17p-P5-3

リアルタイム 1 分子蛍光イメージング法の SN 比を向上するゼロモード導波路の設計

Improving zero-mode waveguide structure for enhancing signal-to-noise ratio of real-time single-molecule fluorescence imaging

早大理工 [1]，早大高等研 [2] ,東大院薬 [3]
○大久保幸太朗 [1],日向野駿 [1],上野太郎 [3],船津高志 [3],山本英明 [2],谷井孝至 [1]
Kotaro Okubo[1], Shun Higano[1], Taro Ueno[3], Takashi Funatsu[3], Hideaki Yamamoto[2], Takashi Tanii[1]

ゼロモード導波路を用いた 1 分子蛍光観察法は，酵素－リガンド間の結合解離を 1 分子レベルでリアルタイムに可視化する強力な手法である[1]。ゼロモード導波路は，金属ナノ開口部に励起光を閉じ込めることにより，溶液中の高濃度の蛍光標識分子の中から，目的の酵素－リガンド複合体を識別することを可能にする(図 1)。しかしながら，酵素－リガンド複合体からのシグナル蛍光を，解離した多数の蛍光標識リガンドが発する背景光の揺らぎの中から識別するのは困難で，更なる高濃度においてはシグナル対ノイズ比（S/N）の向上が必須であった。これまでに本研究グループから，ゼロモード導波路の底部をエッチングすると，シグナル蛍光強度が増加する実験結果を報告したが[2]，今回，近接場光学シミュレーションによって，このエッチングが S/N を効果的に向上させることを定量的に見出したので，その詳細を報告する。

ゼロモード導波路を用いることの有意性は，光の回折限界を超えて極微小領域に励起光を閉じ込められることである。したがって一般に，導波路の直径をできるだけ縮小することが望まれる。しかしながら，導波路の直径を縮小すると，近接場内の励起光強度と蛍光検出効率の両方が低下し，結果として，シグナル蛍光強度が低下する。もちろん励起体積が縮小するので浮遊分子からの蛍光（ノイズ強度）も低下する。したがって，従来型のゼロモード導波路の直径を縮小すると，S/Nはほぼ一定となる（図2(a)及び(b)の青線）。一方，直径を縮小すると同時に導波路底部をエッチングすると，エッチングしたことによる励起体積の増加と直径の縮小による励起体積の減少が相殺してノイズ強度が一定となるが，エッチング部の励起光強度と蛍光検出効率が増加するため，S/Nは従来法の6倍にまで増加し、高濃度においても一分子観察が可能となる（図2(a)の緑線）。すでに，ゼロモード導波路を活用したリアルタイム 1 分子DNAシーケンサや酵素の反応速度解析がなされているが，上記の結果はエッチングした導波路を用いることにより，これらの精度が大幅に向上できることを示している。なお，ポスター発表では，シミュレーションによる定量的な解析結果を示す予定である。

[1]J. Eid, et al: Science 323 (2009) 133.
[2]T. Miyake, et al: Anal. Chem. 80 (2008) 6018.

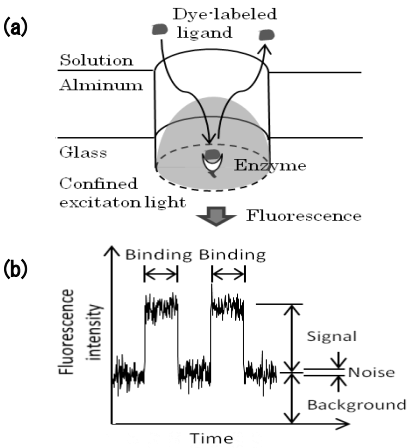

Fig.1 (a) Schematic of real-time SMFI with a ZMW. (b) Fluorescence signal detected from the ZMW in relation to the binding-dissociation between a ligand and an enzyme.

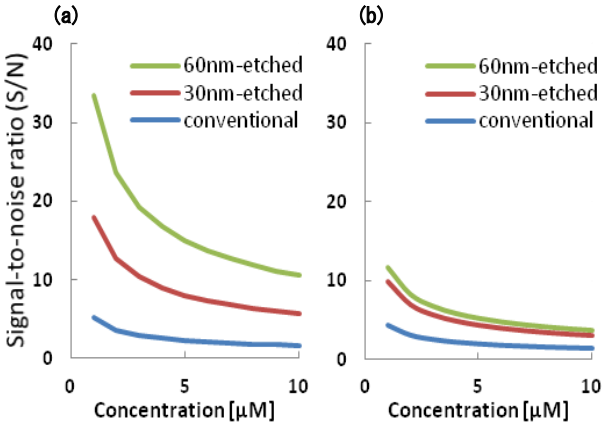

Fig.2 Signal-to-noise ratio in the single-molecule fluorescence imaging with ZMWs evaluated by computational optics simulation. (a) Diameter: 50 nm, (b) Diameter: 150 nm.

© 2013 年　応用物理学会