was achieved with this instrument. Moreover, Cy3 labeled streptavidin could be detected with 24-fold sensitivity improvement using an instrument equipped with the polarized excitation light.

研究分野：複合領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学, ナノ材料・ナノバイオサイエンス

キーワード：バイオ関連機器 マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

金属と誘電体を積層した積層構造基板で蛍光を観察すると、通常のガラス基板と比較し、蛍光を200倍程度明るく観察することができる。しかし、積層構造基板では、励起光の反射による背景光が強いため、S/N比が小さく高感度な蛍光の検出が困難であった。このため代表者は、背景光を抑えた高感度な蛍光検出を行うために、背景光と蛍光の偏光について調べた。この結果、積層構造基板では背景光が偏光しているのに対し蛍光が無偏光であることを発見した。そこで本研究では、蛍光と背景光の偏光の違いを利用してS/N比を向上させ、通常のガラス基板と比較し、100倍以上の感度で蛍光を検出できる装置を開発することを考えた。また、本装置を用いて、蛍光標識タンパク質の高感度検出を試みることにした。

2. 研究の目的

積層構造基板の基本的な性質についてはあまり調べられておらず、タンパク質の検出に応用された例はほとんどない。そこで代表者はこれまで、積層構造基板の基礎的な性質について調べてきた。この結果、蛍光を効率良く増強するためには励起光の偏光が重要であることを発見した。すなわち、TE偏光の励起光は蛍光を200倍程度増強し、TM偏光の励起光は蛍光を増強しないことを発見した。この結果より、TE偏光した励起光を用いて蛍光の検出を行った。しかし積層構造基板では、励起光が積層構造基板で強く反射し、背景光が強くなることがわかった。このため、特に低濃度の蛍光を検出した場合S/N比が小さく高感度の蛍光検出が困難であった。そこで代表者は、S/N比の大きい高感度な検出をするために蛍光と背景光の偏光に着目した。すなわち、S/N比の高い検出をするためにはTE偏光した励起光によって蛍光を励起し、背景光と直行する偏光の蛍光を検出すればよいことがわかった。そして、これらの特性を利用した蛍光検出装置を作製しタンパク質の検出を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

積層構造基板は顕微鏡のスライドガラス上に銀とAl₂O₃をスパッタリングすることで作製した。

積層構造基板での背景光と蛍光の偏光を改めて詳しく調べるために、偏光した励起光を照射したときの背景光と蛍光の偏光を詳しく調べた。つぎに、得られた結果より最もS/N比が大きく光学系について検討し、新しく蛍光測定装置を作製した。最後にタンパク質の検出を行った。具体的には、ピオチンを積層構造基板に固定化しCy3標識のアビジンの検出を行った。

4. 研究成果

励起光の偏光と蛍光の偏光を詳しく調べるために、図1に示す装置を作製した。この装置では、励起光の入射角度が自由に変わることができ、また、TEとTMの互いに直交する2つの偏光した励起光を照射できるようになっている。さらに、積層構造基板での蛍光の偏光を詳しく調べるために検出器の前に偏光板を配置した。

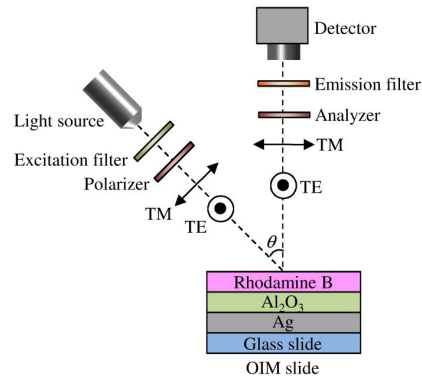


図1 作製した装置

図2はTE偏光とTM偏光の励起光を照射したときの積層構造基板で反射した励起光の偏光を調べた結果である。代表として励起光の入射角度は20度の場合を示している。この結果より、励起光は積層構造基板で反射した後でも、もとの偏光を維持していることが分かる。すなわち、TE偏光の励起光は反射した後でもTE偏光であった。同様にTM偏光の励起光は反射した後でもTM偏光であった。

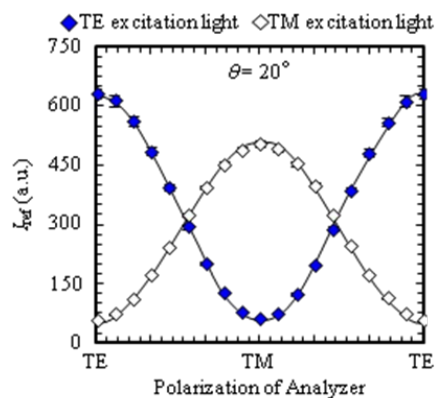


図2 励起光の偏光

つぎに、積層構造基板に蛍光物質のRhodamineBをスピンコートし、TEとTM偏光の励起光を照射した。そしてこのときの蛍光の偏光を調べた。結果を図3に示す。図3より、励起光の偏光に関わらず蛍光は無偏光であることがわかった。これらの結果より、高いS/N比で蛍光を観察するためにはTE偏光の励起光を使用し、蛍光のTM成分を検出することが最適であることがわかった。

さらに、偏光を利用した蛍光検出の優位性を示すために、無偏光の励起光を用いて蛍光を励起し偏光板を使用しないで蛍光を検出する一般的な光学装置との比較を行った。この結果、図4に示すように、偏光板を利用することによる S/N 比の増加は入射角度が 20 度の場合が最も高く、約 5 倍であった。

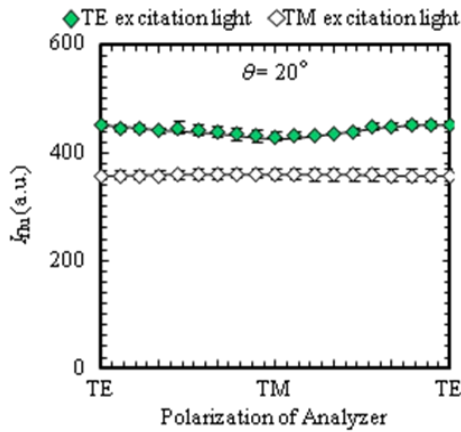


図3 蛍光の偏光

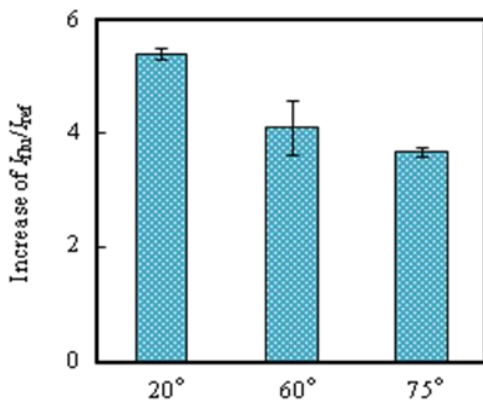


図4 S/N 比の比較

つぎに、積層構造基板とガラス基板の比較を行った。積層構造基板では、入射角 20 度で TE 偏光した励起光を使用し、TM 成分の蛍光を検出した。ガラス基板では入射角 20 度で無偏光の励起光を使用し、偏光を利用しないで蛍光の観察を行った。またここでは、積層構造基板とガラス基板上に濃度の異なる RhodamineB をスポットとした。観察の結果を図5に示す。

図5より、積層構造基板の方が明らかに高いコントラストで蛍光を観察できていることがわかる。またこの画像より、RhodamineB がスポットされていない場所の明るさをノイズシグナルとして積層構造基板とガラス基板を比較すると、積層構造基板では 1/8 倍に減少したことがわかった。一方で蛍光シグナルは 13 倍高くなっていた。これらの結果より、作製した装置と積層構造基板では 13

× 8 = 104 倍 S/N 比が向上したことがわかった。

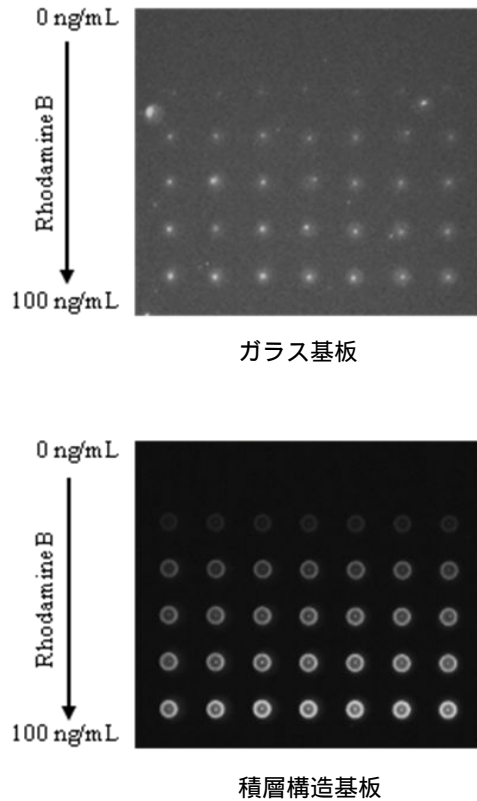


図5 ガラス基板との比較

最後に、図6のように市販の蛍光顕微鏡を改造し、励起光を TE 偏光とし、TM 成分の蛍光を検出する装置を作製した。積層構造基板にはビオチンをアミド結合を介して固定化し、そこに 1 μg/ml の Cy3 標識のストレプトアビジンを反応させた。比較としてガラス基板で同様の反応を行った。これらの結果を図7に示す。図7からわかるように積層構造基板での蛍光のコントラストは、明らかにガラス基板に比較し改善されていた。

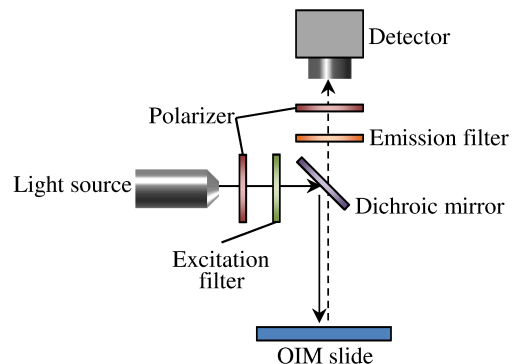


図6 タンパク質検出するための装置

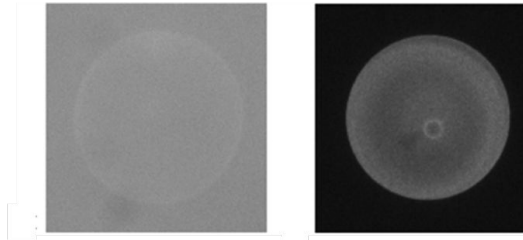


図7 タンパク質の検出

図8は図7で得られた画像の蛍光強度と背景光強度から S/N 比を算出したものである。このグラフより、蛍光強度はガラス基板の3.1倍となり背景光強度は1/8.4倍減少したことがわかる。また、この結果より S/N 比は25.9倍高くなったことがわかった。

以上の結果より本方法はタンパク質の高感度検出に応用できることが示されたと考えられる。

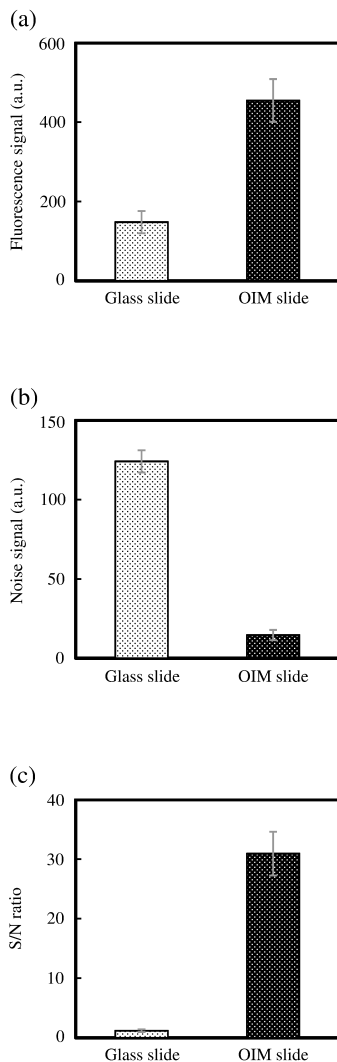


図8 タンパク質検出の評価

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

T. Harashima, M. Yasuda and T. Akimoto “Enhanced Fluorescence using an Optical Interference Mirror overlaid with Silver Island Film” *Analytical Letters*, in press. 査読有り

M. Yasuda and T. Akimoto “Highly Sensitive Fluorescence Detection of Avidin/Streptavidin with an Optical Interference Mirror Slide” *Analytical Sciences* 28, pp947-952 (2012). 査読有り

〔学会発表〕(計 2 件)

M. Yasuda and T. Akimoto “High contrast fluorescence imaging of biomolecules using an optical interference mirror slide with a polarized excitation light” 22nd Anniversary World Congress on Biosensors, Cancun, Mexico, May 15-18, P1.79 (2012)

安田充, 秋元卓央 “薄膜干渉基板の偏光特性に基づく蛍光の増強と S/N 比の向上” 2011 年春季 第 58 回 応用物理学関係連合講演会, 3 月 9 日 (2011). 2011 年春季第 58 回 応用物理学関係連合講演会講演予稿集

〔図書〕(計 2 件)

秋元卓央 他 111 名, バイオセンサの先端科学技術と新製品への応用開発, 技術情報協会. 2014. 73-78

秋元卓央 他 44 名, 技術予測レポート 2023(上) 健康寿命の延伸を目指す日本の技術編, 株式会社日本能率協会総合研究所. 2013. 143-153.

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 准教授

研究者番号: 9 0 3 6 7 1 9 4